

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANAÍDE SILVA SOUSA

**Atuação de DNA metiltransferases e DNA desmetilases no desenvolvimento do
testículo**

Ribeirão Preto

2022

ANAÍDE SILVA SOUSA

Atuação de DNA metiltransferases e DNA desmetilases no desenvolvimento do testículo

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

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Ribeirão Preto

2022

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

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

FICHA CATALOGRÁFICA

Sousa, Anaíde Silva

Atuação de DNA metiltransferases e DNA desmetilases no desenvolvimento do testículo. Ribeirão Preto, 2022.

70p.

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

1. Metilação do DNA; 2. Regulação epigenética; 3. Desenvolvimento do testículo.

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento de Pesquisa (CNPq) e da Fundação de Amparo ao Ensino Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Anaíde Silva Sousa

Atuação de DNA metiltransferases e DNA desmetilases no desenvolvimento do testículo, 2022

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Genética.

BANCA EXAMINADORA

Data da defesa: ___/___/___

Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Cerila e Geraldino pelo amor, incentivo e apoio incondicional durante todo processo.

À professora Dra. Ester Silveira Ramos, minha orientadora, pelos ensinamentos e por acreditar no meu potencial.

Ao Dr. Jorge Augusto Marchesi Petroli, por todo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu irmão Leon Tito e às minhas amigas Fernanda, Bárbara e Camilla, por se fazerem presente mesmo de longe, e pelas injeções de ânimo nos momentos em que precisei.

A todos os alunos e funcionários do Bloco C do Departamento de Genética da FMRP/USP.

Ao CNPq, CAPES e FAEPA pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

A toda minha família e amigos, que sempre me incentivaram e contribuíram deixando meus dias mais leves.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, deixo expressa a minha imensa gratidão.

RESUMO

Sousa, Anaíde Silva. 2022. **Atuação de DNA metiltransferases e DNA desmetilases no desenvolvimento do testículo.** 70p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O desenvolvimento sexual é um processo complexo que envolve muitos fatores, em especial, genéticos e ambientais. Compreender o desenvolvimento testicular em aves durante a embriogênese é importante para o aprimoramento do conhecimento em diversas áreas, desde o desenvolvimento sexual humano até a conservação das espécies. A metilação do DNA é um importante mecanismo epigenético envolvido na regulação da expressão gênica e está envolvida com a gonadogênese. Em mamíferos, o início da regulação epigenética do testículo foi descrito após a determinação do sexo, porém ainda não se sabe ao certo como as enzimas envolvidas com os processos epigenéticos atuam. A galinha é um bom modelo animal de estudo de genes envolvidos na regulação epigenética. Nosso objetivo foi inicialmente investigar a expressão de genes responsáveis pela metilação e desmetilação do DNA em diferentes estágios do desenvolvimento testicular de embriões de *Gallus gallus domesticus*, bem como identificar possíveis regiões reguladoras da metilação do DNA em genes envolvidos na diferenciação testicular. Foram utilizados ovos fertilizados de galinha, e as amostras de testículos foram coletadas de embriões durante diferentes estágios do desenvolvimento gonadal (HH32, HH35, HH38, HH41 e HH45). O RNA total foi isolado para posterior síntese de cDNA. A expressão de seis genes alvo, sendo três que codificam *DNA metiltransferases* (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*) e três que codificam *DNA desmetilases Ten-eleven-translocation* (*TET1*, *TET2* e *TET3*), foi avaliada por RT-qPCR usando *SYBR™ Green*. *β-actina* e *Proteína Ribossômica L5 (RPL5)* foram usados como genes de referência. Em seguida, as ilhas CpGs foram identificadas nas regiões promotoras dos genes marcadores de diferenciação do testículo *DMRT1*, *AMH* e *SOX9* utilizando o Programa MethPrimers, e uma rede de interação gênica foi construída utilizando o software STRING v10. No estágio HH32, houve aumento na expressão dos genes *TET1* e *TET3*. Já os genes *DNMT3B* e *TET2* apresentaram aumento significativo nos estágios finais HH41 e HH45. O gene *DNMT1* apresentou expressão significativa no início, meio e fim da diferenciação testicular.

Nossos resultados sugerem que os genes analisados desempenham um papel relevante na regulação epigenética ao longo do desenvolvimento do testículo, e poderão contribuir com informações significativas sobre esse processo para aves. Nossas análises mostraram evidências de ilhas CpGs nas regiões promotoras dos genes *DMRT1*, *AMH* e *SOX9*, e a rede de interação gênica sugere uma forte ligação entre eles.

Palavras-chave: Metilação do DNA, Regulação epigenética, Desenvolvimento do testículo.

ABSTRACT

Sousa, Anaíde Silva. 2022. **Role of DNA methyltransferase and DNA demethylase in testis development.** 70p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Sexual development is a complex process that involves many factors, especially genetic and environmental. Understanding testicular development in birds during embryogenesis is important for improving knowledge in diverse areas, from human sexual development to species conservation. DNA methylation is an important epigenetic mechanism involved in the regulation of gene expression and is involved in gonadogenesis. In mammals, the timing of testis epigenetic regulation has been described after sex determination, but it is not yet known how epigenetic enzymes act in this process. Chicken is a good model for studying genes involved in epigenetic reprogramming during testis development. Our objective was to investigate the expression of genes responsible for DNA methylation and demethylation in different stages of testis development in *Gallus Gallus domesticus* male embryos, as well as to identify possible regulatory regions of DNA methylation in genes involved in testicular differentiation. Fertilized chicken eggs were analyzed, and testes samples were collected from chicken embryos during different stages of gonadal development (HH32, HH35, HH38, HH41, and HH45). Total RNA was isolated for further cDNA synthesis. The expression of six target genes, three genes that encode DNA methyltransferases (*DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B*) and three genes that encode DNA demethylases Ten-eleven-translocation (*TET1*, *TET2* and *TET3*), was assessed by RT-qPCR using SYBR™ Green system. We used *β-actina* and *Ribosomal Protein L5* as reference genes. Then, CpGs islands were identified in the promoter regions of the *DMRT1*, *AMH* and *SOX9* genes using the MethPrimers Program, and a gene interaction network was built using the STRING v10 software. In stage HH32, there was an increase in the expression of the *TET1* and *TET3* genes. The *DNMT3B* and *TET2* genes showed a significant increase in the final stages HH41 and HH45. The *DNMT1* gene showed significant expression at the beginning, middle and end of testicular differentiation. Our results suggest that the analyzed genes play an important role in epigenetic regulation throughout testis development and may contribute with significant information about this process for birds. Our analyzes showed evidence of

CpG islands in the promoter regions of *DMRT1*, *AMH* and *SOX9* genes, and the gene interaction network suggests a strong link between them.

Keywords: DNA methylation, Epigenetic regulation, Testis development.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

5-caC	5-carboxilcitosina
5-fC	5-formilcitosina
5-hmC	5-hicroximelticitosina
5-mC	5-metilcitosina
<i>aa</i>	<i>Amino acids</i>
a.C.	Antes de Cristo
<i>AMH</i>	<i>Anti-Mullerian Hormone</i>
<i>CASI</i>	<i>Cell Autonomous Sex Identity</i>
<i>cDNA</i>	<i>complementary DNA</i>
<i>CHD</i>	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein</i>
PGCs	Células Germinativas Primordiais
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
<i>DMRT1</i>	<i>Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>DNMT</i>	DNA metiltransferase
<i>DNMT1</i>	DNA metiltransferase 1
<i>DNMT3A</i>	DNA metiltransferase 3 alfa
<i>DNMT3B</i>	DNA metiltransferase 3 beta
dpc	Dia pós coito
E	<i>Embryonic day</i>
<i>FOXL2</i>	<i>Forkhead box protein L2</i>
<i>GFP</i>	<i>Green fluorescent protein</i>
<i>HEMGN</i>	<i>Hemogen</i>
HH	Estágios de Hamburger e Hamilton
lncRNA	<i>Long non coding RNA</i>
MHM	Região “ <i>Male Hypermethylated</i> ”
<i>ncRNA</i>	RNAs não codificantes

<i>pb</i>	Par de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	<i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
<i>RPL5</i>	<i>Ribosomal Protein L5</i>
<i>SOX9</i>	<i>SRY-box 9</i>
<i>TET</i>	<i>Ten-eleven translocation</i>
<i>TET1</i>	<i>Ten-eleven translocation 1</i>
<i>TET2</i>	<i>Ten-eleven translocation 2</i>
<i>TET3</i>	<i>Ten-eleven translocation 3</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação de alguns estágios do desenvolvimento do embrião de galinha, descritos por Hamburguer e Hamilton. Fonte: Modificado de (CHEN *et al.*, 2021). 18
- Figura 2 – Esquema do desenvolvimento gonadal em galinha. Após a determinação do sexo, as gônadas bipotentes dos embriões ZZ se diferenciam em testículos bilaterais, enquanto os embriões ZW desenvolvem gônadas assimétricas. Fonte: Modificado de (KUROIWA, 2017). 21
- Figura 3 - Visão esquemática dos cromossomos sexuais de galinhas e genes envolvidos na determinação do sexo. Cromossomo Z (82,3 Mb) em azul e cromossomo W (7 Mb) em rosa. Galinhas machos (ZZ) têm duas cópias de DMRT1 e HEMGN, enquanto a fêmea (ZW) tem apenas uma. O locus MHM é transcrito no cromossomo Z na fêmea e pode desempenhar um papel na dosagem local e na regulação epigenética de DMRT1 na fêmea. Fonte: Modificado de (HIRST; MAJOR; SMITH, 2018). 23
- Figura 4 - Mecanismos moleculares implícitos na diferenciação gonadal do embrião de galinha. Fonte: Modificado de KUROIWA, 2017). 24
- Figura 5 – Vias de metilação do DNA. (a) DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pela metilação de novo e transferem grupos metil (vermelho) para o DNA hemimetilado. (b) DNMT1 é responsável pela manutenção do padrão de metilação do DNA durante a replicação. Fonte: Modificado de (MOORE; LE; FAN, 2013). 32
- Figura 6 – Estágios de desenvolvimento do testículo em embriões de *Gallus gallus domesticus*, entre os estágios HH32 e HH45 de acordo com os critérios de Hamburger e Hamilton (HH). R: Right (direito); L: Left (esquerdo). Fonte: Marchesi, 2021. 37
- Figura 7 - Expressão dos genes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 e TET3 no testículo entre os estágios de desenvolvimento HH32 a HH45. GD: Gônada direita; GE: Gônada esquerda. * Diferença significativa do valor de $p < 0,05$; ** Diferença significativa do valor de $p < 0,01$; *** Diferença significativa do valor de $p < 0,001$; **** Diferença significativa do valor de $p < 0,0001$ 39

Figura 8 - Mapa das ilhas CpGs previstas na região promotora do gene DMRT1 transcrito 201, DMRT1 transcrito 202, AMH e SOX9 de galinha. Fonte: Retirado de <http://www.urogene.org/methprimer2/>.51

Figura 9 – Interação dos genes responsáveis pelos fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento do testículo. A espessura das linhas representa a força do suporte de dados. Disponível em: <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?taskId=bNRpY9ogRk3o&sessionId=b7XkD6S6EFZn>.52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes, sequências e eficiência dos primers usados.	36
Tabela 2 - Valores de p de cada gene e estágio de desenvolvimento analisado.	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. HIPÓTESE.....	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVO GERAL.....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4. CAPÍTULO 1 – Regulação epigenética durante o desenvolvimento testicular em galinhas.....	30
4.1. INTRODUÇÃO	31
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.2.1. COMITÊ DE ÉTICA.....	34
4.2.2. COLETA DO MATERIAL.....	34
4.2.3. EXTRAÇÃO DE DNA E SEXAGEM	34
4.2.4. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA	35
4.2.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	35
4.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4.3. RESULTADOS	37
4.3.1. COLETA DO MATERIAL.....	37
4.3.2. SEXAGEM DOS EMBRIÕES	38
4.3.3. EXPRESSÃO GÊNICA	38
4.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4.4. DISCUSSÃO	41
4.5. CONCLUSÃO.....	45
5. CAPÍTULO 2 – Análise preditiva de Ilhas CpGs em promotores de genes envolvidos na diferenciação testicular de aves	46
5.1. INTRODUÇÃO	47
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
5.1.1. ANÁLISE DE ILHAS CpGs	49
5.1.2. ANÁLISE DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO	49
5.1.3. INTERAÇÃO GÊNICA	49
5.3. RESULTADOS	50
5.3.1. PESQUISA DE ILHAS CpGs	50
5.3.2. ANÁLISE DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO	51
5.3.3. REDE DE INTERAÇÃO GÊNICA	52

5.4. DISCUSSÃO	53
5.5. CONCLUSÃO.....	56
6. CONCLUSÕES FINAIS.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética	69
ANEXO B – Certificado de Qualidade em Biossegurança	70

1.INTRODUÇÃO

A galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) tem uma longa e distinta história como um importante modelo de estudo em biologia do desenvolvimento de vertebrados (STERN, 2005). O ovo de galinha é uma fonte acessível de embriões, que vem atraindo o interesse de estudiosos desde a antiguidade. O desenvolvimento embrionário é um processo complexo, que fascina o homem desde o início da história (STERN, 2005). Os primeiros relatos do uso da galinha doméstica se deram há 1.400aC, quando os antigos egípcios incubavam ovos artificialmente para sua própria alimentação. Outro relato marcante ocorreu por volta de 350aC, quando Aristóteles observou os diferentes estágios de incubação a fim de acompanhar a progressão do desenvolvimento do pintainho, e ao final propôs a teoria da epigênese (STERN, 2004; WOLPERT, 2004). Até meados do século 19, as observações de embriões de galinha em diferentes estágios foram usadas para apoiar duas teorias de intenso debate: a pré-formação, que diz que o adulto é pré-formado em miniatura desde o momento da fertilização, e apenas cresce; e a teoria da epigênese, que apoia a ideia de que o embrião aumenta em complexidade e novos órgãos se formam à medida que se desenvolve (WOLPERT, 2004).

Em 1951, Viktor Hamburger e Howard Hamilton publicaram uma série descrevendo os estágios normais de desenvolvimento do embrião de galinha, na qual enumeraram e descreveram as características dos diferentes estágios associados a uma linha do tempo do desenvolvimento (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Os 46 estágios descritos passaram a ser conhecidos como estágios Hamburger e Hamilton (HH) (Figura 1), e essa designação é usada rotineiramente em estudos de biologia do desenvolvimento envolvendo embriões de galinha. Descrições detalhadas de morfogênese, baixo custo, acessibilidade, facilidade de manipulação e otimização de técnicas de engenharia genética tornaram os embriões de galinha um modelo robusto para estudar o desenvolvimento (VILCHES-MOURE, 2019).

O genoma da galinha (*G. gallus*) apresenta cerca de um terço do tamanho do genoma humano, com 60% dos genes tendo um único ortólogo humano (BURT, 2005). O organismo modelo contribuiu para avanços nas áreas de virologia, imunologia, oncologia, regulação epigenética da expressão gênica e biologia da conservação (BEACON; DAVIE, 2021). O advento da edição genética produziu uma nova onda de galinhas que estão acelerando ainda mais sua aplicação na pesquisa biomédica (LEE; KIM; LEE, 2020). Como consequência, a galinha e, especialmente, o seu embrião têm tido uma enorme influência na fisiologia do desenvolvimento, não

só para a compreensão dos processos básicos do desenvolvimento fisiológico, mas também na tarefa de entender os distúrbios humanos. Em um levantamento realizado em 2021, a galinha doméstica foi o terceiro modelo de estudo mais citado no Pubmed (FLORES-SANTIN; BURGGREN, 2021).

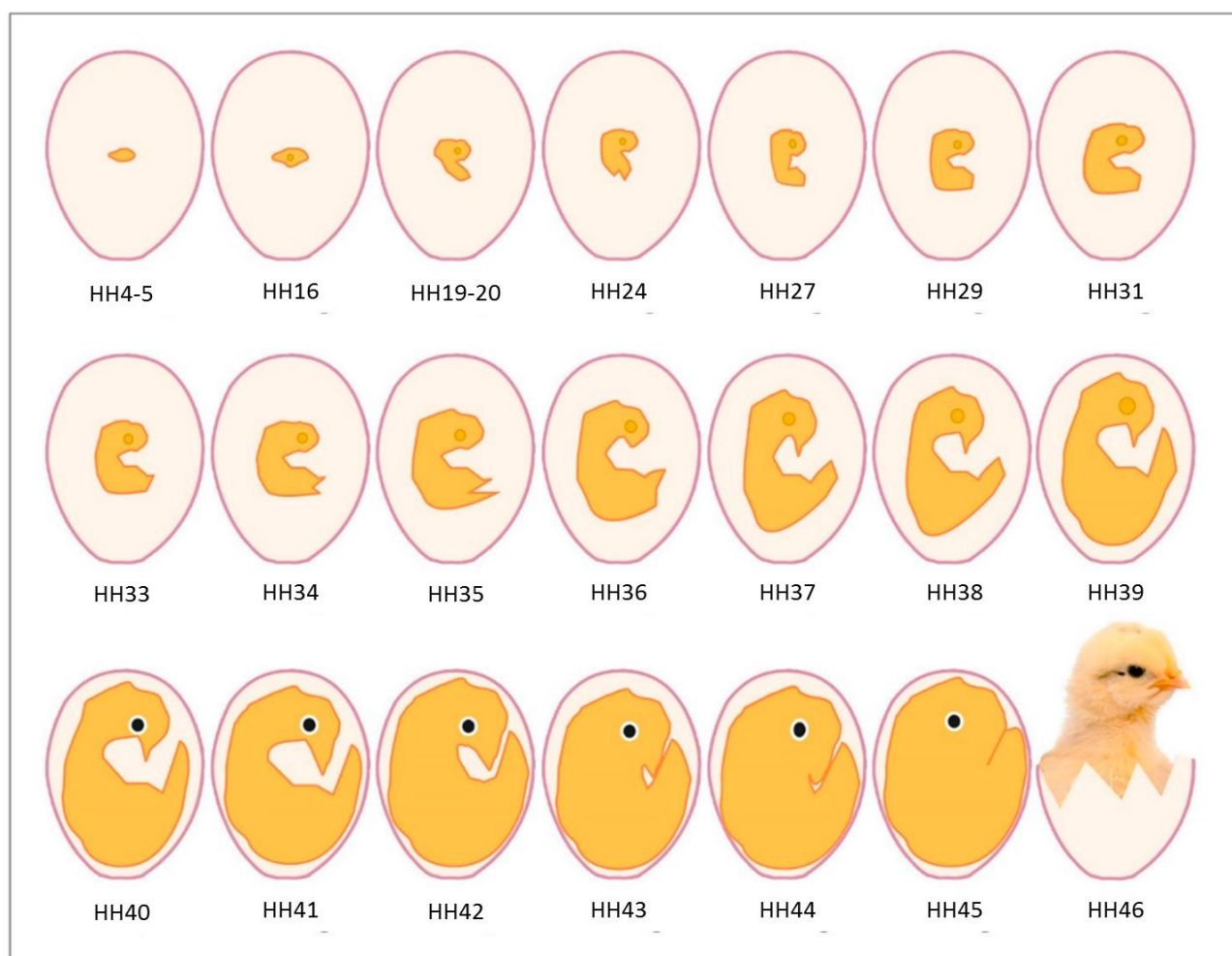


Figura 1 – Representação de alguns estágios do desenvolvimento do embrião de galinha, descritos por Hamburger e Hamilton. Fonte: Modificado de (CHEN *et al.*, 2021).

Nos animais, as gônadas são fundamentais para a reprodução. Entre os vertebrados, a morfologia gonadal está profundamente conservada, como esperado para órgãos essenciais para a propagação da espécie. Os testículos dos machos abrigam a linha germinativa masculina e secretam andrógenos que contribuem para a masculinização (ESTERMANN; MAJOR; SMITH, 2021). A diferenciação sexual da

gônada parece ser altamente conservada, e muitos dos importantes fatores de sinalização envolvidos no desenvolvimento do ovário ou testículo em mamíferos também estão implicados em aves (CHUE; SMITH, 2011).

O embrião de galinha é um modelo instrutivo para o desenvolvimento gonadal. Devido à conservação da morfologia do testículo, estudos em embriões de galinha lançaram luz sobre o desenvolvimento do testículo humano e seus distúrbios (CHUE; SMITH, 2011; MAJOR *et al.*, 2019). Além disso, a galinha é um modelo de estudo que permite análises funcionais rápidas de genes gonadais durante o desenvolvimento, algo que não é viável em mamíferos. Embriões podem facilmente serem acessados *in ovo*, manipulados geneticamente e fenótipos gonadais podem ser observados dentro de poucos dias (HIRST *et al.*, 2017; IOANNIDIS *et al.*, 2021; YOSHINO; MURAI; SAITO, 2016).

Nos mamíferos, o sexo do embrião é estabelecido na fertilização com a herança de um cromossomo X ou Y do pai. No entanto, o processo de determinação sexual é acionado apenas durante o período de organogênese, quando as gônadas se desenvolvem (SWAIN; LOVELL-BADGE, 1999). O cromossomo Y, através do gene *Sry* (*Sex-determining region Y*), testículo determinante, atua de forma dominante para desencadear a diferenciação dos testículos a partir das gônadas indiferenciadas (ou cristas genitais) (SINCLAIR *et al.*, 1990; SMITH; SMITH; SINCLAIR, 1999).

Em humanos, machos e fêmeas têm 22 pares de cromossomos autossômicos, mas diferem em seus cromossomos sexuais. As fêmeas em humano têm dois cromossomos X (46, XX), enquanto os machos têm um cromossomo X e um Y (46, XY) (QUINN; KOOPMAN, 2012). No início da gestação (entre primeira e segunda semana), os embriões dos dois sexos se diferem apenas por seus cromossomos sexuais. O primeiro sinal visível de dimorfismo sexual em embriões de mamíferos é quando a gônada bipotente começa a se desenvolver em testículo ou ovário em indivíduos XY e XX, respectivamente. Esta decisão é tomada por volta da sexta semana de desenvolvimento em humano. A diferenciação das gônadas leva à produção de hormônios testiculares e ovarianos e subsequente indução de diferenças anatômicas e fisiológicas (EGGERS; SINCLAIR, 2012; SWAIN; LOVELL-BADGE, 1999; WILHELM; YANG; THOMAS, 2013).

Assim como nos mamíferos, a determinação do sexo em aves é influenciada pela herança de cromossomos sexuais. No entanto, as aves apresentam um par de cromossomos diferente dos mamíferos, designados Z e W. Em todas as aves normais

ambos os sexos são diploides, e o macho é o sexo homogamético ZZ, enquanto a fêmea é o sexo heterogamético ZW (NANDA *et al.*, 2008). O cromossomo Z na maioria das aves é grande e rico em genes, (semelhante ao cromossomo X dos mamíferos), enquanto o cromossomo W é geralmente pequeno e bastante heterocromático (semelhante ao cromossomo Y dos mamíferos). O cromossomo Z tem cerca de 82 Mb e é altamente conservado entre as aves (BELLOTT *et al.*, 2010; NANDA *et al.*, 2008; SHETTY; GRIFFIN; GRAVES, 1999). Ele abriga mais de 1.000 genes, e vários são expressos em testículos (ELLEGEN, 2011). Em contrapartida, o cromossomo W é geralmente menor (7Mb) e não apresenta muitos genes descritos. Estima-se que apenas 4% do cromossomo W foi mapeado (BELLOTT *et al.*, 2017; SMEDS *et al.*, 2015).

O processo de desenvolvimento do aparelho urogenital em galinhas é semelhante ao de outros amniotas. Em termos de morfologia, as aves parecem estar em conformidade com o padrão dos mamíferos: embriões machos e fêmeas são sexualmente indistinguíveis (gônada bipotente) até por volta dos dias cinco e seis de incubação (HH28-29) (Figura 2), quando acredita-se que a ação de um gene fator determinante do sexo inicie o desenvolvimento do testículo ou ovário (CHUE; SMITH, 2011; SMITH; SINCLAIR, 2001). Como nos mamíferos, as células de Sertoli representam a primeira linhagem testicular a se diferenciar no testículo do galo, expressando os marcadores *DMRT1*, *AMH* e *SOX9* (CHUE; SMITH, 2011; LAMBETH *et al.*, 2014).

Alguns genes localizados nos cromossomos sexuais influenciam a diferenciação gonadal e o desenvolvimento durante a embriogênese (KUROIWA, 2018). No entanto, em aves, não apenas a identidade do suposto gene de determinação do sexo é desconhecida, como a natureza do mecanismo de determinação do sexo não foi bem estabelecida. As teorias atuais de determinação do sexo em aves propõem a presença de um gene determinante do ovário (ou inibidor da diferenciação testicular) no cromossomo W e um mecanismo de dosagem de genes baseado no número de cromossomos Z (as fêmeas têm um cromossomo sexual Z e um W, enquanto os machos têm dois cromossomos Z cromossomos sexuais) (HIRST; MAJOR; SMITH, 2018; KUROIWA, 2018).

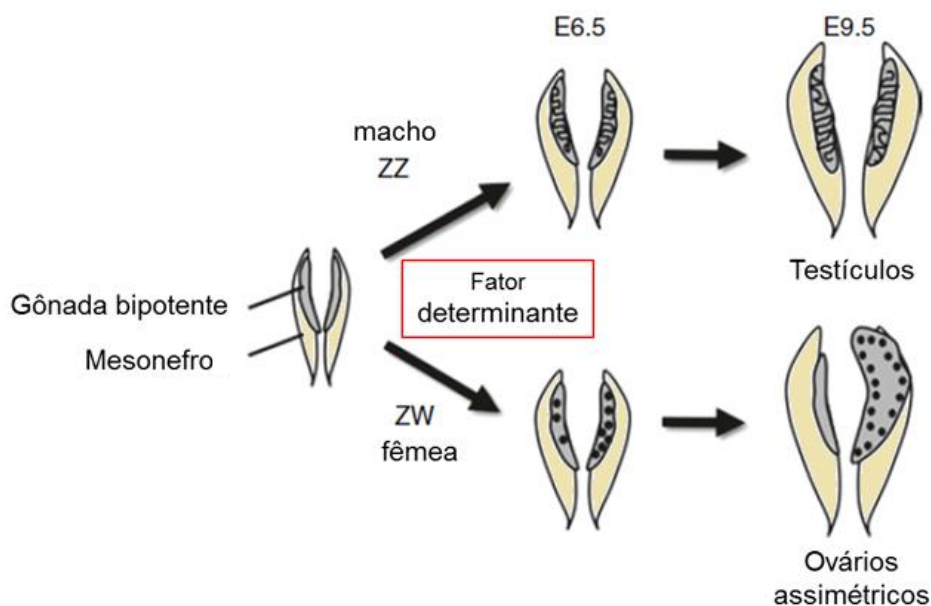


Figura 2 – Esquema do desenvolvimento gonadal em galinha. Após a determinação do sexo, as gônadas bipotentes dos embriões ZZ se diferenciam em testículos bilaterais, enquanto os embriões ZW desenvolvem gônadas assimétricas. Fonte: Modificado de (KUROIWA, 2017).

Nossa compreensão da determinação do sexo das aves e do desenvolvimento gonadal deriva principalmente dos estudos em galinhas. A incidência de galinhas ginandromorfas, sugere que o fenótipo sexual é parcialmente autônomo nas células, nas gônadas e em todo embrião (CLINTON *et al.*, 2012; HIRST; MAJOR; SMITH, 2018; ZHAO *et al.*, 2010). Os ginandromorfos são organismos quimeras sexuais, que apresentam características femininas e masculinas. Essas aves são raras, e já foram relatadas em galinhas e algumas outras aves. Nos exemplares de galinhas ginandromorfas já descritos, o lado “masculino” do corpo era predominantemente composto por células ZZ, enquanto o lado “feminino” era composto por células ZW (CLINTON *et al.*, 2012; MAJOR; SMITH, 2016; MORRIS *et al.*, 2018).

Zhao e colaboradores (2010) enxertaram células gonadais da mesoderme presuntiva marcadas com *GFP* de um embrião macho (ZZ), no ovário de um embrião fêmea no estágio HH14, e observaram que as células se diferenciaram em células de Sertoli (linhagem de suporte masculino), mesmo estando em um ambiente ovariano. Da mesma forma, quando as células *GFP* da fêmea foram enxertadas em um embrião macho, essas células marcadas seguiram seu destino e se diferenciaram em ovário (ZHAO *et al.*, 2010). Posteriormente, Clinton e colaboradores (2012) propuseram que o surgimento dos ginandromorfos pode ser explicado pelos efeitos genéticos dos

cromossomos sexuais em cada célula, cunhando o termo “*Cell Autonomous Sex Identity*” (CASI) (CLINTON *et al.*, 2012).

Embora atualmente já se tenha conhecimento dos fatores associados à determinação sexual em mamíferos, este mecanismo permanece um enigma no grupo das aves. Ao contrário de mamíferos, que inativam um cromossomo X de forma aleatória nas fêmeas (HEARD, 2004), as aves apresentam compensação de dose apenas em algumas regiões específicas do cromossomo Z, como é o caso do locus MHM (MELAMED; ARNOLD, 2007). Como resultado, os machos apresentam em média o dobro da expressão de genes ligados ao Z em comparação com as fêmeas (BIRCHLER, 2009; GRAVES, 2014; MELAMED; ARNOLD, 2007; WADDINGTON, 1942). Atualmente, o melhor candidato para um gene determinante de testículo durante o desenvolvimento embrionário em aves é o *DMRT1* (*Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1*). Este gene ligado ao Z apresenta expressão restrita às gônadas, com maior expressão nos testículos, e já foi demonstrado que a repressão dos níveis de *DMRT1* em embriões masculinos tem um efeito 'feminizante' no desenvolvimento do testículo (SMITH *et al.*, 2009).

Alguns genes que mostram compensação de dose em galinhas ficam concentrados em uma região do braço curto do cromossomo Z, próximo ao locus ligado ao Z denominado MHM (*Male Hypermethylated*) (MELAMED; ARNOLD, 2007). Esta região é controlada pela metilação do DNA, um mecanismo epigenético de extrema importância na regulação da expressão gênica. A região MHM é hipermetilada nos dois cromossomos ZZ do macho e o gene não é transcrito. Em células femininas (ZW), o locus MHM é hipometilado no cromossomo Z e é transcrito em um *long noncoding RNA* (lncRNA), que reveste o cromossomo Z próximo ao seu sítio transcricional (Figura 3) (TERANISHI *et al.*, 2001).

A região MHM é semelhante ao *lncRNA Xist* de mamíferos, que medeia a inativação do cromossomo X (BRIGGS; REIJO PERA, 2014). No entanto, enquanto *Xist* atua regulando a inativação do cromossomo X, o *lncRNA MHM* atua em um cromossomo Z “ativo”. Portanto, essas observações levaram à hipótese de que *MHM* desempenha um papel na compensação da dosagem local, elevando a expressão de genes ligados ao Z em fêmeas a níveis comparáveis aos dos machos (ITO; KAMPF; ARNOLD, 2011; TERANISHI *et al.*, 2001). O gene *DMTR1*, provável principal gene determinante do testículo em aves, está localizado muito próximo ao sítio de ligação do *MHM* (Figura 3), e também foi hipotetizado que o *lncRNA MHM* poderia funcionar

para diminuir a expressão do *DMRT1* em embriões fêmea, contribuindo assim para a determinação do sexo na galinha (ROESZLER *et al.*, 2012).

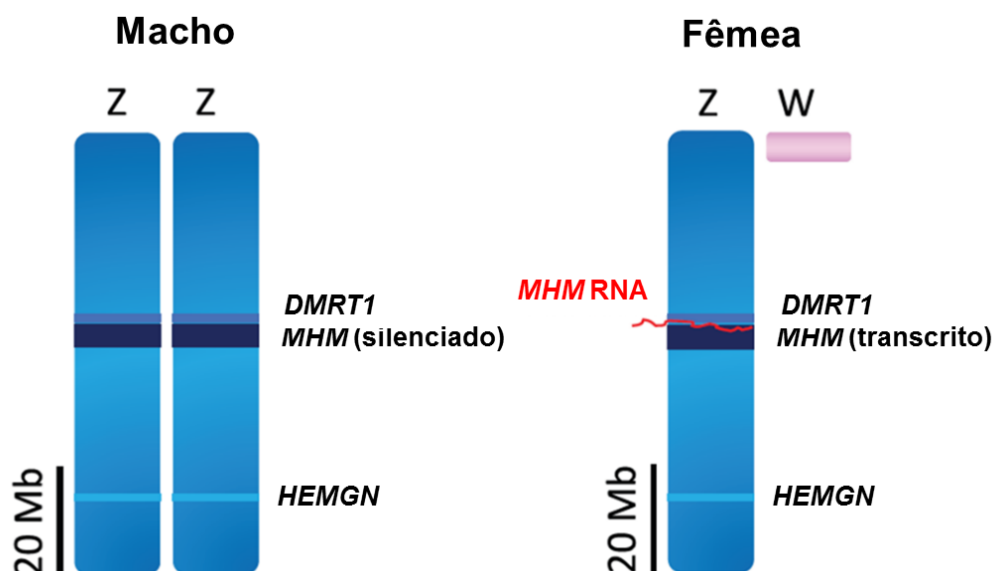


Figura 3 - Visão esquemática dos cromossomos sexuais de galinhas e genes envolvidos na determinação do sexo. Cromossomo Z (82,3 Mb) em azul e cromossomo W (7 Mb) em rosa. Galinhas machos (ZZ) têm duas cópias de *DMRT1* e *HEMGN*, enquanto a fêmea (ZW) tem apenas uma. O locus *MHM* é transcrito no cromossomo Z na fêmea e pode desempenhar um papel na dosagem local e na regulação epigenética de *DMRT1* na fêmea. Fonte: Modificado de (HIRST; MAJOR; SMITH, 2018).

Os genes *DMRT1* e *HEMGN* (ligados ao Z) são expressos nas gônadas e já foram relacionados ao desenvolvimento dos testículos em aves (NAKATA *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2009). O gene *DMRT1* é expresso na linhagem celular de suporte de ambos os sexos (células pré-Sertoli em machos, e células pré-granulosa em fêmeas) das gônadas embrionárias de galinha. No entanto, é sempre mais expresso em células ZZ, o que poderia refletir a falta de inativação global do cromossomo Z (NANDA *et al.*, 2008). Essa diferença inicial na expressão de *DMRT1* entre os sexos é suficiente para induzir a formação dos testículos, uma vez que a expressão elevada de *DMRT1* ativa *SOX9* e *AMH*, e antagoniza o eixo *FOXL2*-Aromatase, que resultaria na diferenciação ovariana (Figura 4).

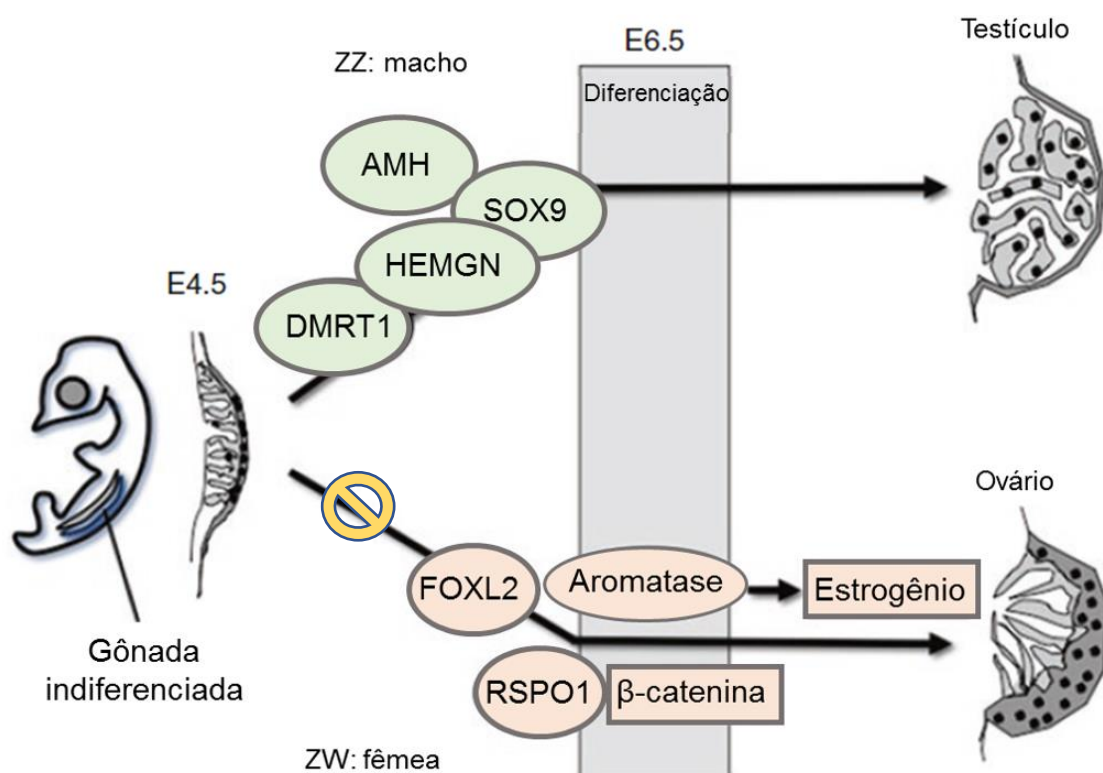


Figura 4 - Mecanismos moleculares implícitos na diferenciação gonadal do embrião de galinha. Fonte: Modificado de KUROIWA, 2017).

As células germinativas primordiais (PGCs) são a primeira população de células germinativas a se formar, e podem dar origem aos ovários ou testículos (TAGAMI; MIYAHARA; NAKAMURA, 2017). Em galinhas, o sistema urogenital embrionário surge do mesoderma intermediário, e o primeiro sinal histológico da formação das gônadas é a emergência da crista genital, um espessamento do epitélio celômico ventral ao mesonévro. Isso ocorre entre os dias embrionários (E) 3,5 e 4,5, correspondendo aos estágios (HH) 21-25 (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). As PGCs migram através da corrente sanguínea para as gônadas e começam a se multiplicar (GINSBURG; EYAL-GILADI, 1987; TAGAMI; MIYAHARA; NAKAMURA, 2017). Os testículos de aves adultas compreendem os túbulos seminíferos que abrigam células germinativas e células de Sertoli, circundadas por células de Leydig esteroidogênicas (COOKSEY; ROTHWELL, 1973).

Os testículos apresentam duas funções principais: síntese de testosterona e produção de esperma (SHALET, 2009). Nas aves, estão localizados no interior da cavidade abdominal, portanto, a espermatogênese progride a uma temperatura igual

ou ligeiramente acima de 37°C (MFOUNDU *et al.*, 2022). O testículo aviário cresce substancialmente entre a eclosão e a maturação sexual, quando o sêmen é produzido e as aves copulam. Em algumas espécies, os testículos aumentam de tamanho em mais de 50% durante a época de reprodução, controlados pelo eixo hipotálamo-hipófise (LESKA; DUSZA, 2007).

No contexto de desenvolvimento, onde muitos genes devem ser ativos ou inativos de forma espacial e temporal específica (BARRIONUEVO *et al.*, 2012), os mecanismos epigenéticos para a regulação da expressão gênica tornam-se de importância crítica. Em mamíferos já foram descritos mecanismos epigenéticos atuando na regulação da expressão gênica após a determinação do sexo. Nos últimos anos, foi visto que além da compensação de dose, o processo de determinação sexual nas galinhas também pode ser influenciado por mecanismos epigenéticos (CAETANO *et al.*, 2014; ROESZLER *et al.*, 2012). Diante da participação desses mecanismos durante a gonadogênese, decidimos explorar a atuação da maquinaria epigenética no desenvolvimento testicular. Inicialmente analisamos algumas enzimas envolvidas na metilação e desmetilação do DNA ao longo do desenvolvimento do testículo. Posteriormente, exploramos as regiões promotoras de alguns genes envolvidos na diferenciação do testículo e fatores de transcrição associados ao processo.

2.HIPÓTESE

Assim como em mamíferos, as aves apresentam expressão diferencial de genes envolvidos na regulação epigenética durante o desenvolvimento do testículo.

[OBJ]

3.OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Compreender a atuação de genes envolvidos na maquinaria de metilação e desmetilação do DNA durante o desenvolvimento dos testículos de galos;

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2* e *TET3* em diferentes estágios do desenvolvimento gonadal de embriões macho de galinha;

Identificar fases do desenvolvimento testicular importantes para a reprogramação epigenética do testículo;

Identificar ilhas CpGs na região reguladora dos genes envolvidos diretamente no processo de desenvolvimento do testículo;

Elaborar uma rede de interação dos principais genes (*in silico*) envolvidos no desenvolvimento testicular de galinha.

4.CAPÍTULO 1 – Regulação epigenética durante o desenvolvimento testicular em galinhas

4.1. INTRODUÇÃO

A epigenética desempenha um papel importante na regulação de vários processos biológicos. Os mecanismos epigenéticos mais comuns que regulam a expressão gênica compreendem a metilação do DNA, modificações pós-transcricionais na cauda das histonas e alguns RNAs não codificadores (ncRNA) (KIM; SAMARANAYAKE; PRADHAN, 2009; TAFT *et al.*, 2010). Os mecanismos epigenéticos fornecem aos organismos a capacidade de modificar a atividade de seus genes em resposta a mudanças no ambiente interno ou externo, integrando informações genômicas e ambientais para gerar um fenótipo (TURNER, 2009).

A metilação do DNA é uma modificação epigenética chave nos genomas dos vertebrados, conhecida por estar envolvida em processos biológicos importantes, e é o mecanismo mais estudado envolvido na regulação da expressão gênica (VARRIALE, 2014). Essa modificação consiste na adição de um radical metil ao carbono 5' da base nitrogenada citosina (5-metilcitosina) (KIM; SAMARANAYAKE; PRADHAN, 2009). As características mais importantes dos mecanismos epigenéticos é a reversibilidade e a flexibilidade, facilitadas pelas atividades enzimáticas opostas que modificam a cromatina (por exemplo, DNA metiltransferase versus DNA desmetilase) (REIK, 2007).

Já foram relatadas algumas enzimas que atuam na inserção e remoção das marcas epigenéticas, são elas as DNA metiltransferases, DNA desmetilases, Histona metiltransferases e Histona deacetilases (HAN *et al.*, 2019). As enzimas DNA metiltransferases estão diretamente envolvidas na metilação do DNA e, em mamíferos, foram reportados dois tipos de atividade de DNA metiltransferase: metilação *de novo* e manutenção da metilação. A atividade da metiltransferase do tipo *de novo* contribui para o estabelecimento de novos padrões de metilação do DNA. DNMT3A (DNA metiltransferase 3 alfa) e DNMT3B (DNA metiltransferase 3 beta) são as principais enzimas para estabelecer a metilação *de novo* do DNA no desenvolvimento embrionário e durante a gametogênese, enquanto DNMT1 (DNA metiltransferase 1) atua contribuindo para a manutenção dos padrões de metilação durante a replicação do DNA (Figura 5) (LI; ZHANG, 2014; MORGAN *et al.*, 2005; OKANO *et al.*, 1999; REIK; DEAN; WALTER, 2001).

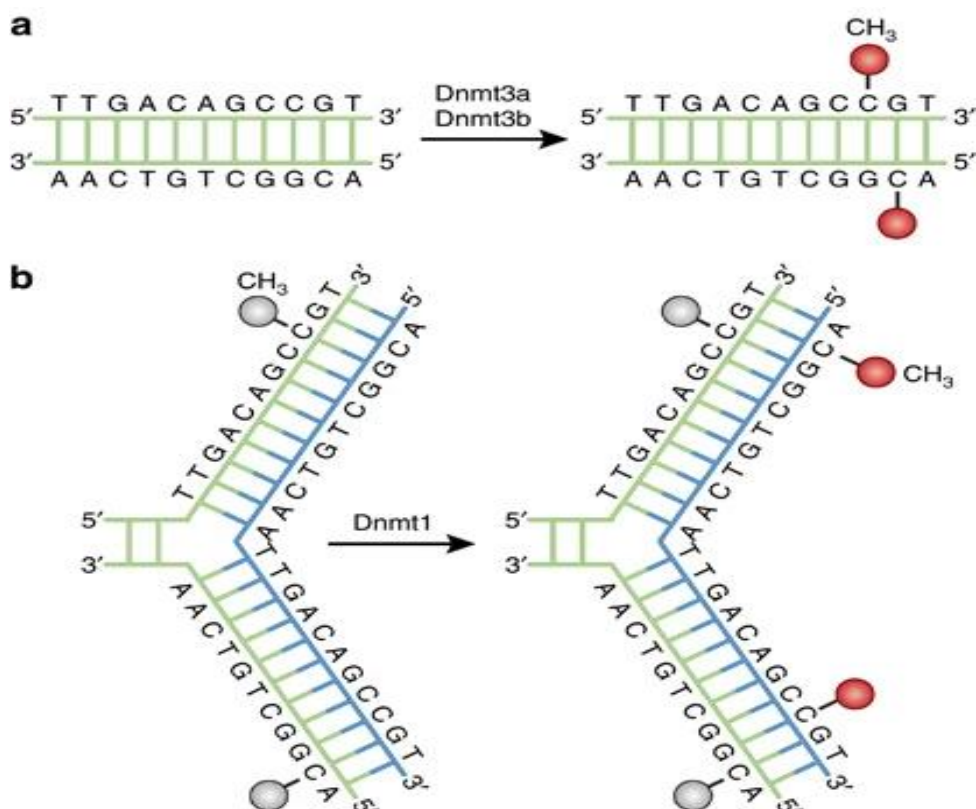


Figura 5 – Vias de metilação do DNA. (a) *DNMT3A* e *DNMT3B* são responsáveis pela metilação *de novo* e transferem grupos metil (vermelho) para o DNA hemi-metilado. (b) *DNMT1* é responsável pela manutenção do padrão de metilação do DNA durante a replicação. Fonte: Modificado de (MOORE; LE; FAN, 2013).

Estudos indicam que a metilação do DNA pode ser revertida através da desmetilação passiva durante as divisões celulares, ou desmetilação ativa mediada pela família de enzimas TETs (*Ten eleven translocation*), um tipo de DNA desmetilase. (WU; ZHANG, 2017). As TETs desempenham função de oxidar sucessivamente 5mC para 5-hidrometilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC), seguida por diluição dependente da replicação (HE *et al.*, 2011; ITO *et al.*, 2011). Enzimas TET e derivados oxidados de 5mC desempenham papéis importantes em vários processos biológicos e patológicos, incluindo a regulação da desmetilação do DNA, transcrição de genes, desenvolvimento embrionário e oncogênese (WU; ZHANG, 2017; YIN; XU, 2016).

Mecanismos epigenéticos são fundamentais para garantir o desenvolvimento gonadal normal e a espermatogênese em mamíferos (CARRELL, 2012; RAJENDER; AVERY; AGARWAL, 2011). Existem dois períodos do desenvolvimento nos quais a metilação do DNA é extensamente modificada: durante a gametogênese e após a

fertilização, no embrião pré-implantação (REIK; DEAN; WALTER, 2001). Inicialmente, as marcas de metilação são apagadas nas células PGCs, e posteriormente são reestabelecidas nos gametas durante a maturação. A segunda reprogramação ocorre no início do desenvolvimento embrionário, logo após a fertilização, momento no qual as marcas epigenéticas presentes nos gametas são apagadas na maior parte do genoma por um novo evento de desmetilação, e novas marcas são estabelecidas em seguida (LEPIKHOV *et al.*, 2012; MORGAN *et al.*, 2005; REIK; DEAN; WALTER, 2001). A remoção da metilação do DNA ocorre durante a migração das células PGCs para a crista genital e gônadas, e então a metilação é iniciada durante os primeiros eventos de determinação do sexo (ALLEGRUCCI *et al.*, 2005).

Ainda existe uma lacuna quando se trata do entendimento de como as enzimas envolvidas na metilação e desmetilação do DNA atuam durante a gonadogênese. O padrão de expressão de genes *DNMTs* e *TETs* durante o desenvolvimento da linhagem germinativa masculina não foi suficientemente estabelecido tanto em mamíferos quanto em aves. Neste estudo exploramos a expressão dos genes envolvidas nas vias de metilação e desmetilação do DNA durante o desenvolvimento do testículo de embriões de *Gallus gallus domesticus*.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. COMITÊ DE ÉTICA

Os experimentos com animais foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (processo nº 075/2007 – Anexo A) e Comissão Interna de Biossegurança (processo nº CBQ-FMRP: 0030/97 -08.49. I – Anexo B) para o uso de animais em pesquisas.

4.2.2. COLETA DO MATERIAL

Os experimentos foram realizados utilizando ovos fertilizados de galinhas de uma única linhagem White Leghorn (*Gallus gallus domesticus*). Os ovos foram mantidos em incubadora umidificada a 37,7°C. As amostras de testículo foram coletadas dos embriões de galinha em diferentes estágios de desenvolvimento, seguindo a classificação de Hamburger e Hamilton (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Os estágios coletados foram: HH32 (E7,5 dia de desenvolvimento), HH35 (5-9 dia), HH38 (E12), HH41 (E15) e HH45 (E19). Em cada um desses dias de desenvolvimento os embriões foram removidos do ovo, e as amostras de testículos (esquerdo e direito) e músculo peitoral foram retiradas com auxílio de bisturi e armazenados em freezer -80°C.

4.2.3. EXTRAÇÃO DE DNA E SEXAGEM

Para realização da sexagem dos embriões e confirmação do sexo, o DNA genômico foi extraído dos testículos e músculo peitoral utilizando o Kit *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, USA). A sexagem foi realizada através da amplificação do gene *CHD* (*chromodomain helicase DNA binding protein*) utilizando os *primers* P8 (5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3') e P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') conforme descrito por Griffiths e colaboradores (1998). Os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: 10 pmol de cada *primer*, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1X *PCR buffer*, 1 U *Taq DNA polymerase* (Invitrogen, USA), 50-150ng de DNA e 10µL de volume final. A amostra de tecido muscular foi utilizada como controle da reação. As condições de reação incluíram uma etapa inicial de denaturação a 95°C por 5

minutos seguida de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50°C por 45 segundos, 75°C por 45 segundos e 72 °C por 5 min. Os produtos da PCR foram corridos em eletroforese em gel de agarose a 3% contendo brometo de etídio.

4.2.4. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

As amostras congeladas das gônadas embrionárias nos estágios HH32, HH35, HH38, HH41 e HH45 foram maceradas em nitrogênio líquido e submetidas à extração de RNA total utilizando o reagente TRIzol (*Invitrogen*, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Santa Clara, CA, EUA). Amostras com razão 260nm / 280nm superior a 1,8 foram consideradas puras. A integridade do RNA foi confirmada em gel de agarose 1,5% após eletroforese por 90 minutos. O RNA foi tratado com DNase I e a primeira fita de cDNA foi sintetizada usando SuperScript IV First-Strand Synthesis SuperMix (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), com *oligo dT primer*, seguindo as instruções do fabricante.

4.2.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Um total de 6 genes já descritos como envolvidos na regulação epigenética em outros organismos foram escolhidos para análise de expressão gênica (Tabela 1). Utilizamos as sequências dos genes alvos descritas por Marchesi, 2021 (dado não publicado). A expressão gênica foi analisada através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). A reação foi preparada utilizando 2x Power SYBR® Green PCR Master Mix, 0,2 µM de cada primer e 2 µL de cDNA diluído 1:10. As reações para todos os primers seguiram a condição de ciclagem: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 65°C. Um estágio de curva de melt de 60°C a 95°C a 0,3°C/segundo foi adicionado em todas as reações qPCR para verificar sua especificidade. A especificidade de cada primer também foi confirmada em gel de agarose a 1%. Todos os experimentos de RT-qPCR foram realizados em triplicata e os valores do limiar de ciclo médio (Ct) determinados. Os genes *RPL5* (NASCIMENTO *et al.*, 2015) e *β-actina* (CAETANO *et al.*, 2014) foram usados como normalizadores, e o músculo peitoral foi utilizado como amostra de referência. A expressão dos genes analisados foi quantificada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Todas

as reações foram realizadas na máquina *StepOne Plus Real-Time PCR Systems* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Tabela 1 - Genes, sequências e eficiência dos primers usados.

Gene	Sequência	Eficiência
<i>DNA methyltransferase 1 (DNMT1)</i>	F: GTTCTGCTCAAGCTGGTGATG R: CGGTAATAATCGCAGTAACTGAG	98,697
<i>DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3A)</i>	F: AACCACGACCAGGAGTTTGAT R: GTGTTTCTGGGTGACATTTTCG	102,985
<i>DNA methyltransferase 3 beta (DNMT3B)</i>	F: CTTCGAGTTCTACCATCTGCTC R: GATCATAACGGGGTTACACTCC	96,567
<i>Tet methylcytosine dioxygenase 1 (TET1)</i>	F: GCCAAGTGGGTGATACGAAGA R: GCCAAATGAGAACGATGCTCC	102,000
<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2)</i>	F: ATGCAGAACGGGAGTACTACTG R: CGTCTTAACCGGCTCTGCTAA	101,632
<i>Tet methylcytosine dioxygenase 3 (TET3)</i>	F: CATCCAGGTGCTCACATCCTT R: CAACGCCATACCTGCATTCTG	97,754

Fonte: Marchesi, 2021.

4.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinar a significância estatística das diferenças entre as médias e identificar variações durante o desenvolvimento dos testículos nos estágios embrionários avaliados, a análise estatística foi realizada através do teste Two-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tuckey utilizando o software GraphPad Prism versão 9.5.1 para Windows. As diferenças foram consideradas significativas com valores de $p < 0,05$.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. COLETA DO MATERIAL

Foram coletadas amostras de testículo de 20 embriões, sendo 4 embriões por grupo, nos seguintes estágios de desenvolvimento: HH32, HH35, HH38, HH41 e HH45 (Figura 6). Os testículos direito (R) e esquerdo (L) foram coletados, armazenados e analisados em cada estágio. É possível observar que não há grande diferença visual na simetria gonadal durante o desenvolvimento do testículo.

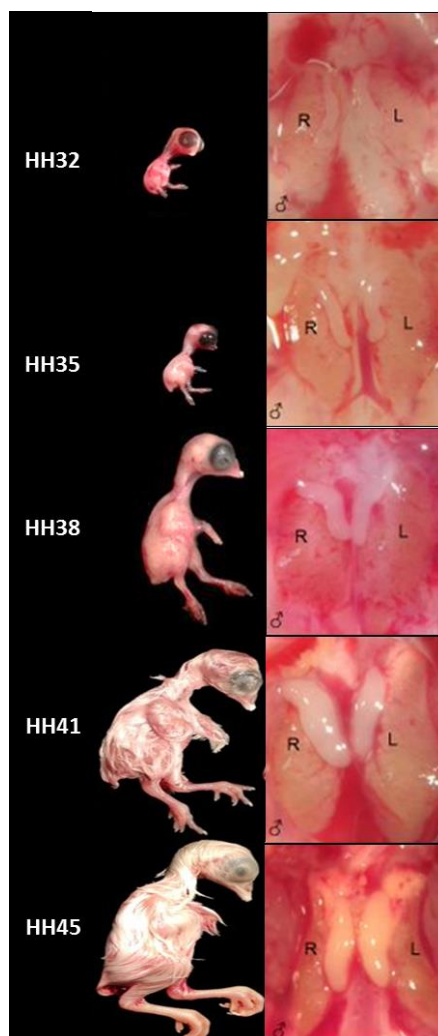


Figura 6 – Estágios de desenvolvimento do testículo em embriões de *Gallus gallus domesticus*, entre os estágios HH32 e HH45 de acordo com os critérios de Hamburger e Hamilton (HH). R: Right (direito); L: Left (esquerdo). Fonte: Marchesi, 2021.

4.3.2. SEXAGEM DOS EMBRIÕES

Todos os 20 embriões tiveram o sexo masculino confirmado a partir da análise do gene *CDH*.

4.3.3. EXPRESSÃO GÊNICA

Para realização das análises de expressão gênica, analisamos a eficiência de cada *primer*, conforme mostrado na Tabela 1. Todos apresentaram eficiência entre 90 e 110%, de acordo com especificação do fabricante do equipamento StepOne Plus Real-Time PCR Systems (*Thermo Fisher Scientific, EUA*).

Os experimentos para análise da expressão gênica foram realizados em triplicata para cada gene testado. Foram considerados apenas os resultados que tiveram um desvio padrão menor que 0,3 entre as amostras. As placas foram desenhadas com amostras de diferentes estágios em uma mesma corrida para obter uma aleatoriedade nos experimentos e uma melhor comparação do padrão de expressão entre as placas.

Buscando entender melhor a atuação das enzimas envolvidas na metilação do DNA durante o desenvolvimento do testículo, analisamos três genes que codificam enzimas atuantes na adição do radical metil ao DNA (*DNMTs*), e três genes que atuam no processo de remoção da metilação do DNA (*TETs*). O padrão de expressão se mostrou diferente entre alguns genes analisados durante o desenvolvimento, como o gene *DNMT1* que se mostrou aumentado nos estágios HH32, HH38 e HH45 (Figura 7a). Os genes *DNMT3B* e *TET2* apresentaram um aumento gradual na expressão a partir do estágio HH41 (Figura 7a e 7b), enquanto *TET1* e *TET3* foram mais expressos no estágio HH32 (Figura 7b).

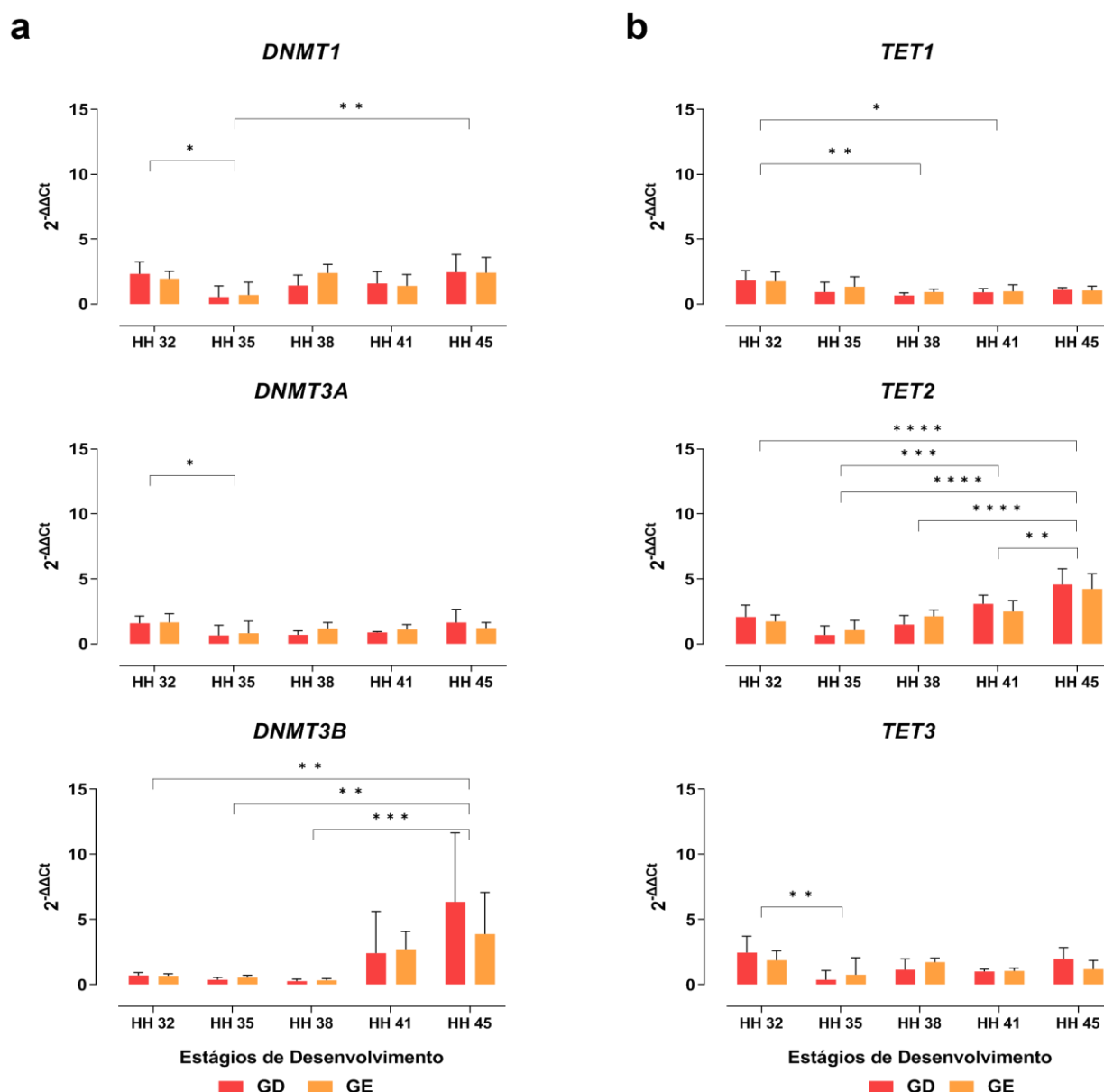


Figura 7 - Expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2* e *TET3* no testículo entre os estágios de desenvolvimento HH32 a HH45. GD: Gônada direita; GE: Gônada esquerda. * Diferença significativa do valor de $p < 0,05$; ** Diferença significativa do valor de $p < 0,01$; *** Diferença significativa do valor de $p < 0,001$; **** Diferença significativa do valor de $p < 0,0001$.

4.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram observadas diferenças significativas do valor de p nos genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *TET3* entre os estágios HH32-HH35. *DNMT1* também apresentou diferença significativa entre HH35-HH45, junto com *DNMT3B* e *TET2*. Da mesma forma, foram observadas diferenças significativas entre os estágios HH32-45 e HH38-HH45 nos genes *DNMT3B* e *TET2*. Diferente dos outros genes analisados, *TET1*

apresentou diferenças significativas entre os estágios HH32-HH38 e HH32-HH41. Já *TET2*, foi o gene que mais apresentou diferenças significativas entre os estágios analisados. Além dos estágios já mencionados anteriormente, foram observadas diferenças significativas entre os estágios HH35-HH41 e HH41-HH45.

Em resumo, todos os genes analisados apresentaram diferenças significativas entre os estágios de desenvolvimento. Os valores de p estão expostos na Tabela 2. Não observamos diferença significativa quando comparamos gônada esquerda e direita separadamente.

Tabela 2 - Valores de p de cada gene e estágio de desenvolvimento analisado.

Gene	Estágio HH	p
<i>DNMT1</i>	32-35	0,0190
	35-45	0,0059
<i>DNMT3A</i>	32-35	0,0477
<i>DNMT3B</i>	32-45	0,0024
	35-45	0,0014
	38-45	0,0009
<i>TET1</i>	32-38	0,0076
	32-41	0,0287
<i>TET2</i>	32-45	<0,0001
	35-41	0,0005
	35-45	<0,0001
	38-45	<0,0001
<i>TET3</i>	41-45	0,0051
	32-35	0,0033

4.4. DISCUSSÃO

No presente estudo buscamos entender o comportamento de algumas enzimas que atuam na metilação do DNA. Foram analisados três genes que codificam DNA metiltransferases (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*) e três que codificam DNA demetilases (*TET1*, *TET2* e *TET3*) em diferentes estágios do desenvolvimento testicular (HH32, HH35, HH38, HH41 e HH45).

Observamos uma tendência de aumento da expressão de *DNMT1* nos estágios HH32, HH38 e HH45. Também notamos diferenças estatísticas significativas para este gene entre os estágios HH32 e HH35, bem como entre os estágios HH35 e HH45. Rengaraj e colaboradores (2011) encontraram nível moderado de expressão de *DNMT1* em células gonadais primordiais e células estromais de embriões nos estágios iniciais E 4.5 e E 6.5. Por outro lado, observaram baixa expressão de *DNMT1* em embriões de *Gallus gallus domesticus* machos entre os estágios E 6.5 – E 14.5, que equivalem aproximadamente aos estágios analisados no presente trabalho. Esta enzima é responsável pela manutenção da metilação do DNA em sítios hemimetilados durante a proliferação celular (YADAV *et al.*, 2021). A manutenção da metilação exercida por *DNMT1* é crucial, uma vez que garante o reestabelecimento fiel das marcas 5mC na fita de DNA recém-sintetizada após a replicação do DNA (TAJIMA *et al.*, 2016). Acreditamos que *DNMT1* apresenta um papel importante na manutenção da metilação em regiões essenciais à diferenciação testicular, tendo em vista que esta é uma fase de intensa divisão celular e replicação do DNA.

No presente trabalho, o gene *DNMT3B* apresentou aumento na sua expressão nos estágios finais HH41 e HH45, e foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os estágios HH32 e HH45; HH35 e HH45; HH38 e HH45. Diferente do observado neste estudo, Rengaraj e colaboradores (2011) detectaram *DNMT3B* em níveis alto e moderado, respectivamente, em embriões de *Gallus gallus domesticus* machos entre os estágios E 6.5 – E 14.5. *DNMT3A* e *DNMT3B* atuam na metilação *de novo*, sendo responsáveis por estabelecer novos padrões de metilação de DNA em embriões em estágio de implantação e durante a diferenciação de células germinativas em mamíferos (GAO *et al.*, 2020; TAJIMA *et al.*, 2016).

Um estudo de desenvolvimento abrangendo os primeiros 12 dias após o nascimento foi realizado em um modelo de camundongo mutante para *DNMT3L* (*DNA methyltransferase 3 like*), uma coenzima de *DNMT3B*. Foram observados um menor

número de células germinativas e atraso na entrada em meiose em machos *DNMT3L* $-/-$. Neste mesmo estudo, foi visto que a expressão de *DNMT3L* é maior em gonócitos pré-natais, mas também é detectada e regulada durante o desenvolvimento e durante a espermatogênese (LA SALLE et al., 2007). *DNMT3A* e *DNMT3B* foram detectadas no núcleo de células humanas de carcinoma *in situ* testicular (KRISTENSEN et al., 2014).

Notamos que a expressão de *DNMT1* foi maior que *DNMT3A* em quase todos os estágios de desenvolvimento analisados no presente estudo. Embora a expressão de *DNMT3A* tenha sido relativamente baixa, foi observada diferença estatística significativa entre HH32 e HH35. Rengaraj e colaboradores (2011) relataram níveis baixos e moderados de *DNMT3A* entre os estágios E6.5 a 25 semanas de idade em machos e fêmeas. O gene *DNMT3A* foi diferencialmente expresso durante o desenvolvimento do testículo porcino (ANQI et al., 2022). Embora *DNMT1* apresente preferência por sítios de DNA hemimetilado, ela também apresenta capacidade significativa para metilação *de novo* (OKANO et al., 1999; ANDERSON et al., 2009). Portanto, os genes *DNMT3A* e *DNMT3B*, junto com *DNMT1*, podem estar envolvidos na aquisição de novas marcas epigenéticas durante a diferenciação testicular em aves.

Ao contrário das DNMTs, as enzimas da família TET atuam na reversão da metilação, processo denominado desmetilação do DNA. Esses dois processos podem acontecer de forma ativa, com o auxílio das *TETs*, e de forma passiva, através da diluição do grupo metil por vários ciclos de retenção da expressão de *DNMTs* (BHUTANI; BURNS; BLAU, 2011; WU; ZHANG, 2017).

Observamos uma tendência de aumento na expressão de *TET1* e *TET3* no estágio HH32. *TET1* apresentou diferença estatística significativa entre os estágios HH32 e HH38; HH32 e HH41, enquanto *TET3* apresentou diferença estatística significativa apenas entre HH32 e HH35. Okuzaki e colaboradores (2017) analisaram a expressão das *TETs* no sangue e tecidos adultos de *Gallus gallus domesticus*, incluindo testículo, e observaram que *TET1* foi o que mais se destacou durante todos os estágios analisados e no testículo adulto. *TET1*, *TET2* e *TET3* são expressas sucessivamente em diferentes estágios da espermatogênese humana e seus níveis de expressão foram associados à fertilidade masculina (NI et al., 2016). *TET1* e *TET2* apresentaram baixa expressão em células de carcinoma *in situ* e câncer testicular de células germinativas humanas (KRISTENSEN et al., 2014).

Já nos estágios finais, *TET2* se destacou, com um aumento nos estágios HH41 e HH45. Foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os estágios HH32 e HH45; HH35 e HH41; HH35 e HH45; HH38 e HH45; HH41 e HH45. Okashita e colaboradores (2019) relataram *TET2* atuando na desmetilação do promotor de *Sry* em camundongo durante o desenvolvimento gonadal. Neste estudo, observaram que camundongos deficientes em *TET2* apresentavam ausência de 5-hidroximetilcitosina no promotor *Sry*. Além disso, a deficiência de *TET2* diminuiu a expressão de *Sry*, indicando que a desmetilação do DNA mediada por *TET2* pode regular positivamente a expressão de *Sry* e contribuir para a determinação do sexo. Kamdar e colaboradores (2019) observaram que *TET2* é direcionado por mecanismos de repressão dependentes de andrógenos no câncer de próstata.

A capacidade de remoção direcionada da metilação associada à função das *TETs* é particularmente importante em células-tronco embrionárias, pois elas precisam manter a capacidade de auto renovação, bem como adotar diversos padrões de metilação durante e após a diferenciação (ROSS; BOGDANOVIC, 2019). *TET1* e *TET3* parecem atuar de forma mais ativa no início da diferenciação do testículo. Já *TET2* parece ter uma atuação mais tardia no desenvolvimento do testículo, possivelmente removendo marcas que já não se fazem necessárias aos estágios finais, e permitindo que fatores de transcrição se liguem a regiões que devem ser ativadas nesse momento.

As células germinativas dão origem aos organismos individuais, são portadoras da informação hereditária e responsáveis pela diversidade genética (KURIMOTO; SAITOU, 2019). O desenvolvimento das células germinativas é um período crítico durante o qual os padrões epigenéticos são estabelecidos e mantidos (GODMANN; LAMBROT; KIMMINS, 2009). Os mecanismos epigenéticos fornecem aos organismos a capacidade de integrar informações genômicas e ambientais para modificar a atividade de seus genes e gerar um fenótipo específico. Durante o desenvolvimento, as células se diferenciam, adquirem e mantêm a identidade por meio de mudanças na expressão gênica. Isso é crucial para a determinação e diferenciação do sexo, que estão entre os processos de desenvolvimento mais importantes para o funcionamento adequado e a perpetuação das espécies (PIFERRER, 2013).

O padrão geral de metilação do DNA estabelecido no embrião inicial serve como um mecanismo de proteção para manter as regiões reguladoras metiladas, a cromatina condensada e inacessível a fatores de transcrição (CEDAR; SABAG;

REIZEL, 2022). Com esse padrão geral de metilação do DNA servindo como ponto de partida, outros estágios de desenvolvimento são acompanhados por alterações na metilação do DNA específicas do estágio e do tipo de célula (ARGELAGUET *et al.*, 2019).

À medida em que o desenvolvimento embrionário avança, um mecanismo de desmetilação programada individual para cada tipo de célula fornece a especificidade para manter a estrutura da cromatina aberta. Isso permite que elementos reguladores interajam com uma grande variedade de fatores de transcrição e, assim, regulem os perfis de expressão gênica que definem a identidade celular (CEDAR; SABAG; REIZEL, 2022). Mediadas pelo recrutamento local de TET demetilases ou pelas DNA metiltransferases, essas alterações programadas ajudam a definir a natureza e a função específica de cada célula e, portanto, de cada sistema biológico (CEDAR; BERGMAN, 2012; ZILLER *et al.*, 2013).

Como vimos anteriormente, as *DNMTs* e *TETs* são essenciais para a metilação do DNA. No entanto, ainda existem poucos estudos relatando o envolvimento das *DNMTs* e *TETs* na gonadogênese das aves. Embora a caracterização de alterações epigenéticas em células germinativas seja valiosa, seu papel em precursores de células somáticas talvez seja ainda mais importante, dado ao papel crítico das células somáticas na determinação do destino sexual. Os genes que regulam a determinação e diferenciação do sexo são expressos principalmente nessas células e devem ser submetidos a um complexo mecanismo de regulação (PIFERRER, 2013).

Nossas descobertas ajudam a avançar na compreensão sobre a atuação de algumas enzimas da maquinaria epigenética durante o desenvolvimento dos testículos de galos. Devido à facilidade de acesso ao material de estudo, o embrião de galinha pode ser utilizado em pesquisas futuras para compreender melhor o mecanismo de regulação epigenética das gônadas. Para elucidar melhor como as enzimas se comportam durante todo o processo de diferenciação gonadal, é relevante analisar a maquinaria envolvida na metilação do DNA incluindo mais estágios do desenvolvimento, desde a gônada indiferenciada até o testículo adulto.

4.5. CONCLUSÃO

Nossos achados sugerem uma possível atuação das vias de metilação e desmetilação na regulação epigenética ao longo do desenvolvimento testicular de galinhas. Os resultados indicam que o gene *DNMT1* apresenta expressão significativa no início, meio e fim da diferenciação testicular, enquanto os genes *TET1* e *TET3* são mais expressos no estágio inicial HH32, e *DNMT3B* e *TET2* nos estágios finais HH41 e HH45.

5. CAPÍTULO 2 – Análise preditiva de Ilhas CpGs em promotores de genes envolvidos na diferenciação testicular de aves

5.1. INTRODUÇÃO

As ilhas CpG são regiões de metilação de DNA ricas em dímeros CpGs e geralmente ficam localizadas na região promotora do gene. São conhecidas por regular a expressão do gene através de mudanças nos níveis de metilação nessas ilhas, geralmente levando ao silenciamento transcricional do gene correspondente. (DEATON; BIRD, 2011; LIM *et al.*, 2019).

Nos vertebrados a metilação do DNA ocorre predominantemente no dinucleotídeo CpG. Padrões distintos de metilação do DNA podem variar entre diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento. A metilação do DNA pode impactar na expressão de genes ao impedir que fatores de transcrição se liguem na região promotora dos seus respectivos genes (BOGDANOVIĆ; VEENSTRA, 2009).

Esse processo de regulação epigenética pode ocorrer através do impedimento da ligação de fatores de transcrição a região reguladora do gene devido a existência de ilhas CpGs metiladas no sítio de ligação do fator transcricional, ou por meio da ligação de proteínas do domínio de ligação a metil-CpG (MBDs) nas sequências de DNA ricas em ilhas CpGs existentes em regiões regulatórias dos genes. A metilação das ilhas CpGs é o que influencia a regulação da expressão dos genes nos dois cenários. (BOGDANOVIĆ; VEENSTRA, 2009).

Cerca de 70% dos promotores de genes anotados de vertebrados estão associados a uma ilha CpG. Geralmente apresentam um tamanho maior que 200pb e um conteúdo de CG acima de 50% (DEATON; BIRD, 2011). No genoma de mamíferos aproximadamente 70-80% dos dinucleotídeos CpG são marcados pela metilação (LISTER *et al.*, 2009). Essa modificação geralmente está associada a estados reprimidos da cromatina e inibição da transcrição (KLOSE; BIRD, 2006).

Apesar da prevalência da metilação de CpGs, as ilhas CpGs são regiões específicas do genoma de vertebrados refratárias a essa modificação. Enzimas DNMTs são responsáveis por catalisar a metilação nos dinucleotídeos CpGs (EDWARDS *et al.*, 2017; ROBERT *et al.*, 2003).

O sequenciamento de bissulfito de sódio revelou que a região promotora do gene *Sry* estava hipermetilada em embriões de camundongos com 8,5 dias pós coito (dpc), quando o gene *Sry* ainda não está expresso. No entanto, em 11,5 dpc esta região estava hipometilada na gônada, enquanto permaneceu hipermetilada em tecidos onde *Sry* não foi expresso, sugerindo que a expressão do *Sry* é controlada por um

mecanismo envolvendo a metilação do DNA (NISHINO *et al.*, 2004). O gene *Sry* desempenha papel fundamental na determinação do sexo masculino em mamíferos (SMITH *et al.*, 1999).

Uma vez que a metilação do DNA quando presente nas ilhas CpGs pode alterar a regulação da expressão gênica impedindo que fatores de transcrição se liguem a sua região reguladora (BOGDANOVIĆ; VEENSTRA, 2009), é de extrema importância que essas regiões sejam bem descritas. A presença de ilhas CpGs nos promotores desses genes não está bem determinada. Neste estudo realizamos uma análise preditiva de ilhas CpGs nos promotores dos genes *DMRT1*, *SOX9* e *AMH* e elaboramos uma rede interação gênica com os principais fatores de transcrição associados ao desenvolvimento do testículo em aves.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1. ANÁLISE DE ILHAS CpGs

As ilhas CpGs foram identificadas nas regiões promotoras dos genes *DMRT1*, *AMH* e *SOX9* utilizando o Programa MethPrimers (<http://www.urogene.org/methprimer2/>) (LI; DAHIYA, 2002). As sequências das regiões promotoras foram obtidas usando o genoma de referência *Gallus gallus* disponível no *Ensembl Genome Browser* (<https://www.ensembl.org/index.html>) . Consideramos como região promotora os 2000pb anteriores ao *start códon* (ATG inicial).

5.1.2. ANÁLISE DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO

O software Ciider® (GEARING *et al.*, 2019) foi utilizado para realizar o levantamento dos fatores de transcrição que apresentam sítio de ligação nas regiões promotoras dos genes *DMRT1*, *AMH* e *SOX9*.

5.1.3. INTERAÇÃO GÊNICA

Uma rede de interação dos genes envolvidos no desenvolvimento testicular foi construída utilizando o software STRING v10 (SZKLARCZYK *et al.*, 2015).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. PESQUISA DE ILHAS CpGs

Buscando entender melhor como as enzimas envolvidas na metilação do DNA podem estar atuando no desenvolvimento testicular, realizamos uma busca de ilhas CpGs na região reguladora dos genes mais citados na literatura como envolvidos diretamente no processo de diferenciação do testículo em aves e humanos. Foram selecionados os genes *DMRT1*, *AMH* e *SOX9* (Figura 8).

O gene *DMRT1* possui dois transcritos caracterizados em galinha, *DMRT1-201* e *DMRT1-202*. Os dois são funcionais e apresentaram três ilhas CpGs em regiões semelhantes. O *DMRT1-201* apresentou três ilhas CpGs de tamanhos distintos, sendo elas: Ilha CpG 1 contendo 113 pb (do 634 ao 746); Ilha CpG 2 contendo 414 pb (do 748 ao 1161); e Ilha CpG 3 contendo 467 bp (do 1516 ao 1982). O transcrito *DMRT1-202* apresentou as seguintes ilhas CpGs: Ilha CpG 1 contendo 113 pb (do 598 ao 710); Ilha CpG 2 contendo 414 pb (do 712 ao 1125) e Ilha CpG 3 contendo 467 pb (do 1480 ao 1946). O gene *AMH* apresentou somente uma ilha CpG contendo 182 pb (do 976 ao 1157) na região analisada. Por fim, o gene *SOX9* apresentou duas ilhas CpGs na região promotora analisada, Ilha CpG1 contendo 630 pb (do 686 ao 1315) e Ilha CpG 2 contendo 851 pb (do 1439 ao 2289). Nessas regiões a porcentagem de CG foi acima de 50%.

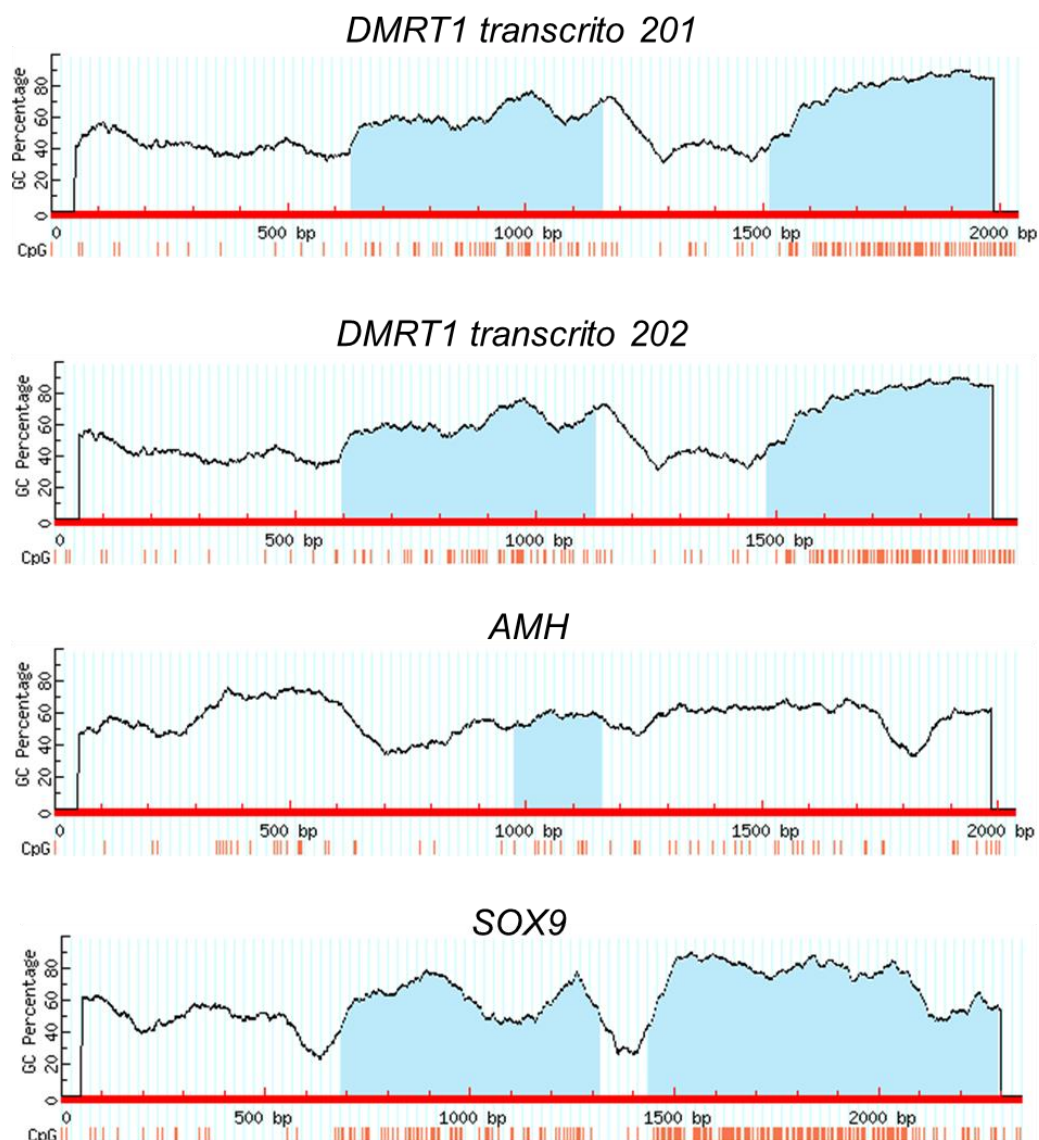


Figura 8 - Mapa das ilhas CpGs previstas na região promotora do gene *DMRT1* transcritos 201, *DMRT1* transcritos 202, *AMH* e *SOX9* de galinha. Fonte: Retirado de <http://www.urogene.org/methprimer2/>.

5.3.2. ANÁLISE DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Com o auxílio do software Ciiider® (GEARING *et al.*, 2019), realizamos um levantamento de fatores de transcrição que se ligam nestas regiões promotoras. Foram encontrados mais de 200 fatores de transcrição em cada região promotora analisada, porém somente os fatores já descritos na gonadogênese foram selecionados e utilizados na análise de interação gênica (Figura 9).

5.3.3. REDE DE INTERAÇÃO GÊNICA

A rede de interação dos genes foi construída a fim de relacionar como os seus produtos funcionais (fatores de transcrição) podem estar atuando no desenvolvimento do testículo (Figura 9). Os genes *DMRT1*, *AMH* e *SOX9* mostraram forte ligação respectivamente.

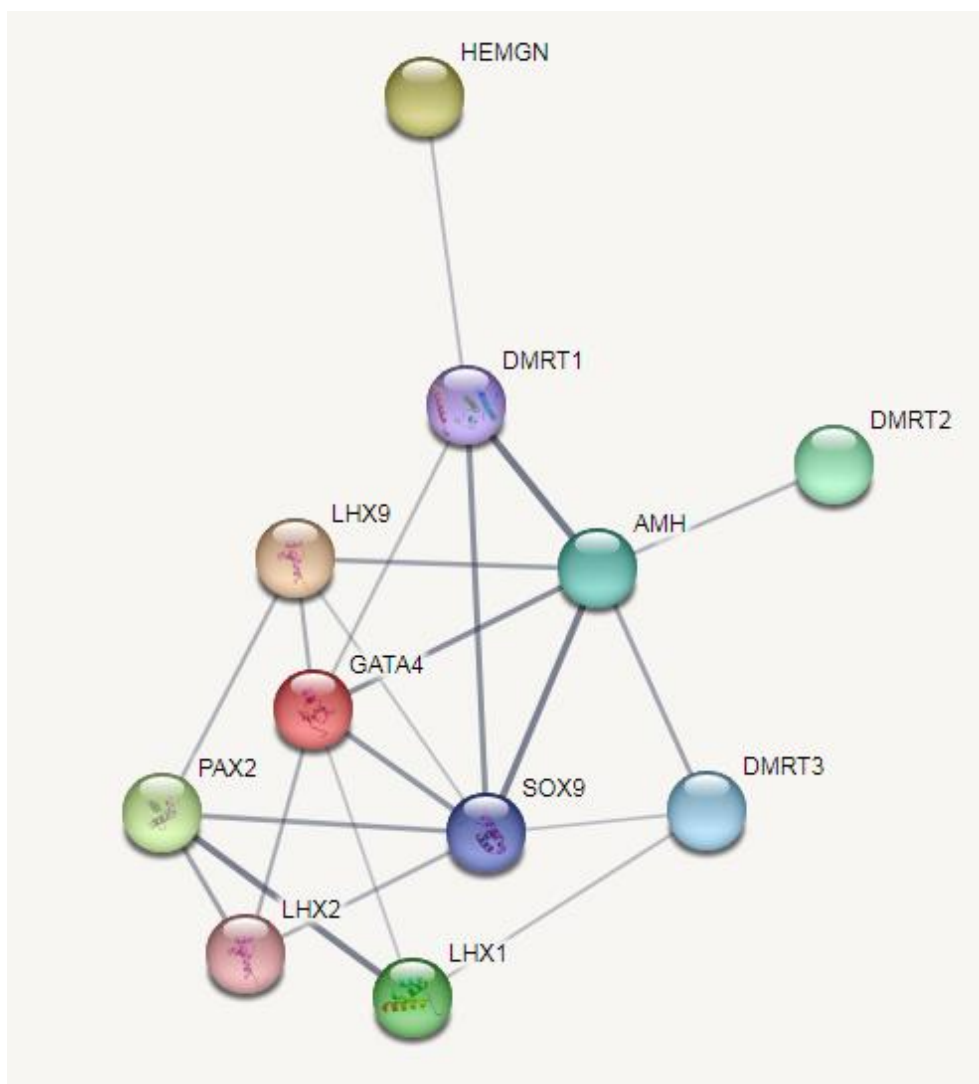


Figura 9 – Interação dos genes responsáveis pelos fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento do testículo. A espessura das linhas representa a força do suporte de dados. Disponível em: <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?taskId=bNRpY9ogRk3o&sessionId=b7XkD6S6EFZn>.

5.4. DISCUSSÃO

A análise de predição das ilhas CpGs nos mostrou que, com exceção do gene *AMH*, todos os genes possuem mais de uma ilha CpG nos seus promotores. Estudos demonstraram que a regulação epigenética tem um papel importante na determinação do sexo em vertebrados, especialmente a modificação da metilação de dinucleotídeos CpGs no promotor de genes relacionados ao sexo (JIA *et al.*, 2019; MIYAWAKI; TACHIBANA, 2019).

A análise no promotor de *DMRT1* em testículo humano mostrou um aumento da metilação relacionado ao fenótipo de hipoespermatogênese (WU *et al.*, 2016). A hipermetilação do gene *AMH*, em conjunto com outros genes, foi associada a feminização da gônada embrionária de galinha geneticamente macho (ZZ) (SHIODA *et al.*, 2021). Em camundongos o gene *SOX9* se mostrou hipometilado nos estágios fetal, neonatal e adulto do desenvolvimento testicular, e hipermetilado no ovário adulto (PAMNANI *et al.*, 2016). *SOX9* também se revelou hipometilado em cachorros geneticamente XX (*SRY* negativo) com alteração do desenvolvimento sexual. Portanto, apesar de ainda pouco explorada em galinhas, a metilação das regiões promotoras parecer ser importante para o desenvolvimento correto das gônadas.

Em galinhas, o desenvolvimento dos testículos é governado pelo gene *DMRT1* ligado ao cromossomo Z, que ativa direta ou indiretamente os fatores masculinos, *HEMGN*, *SOX9* e *AMH* (ESTERMANN; MAJOR; SMITH, 2021). Análise da expressão de *DMRT1*, *SOX9*, e *AMH* em embriões de galinha mostrou que a expressão desses genes é maior nas gônadas masculinas do que nas gônadas femininas (YANG *et al.*, 2016). A rede de interação mostra uma ligação forte entre esses genes. O gene *DMRT1* codifica um fator de transcrição e foi confirmado ser um gene chave na regulação e formação do testículo no modelo aviário (IOANNIDIS *et al.*, 2021). *DMRT1* exibe expressão sexualmente dimórfica (maior em gônadas masculinas) em várias espécies de mamíferos, pássaros, répteis e peixes, onde seu envolvimento no desenvolvimento dos testículos sugere que é um componente conservado da via de determinação do sexo dos vertebrados (SMITH *et al.*, 1999).

Um estudo realizado por Smith, Katz e Sinclair (2003) relatou que embriões de galinha com reversão de sexo feminino para masculino (geneticamente ZW) mostraram níveis elevados de expressão de *DMRT1* semelhantes aos de machos normais (com duas cópias do cromossomo Z). Níveis elevados de *DMRT1* estão

associados ao desenvolvimento do testículo, tanto em machos normais (ZZ) quanto em fêmeas com sexo reverso (ZW). A expressão de *SOX9* também foi ativada durante a reversão do sexo feminino para masculino, mas pareceu atrasada em relação à regulação positiva de *DMRT1* (SMITH; KATZ; SINCLAIR, 2003). Níveis mais altos de expressão de *DMRT1* durante a diferenciação testicular, portanto, não refletem simplesmente uma diferença de dosagem do gene entre os dois sexos, mas implicam um envolvimento ativo no desenvolvimento masculino (SMITH; KATZ; SINCLAIR, 2003). O *knockdown* de *DMRT1* em embriões de galinha ZZ usando *RNAs short hairpin* entregue por vírus também resultou na feminização das gônadas, com regulação negativa de *SOX9* e *AMH*, e ativação dos marcadores ovarianos, *FOXL2* e *Aromatase* (SMITH *et al.*, 2009).

SOX9 é um gene necessário para o início do desenvolvimento das células pré-Sertoli na medula gonadal. É um fator de transcrição do grupo SOX, que pertence à mesma família do *SRY*. Em camundongos ou humanos, o gene *SOX9* é ativado pela ação combinada de *SRY* e *SF1*, que se ligam à região regulatória de *SOX9* (CROFT *et al.*, 2018; GONEN; LOVELL-BADGE, 2019; SEKIDO *et al.*, 2004; SEKIDO; LOVELL-BADGE, 2008). Em galinha, *SOX9* é regulado positivamente durante a formação do testículo (KENT *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1996; TAKADA *et al.*, 2006). Evidências indicam que *DMRT1* ativa *SOX9* durante a especificação das células pré-Sertoli. A expressão de *SOX9* é regulada negativamente após o *knockdown* de *DMRT1* em gônadas masculinas (ZZ), e é ativada quando *DMRT1* é menos expresso em gônadas femininas (ZW) (LAMBETH *et al.*, 2014; SMITH *et al.*, 2009; SMITH; MAJOR; ESTERMANN, 2021).

Em mamíferos, um dos principais alvos do *SOX9* é o *AMH*, uma glicoproteína secretada pelas células de Sertoli responsável pela regressão do ducto de Müller (DE SANTA BARBARA *et al.*, 1998). Consequentemente, os transcritos *SOX9* são primeiro detectados antes do *AMH*, no embrião de camundongo. No entanto, em galinha são notavelmente diferentes, sendo que o *mRNA* de *AMH* é expresso pela primeira vez antes do *mRNA* de *SOX9* (HH25 vs HH30), e em ambos os sexos, embora sempre mais expresso em machos (HIRST; MAJOR; SMITH, 2018; OREAL *et al.*, 1998; SMITH; SMITH; SINCLAIR, 1999).

Alguns dados indicam que *SOX9* não ativa a expressão do gene *AMH* no modelo aviário, embora possa mantê-la. *AMH* pode ser ativado por *DMRT1*, ainda que faltem evidências diretas. Outra possibilidade é que, enquanto a transcrição de *AMH*

é iniciada antes de *SOX9*, sua tradução em proteína pode ser retardada, ocorrendo após a de *SOX9* (LAMBETH *et al.*, 2014). A formação dos testículos no modelo aviário pode depender principalmente da ativação de *SOX9* por *DMRT1*, com *SOX9* acionando a via genética masculina e reprimindo a via feminina (ESTERMANN; MAJOR; SMITH, 2021). Essas observações sugerem que o *AMH* não funciona como um ativador testicular precoce na galinha (LAMBETH *et al.*, 2016).

Diante do possível papel da metilação do DNA na determinação do sexo em vertebrados, estudos sobre o estado da metilação nas ilhas CpGs dos promotores de *DMRT1*, *SOX9* e *AMH* se fazem necessários para o melhor entendimento da regulação epigenética na ativação e inativação desses genes em galinha.

5.5. CONCLUSÃO

Nossas análises sugerem evidências de ilhas CpGs nas regiões reguladoras dos genes *DMRT1*, *AMH* e *SOX9* de galinhas, importantes para a diferenciação do testículo. Este estudo fornece informações sobre a possível localização e extensão das ilhas CpGs nos promotores analisados, o que facilitaria futuros estudos sobre o estado da metilação nestas regiões.

Ainda que faltem evidências diretas sobre os fatores de transcrições atuando na expressão dos genes analisados no genoma de galinhas, nossos achados indicam uma forte interação entre os genes *DMRT1*, *AMH* e *SOX9*.

6. CONCLUSÕES FINAIS

- Nossos achados evidenciam que os genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2* e *TET3* estão envolvidos na regulação epigenética do testículo, apresentando níveis de expressão específicos para cada estágio de desenvolvimento analisado. Estas alterações na metilação do DNA podem ter um papel importante na diferenciação e estabelecimento do perfil celular do testículo.
- Em resumo, os genes *TET1* e *TET3* parecem estar envolvidos nos estágios iniciais, enquanto *DNMT3B* e *TET2* estariam comprometidos com os estágios finais do desenvolvimento testicular. O gene *DNMT1* parece estar envolvido no início, meio e final da diferenciação testicular, com possibilidade de função na manutenção de marcas de metilação ou inserção de novas marcas.
- Os genes *DMRT1*, *AMH* e *SOX9* apresentam ilhas CpGs em suas regiões promotoras, e mostram forte interação entre si.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ALLEGRUCCI, C.; THURSTON, A.; LUCAS, E.; YOUNG, L. Epigenetics and the germline. **Reproduction**, v. 129, n. 2, p. 137-149, 2005.
- ANDERSON, R. M.; BOSCH, J. A.; GOLL, M. G.; HESSELSON, D.; DONG, P. D. S.; SHIN, D.; CHI, N. C.; SHIN, C. H.; SCHLEGEL, A.; HALPERN, M.; STAINIER, D. Y. Loss of Dnmt1 catalytic activity reveals multiple roles for DNA methylation during pancreas development and regeneration. **Developmental Biology**, v. 334, n. 1, p. 213-223, 2009.
- ANQI, Y.; SAINA, Y.; CHUJIE, C.; YANFEI, Y.; XIANGWEI, T.; JIAJIA, M.; JIAOJIAO, X.; MAOLIANG, R.; BIN, C. Regulation of DNA methylation during the testicular development of Shaziling pigs. **Genomics**, v. 114, n. 5, p. 110450, 2022.
- ARGELAGUET, R.; CLARK, S. J.; MOHAMMED, H.; STAPEL, L. C.; KRUEGER, C.; KAPOURANI, C. A.; IMAZ-ROSSHANDLER, I.; LOHOFF, T.; XIANG, Y.; HANNA, C. W.; SMALLWOOD, S. Multi-omics profiling of mouse gastrulation at single-cell resolution. **Nature**, v. 576, n. 7787, p. 487-491, 2019.
- BARRIONUEVO, F. J.; BURGOS, M.; SCHERER, G.; JIMÉNEZ, R. Genes promoting and disturbing testis development. **Histology and Histopathology**, v. 27, n. 1, p. 1361-1383, 2012.
- BELLOTT D. W.; SKALETSKY, H.; PYNTIKOVA, T.; MARDIS, E. R.; GRAVES, T.; KREMITZKI, C.; BROWN, L. G.; ROZEN, S.; WARREN, W. C.; WILSON, R. K.; PAGE, D. C. Convergent Evolution of Chicken Z and Human X Chromosomes by Expansion and Gene Acquisition. **Nature**, v. 466, n. 7306, p. 612-616, 2010.
- BELLOTT, D. W.; SKALETSKY, H.; CHO, T. J.; BROWN, L.; LOCKE, D.; CHEN, N.; GALKINA, S.; PYNTIKOVA, T.; KOUTSEVA, N.; GRAVES, T.; KREMITZKI, C. Avian W and mammalian y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. **Nature Genetics**, v. 49, n. 3, p. 387–394, 2017.
- BHUTANI, N.; BURNS, D. M.; BLAU, H. M. DNA demethylation dynamics. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 866-871, 2011.
- BIRCHLER, J. A. Dosage compensation for the birds. **Heredity**, v. 102, n. 5, p. 423-424, 2009.
- BOGDANOVIĆ, O.; VEENSTRA, G. J. C. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. **Chromosoma**, v. 118, n. 5, p. 549-565, 2009.
- BRIGGS, S. F.; REIJO PERA, R. A. **X chromosome inactivation: Recent advances and a look forward** *Current Opinion in Genetics and Development*, 1 out. 2014.
- BURT, D. W. Chicken genome: Current status and future opportunities. **Genome**

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Research, v.15, n. 12, p. 1692-1698, 2005.

CAETANO, L. C.; GENNARO, F. G. O.; COELHO, K.; ARAÚJO, F. M.; VILA, R. A.; ARAÚJO, A.; BERNARDO, A. D. M.; MARCONDES, C. R.; LOPES, S. D. S.; RAMOS, E. S. Differential expression of the MHM region and of sex-determining-related genes during gonadal development in chicken embryos. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 838-849, 2014.

CARRELL, D. T. Epigenetics of the male gamete. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 2, p. 267-274, 2012.

CEDAR, H.; BERGMAN, Y. Programming of DNA methylation patterns. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 97-117, 2012.

CEDAR, H.; SABAG, O.; REIZEL, Y. The role of DNA methylation in genome-wide gene regulation during development. **Development**, v. 149, n. 2, 2022.

CHEN, L.; WANG, S.; FENG, Y.; ZHANG, J.; DU, Y.; ZHANG, J.; VAN ONGEVAL, C.; NI, Y.; LI, Y. Utilisation of chick embryo chorioallantoic membrane as a model platform for imaging-navigated biomedical research. **Cells**, v. 10, n. 463, p. 1-40 2021.

CHUE, J.; SMITH, C. A. Sex determination and sexual differentiation in the avian model. **The FEBS journal**, v. 278, n. 7, p. 1027-1034, 2011.

CLINTON, M.; ZHAO, D.; NANDI, S.; MCBRIDE, D. Evidence for avian cell autonomous sex identity (CASI) and implications for the sex-determination process? **Chromosome Research**, v. 20, n. 1, p. 177-190, 2012.

COOKSEY, E. J.; ROTHWELL, B. The ultrastructure of the Sertoli cell and its differentiation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Journal of Anatomy**, v. 114, n. 3, p. 329-345, 1973.

CROFT, B.; OHNESORG, T.; HEWITT, J.; BOWLES, J.; QUINN, A.; TAN, J.; CORBIN, V.; PELOSI, E.; VAN DEN BERGEN, J.; SREENIVASAN, R.; KNARSTON, I. Human sex reversal is caused by duplication or deletion of core enhancers upstream of SOX9. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2018.

DE MELO BERNARDO, A.; HEEREN, A.M.; VAN IPEREN, L.; FERNANDES, M. G.; HE, N.; ANJIE, S.; NOCE, T.; RAMOS, E. S.; DE SOUSA LOPES, S. M. C. Meiotic wave adds extra asymmetry to the development of female chicken gonads. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, n. 10, p. 774-786, 2015.

DE SANTA BARBARA, P.; BONNEAUD, N.; BOIZET, B.; DESCLOZEAUX, M.; MONIOT, B.; SUDBECK, P.; SCHERER, G.; POULAT, F.; BERTA, P. Direct Interaction of SRY-Related Protein SOX9 and Steroidogenic Factor 1 Regulates Transcription of the Human Anti-Müllerian Hormone Gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 11, p. 6653-6665, 1998.

DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes and Development**, v. 25, n. 10, p. 1010-1022, 2011.

Edwards, J. R.; Yarychivska, O.; Boulard, M.; Bestor, T. H. DNA methylation and DNA methyltransferases. **Epigenetics & Chromatin**, v.10, n.1, p. 1-10, 2017.

EGGERS, S.; SINCLAIR, A. Mammalian sex determination-insights from humans and mice. **Chromosome Research**, v. 20, n. 1, p. 215-238, 2012.

ELLEGREN, H. Emergence of male-biased genes on the chicken Z-chromosome: Sex-chromosome contrasts between male and female heterogametic systems. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2082-2086, 2011.

ESTERMANN, M. A.; MAJOR, A. T.; SMITH, C. A. Genetic Regulation of Avian Testis Development. **Genes**, v. 12, n. 1459, p. 1-26, 2021.

FLORES-SANTIN, J.; BURGGREN, W. W. Beyond the Chicken: Alternative Avian Models for Developmental Physiological Research. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. 712633, p. 1-16, 2021.

GAO, L.; EMPERLE, M.; GUO, Y.; GRIMM, S. A.; REN, W.; ADAM, S.; URYU, H.; ZHANG, Z. M.; CHEN, D.; YIN, J.; DUKATZ, M. Comprehensive structure-function characterization of DNMT3B and DNMT3A reveals distinctive de novo DNA methylation mechanisms. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2020.

GEARING, L. J.; CUMMING, H. E.; CHAPMAN, R.; FINKEL, A. M.; WOODHOUSE, I. B.; LUU, K.; GOULD, J. A.; FORSTER, S. C.; HERTZOG, P. J. Ciiider: A tool for predicting and analysing transcription factor binding sites. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1-12, 2019.

GINSBURG, M.; EYAL-GILADI, H. Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. **Development**, v. 101, n. 2, p. 209-219, 1987.

GODMANN, M.; LAMBROT, R.; KIMMINS, S. The dynamic epigenetic program in male germ cells: Its role in spermatogenesis, testis cancer, and its response to the environment. **Microscopy Research and Technique**, v. 8, n. 72, p. 603-619, 2009.

GONEN, N.; LOVELL-BADGE, R. The regulation of Sox9 expression in the gonad. In: **Current Topics in Developmental Biology**, v. 134, p. 223-252, 2019.

GRAVES, J. A. M. Avian sex, sex chromosomes, and dosage compensation in the age of genomics. **Chromosome Research**, v. 22, n. 1, p. 45-57, 2014.

GRIFFITHS, R.; DOUBLE, M. C.; ORR, K.; DAWSON, R. J. DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1071-1075, 1998.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.

HAN, M.; JIA, L.; LV, W.; WANG, L.; CUI, W. Epigenetic enzyme mutations: Role in tumorigenesis and molecular inhibitors. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 194, p. 1-9, 2019.

HE, Y. F.; LI, B. Z.; LI, Z.; LIU, P.; WANG, Y.; TANG, Q.; DING, J.; JIA, Y.; CHEN, Z.; LI, L.; SUN, Y. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1303-1307, 2011.

HEARD, E. Recent advances in X-chromosome inactivation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 3, p. 247-255, 2004.

HIRST, C. E.; SERRALBO, O.; AYERS, K. L.; ROESZLER, K. N.; SMITH, C. A. Genetic manipulation of the avian urogenital system using in ovo electroporation. **Methods in Molecular Biology**, v. 1650, p. 177-190, 2017.

HIRST, C. E.; MAJOR, A. T.; SMITH, C. A. Sex determination and gonadal sex differentiation in the chicken model. **International Journal of Developmental Biology**, v. 62, n. 1–3, p. 149-162, 2018.

IOANNIDIS, J.; TAYLOR, G.; ZHAO, D.; LIU, L.; IDOKO-AKOH, A.; GONG, D.; LOVELL-BADGE, R.; GUIOLI, S.; MCGREW, M. J.; CLINTON, M. Primary sex determination in birds depends on DMRT1 dosage, but gonadal sex does not determine adult secondary sex characteristics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 10, p. 1-10, 2021.

ITO, S.; SHEN, L.; DAI, Q.; WU, S. C.; COLLINS, L. B.; SWENBERG, J. A.; HE, C.; ZHANG, Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1300-1303, 2011.

ITOH, Y.; KAMPF, K.; ARNOLD, A. P. Possible differences in the two Z chromosomes in male chickens and evolution of MHM sequences in Galliformes. **Chromosoma**, v. 120, n. 6, p. 587-598, 2011.

JIA, Y.; ZHENG, J.; CHI, M.; LIU, S.; JIANG, W.; CHENG, S.; GU, Z.; CHEN, L. Molecular identification of dmrt1 and its promoter CpG methylation in correlation with gene expression during gonad development in *Culter alburnus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 245-252, 2019.

KAMDAR, S.; ISSERLIN, R.; VAN DER KWAST, T.; ZLOTTA, A. R.; BADER, G. D.; FLESHNER, N. E.; BAPAT, B. Exploring targets of TET2-mediated methylation reprogramming as potential discriminators of prostate cancer progression. **Clinical epigenetics**, v. 11, n. 1, p. 1-19, 2019.

KENT, J.; WHEATLEY, S. C.; ANDREWS, J. E.; SINCLAIR, A. H.; KOOPMAN, P. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. **Development**, v. 122, n. 9, p. 2813-2822, 1996.

KIM, J. K.; SAMARANAYAKE, M.; PRADHAN, S. Epigenetic mechanisms in mammals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 6, n.4, p. 596-612, 2009.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n.2, p. 89-97, 2006.

KRISTENSEN, D. G.; NIELSEN, J. E.; JØRGENSEN, A.; SKAKKEBÆK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; ALMSTRUP, K. Evidence that active demethylation mechanisms maintain the genome of carcinoma in situ cells hypomethylated in the adult testis. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 3, p. 668–678, 2014.

KURIMOTO, K.; SAITOU, M. Germ cell reprogramming. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 135, p. 91-125, 2019.

KUROIWA, A. Sex Determination and Differentiation in Birds. **Reproductive and developmental strategies**, p. 391-405, 2018.

LAMBETH, L. S.; RAYMOND, C. S.; ROESZLER, K. N.; KUROIWA, A.; NAKATA, T.;

ZARKOWER, D.; SMITH, C. A. Over-expression of DMRT1 induces the male pathway in embryonic chicken gonads. **Developmental Biology**, v. 389, n. 2, p. 160-172, 2014.

LAMBETH, L. S.; MORRIS, K.; AYERS, K. L.; WISE, T. G.; O'NEIL, T.; WILSON, S.; CAO, Y.; SINCLAIR, A. H.; CUTTING, A. D.; DORAN, T. J.; SMITH, C. A. Overexpression of Anti-Müllerian hormone disrupts gonadal sex differentiation, blocks sex hormone synthesis, and supports cell autonomous sex development in the chicken. **Endocrinology**, v. 157, n. 3, p. 1258-1275, 2016.

LEE, J.; KIM, D. H.; LEE, K. Current approaches and applications in avian genome editing. **Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n.3937, p. 1-19, 2020.

LEPIKHOV, K.; ARAND, J.; WOSSIDLO, M.; WALTER, J. . Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. **Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine**, 2012.

LESKA, A.; DUSZA, L. Seasonal changes in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in birds. **Reproductive biology**, v. 7, n. 2, p. 99-126, 2007.

LI, E.; ZHANG, Y. DNA methylation in mammals. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 5, p. 1-21, 2014.

LI, L. C.; DAHIYA, R. MethPrimer: Designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, n. 11, p. 1427-1431, 2002.

LIM, W .J.; KIM, K. H.; KIM, J. Y.; JEONG, S.; KIM, N. Identification of DNA-methylated CpG islands associated with gene silencing in the adult body tissues of the ogye chicken using RNA-Seq and reduced representation bisulfite sequencing. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. 346 , p. 1-15, 2019.

LISTER, R.; PELIZZOLA, M.; DOWEN, R. H.; HAWKINS, R. D.; HON, G.; TONTI-FILIPPINI, J.; NERY, J. R.; LEE, L.; YE, Z.; NGO, Q. M.; EDSALL, L. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, n. 7271, p. 315-322, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MAJOR, A. T.; AYERS, K. L.; CHUE, J.; ROESZLER, K. N.; SMITH, C. A. FOXL2 antagonises the male developmental pathway in embryonic chicken gonads. **Journal of Endocrinology**, v. 243, n. 3, p. 211-228, 2019.

MAJOR, A. T.; SMITH, C. A. Sex Reversal in Birds. **Sexual Development**, v. 10, n. 5–6, p. 288-300, 2016.

MELAMED, E.; ARNOLD, A. P. Regional differences in dosage compensation on the chicken Z chromosome. **Genome Biology**, v. 8, n. 9, p. 1-10, 2007.

MFOUNDOU, J. D. L.; GUO, Y.; YAN, Z.; WANG, X. Morpho-Histology and Morphometry of Chicken Testes and Seminiferous Tubules among Yellow-Feathered Broilers of Different Ages. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 485, p. 1-23, 2022.

MIYAWAKI, S.; TACHIBANA, M. Role of epigenetic regulation in mammalian sex

determination. In: **Current Topics in Developmental Biology**, . v. 134, p. 195-221, 2019.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23-38, 2013.

MORGAN, H. D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 1, p. 47-58, 2005.

MORRIS, K. R.; HIRST, C. E.; MAJOR, A. T.; EZAZ, T.; FORD, M.; BIBBY, S.; DORAN, T. J.; SMITH, C. A. Gonadal and Endocrine Analysis of a Gynandromorphic Chicken. **Endocrinology**, v. 159, n. 10, p. 3492-3502, 2018.

NAKATA, T.; ISHIGURO, M.; ADUMA, N.; IZUMI, H.; KUROIWA, A. Chicken hemogen homolog is involved in the chicken-specific sex-determining mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 9, p. 3417-3422, 2013.

NANDA, I.; SCHLEGELMILCH, K.; HAAF, T.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. Synteny conservation of the Z chromosome in 14 avian species (11 families) supports a role for Z dosage in avian sex determination. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, n. 2, p. 150-156, 2008.

NASCIMENTO, C. S.; BARBOSA, L. T.; BRITO, C.; FERNANDES, R. P.; MANN, R. S., PINTO, A. P. G.; OLIVEIRA, H. C.; DODSON, M. V.; GUIMARÃES, S. E.; DUARTE, M. S. Identification of suitable reference genes for real time quantitative polymerase chain reaction assays on Pectoralis major muscle in chicken (*Gallus gallus*). **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1-15, 2015.

NI, K.; DANSRANJAVIN, T.; ROGENHOFER, N.; OEZTUERK, N.; DEUKER, J.; BERGMANN, M.; SCHUPPE, H. C.; WAGENLEHNER, F.; WEIDNER, W.; STEGER, K.; SCHAGDARSURENGIN, U. TET enzymes are successively expressed during human spermatogenesis and their expression level is pivotal for male fertility. **Human Reproduction**, v. 31, n. 7, p. 1411-1424, 2016.

NISHINO, K.; HATTORI, N.; TANAKA, S.; SHIOTA, K. DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 21, p. 22306-22313, 2004.

OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247-257, 1999.

OKASHITA, N. et al. TET2 catalyzes active DNA demethylation of the Sry promoter and enhances its expression. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

OKUZAKI, Y.; KANEOKA, H.; NISHIJIMA, K.I.; MURAKAMI, S.; OZAWA, Y.; IJIMA, S. Molecular cloning of chicken TET family genes and role of chicken TET1 in erythropoiesis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 490, n. 3, p. 753-759, 2017.

OREAL, E.; PIEAU, C.; MATTEI, M.G.; JOSSO, N.; PICARD, J.Y.; CARRÉ-EUSÈBE, D.; MAGRE, S. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. **Developmental Dynamics**, v. 212, n. 4, p. 522-532,

1998.

PAMNANI, M.; SINHA, P.; SINGH, A.; NARA, S.; SACHAN, M. Methylation of the Sox9 and Oct4 promoters and its correlation with gene expression during testicular development in the laboratory mouse. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 452-458, 2016.

PIFERRER, F. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 242, n. 4, p. 360-370, 2013.

QUINN, A.; KOOPMAN, P. The molecular genetics of sex determination and sex reversal in mammals. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 30, n. 5, p. 351-363, 2012.

RAJENDER, S.; AVERY, K.; AGARWAL, A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 727, n. 3, p. 62-71, 2011.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425-432, 2007.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089-1094, 2001.

RENGARAJ, D.; LEE, B. R.; LEE, S. I.; SEO, H. W.; HAN, J. Y. Expression patterns and mirna regulation of dna methyltransferases in chicken primordial germ cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. 1-15, 2011.

ROBERT, M.F.; MORIN, S.; BEAULIEU, N.; GAUTHIER, F.; CHUTE, I.C.; BARSALOU, A.; MACLEOD, A. R. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. **Nature Genetics**, v. 33, n. 1, p. 61-65, 2003.

ROESZLER, K. N.; ITMAN, C.; SINCLAIR, A. H.; SMITH, C. A. The long non-coding RNA, MHM, plays a role in chicken embryonic development, including gonadogenesis. **Developmental Biology**, v. 366, n. 2, p. 317-326, 2012.

ROSS, S. E.; BOGDANOVIC, O. **TET enzymes, DNA demethylation and pluripotency. Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 3, p. 875-885, 2019.

SEKIDO, R.; BAR, I.; NARVÁEZ, V.; PENNY, G.; LOVELL-BADGE, R. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. **Developmental Biology**, v. 274, n. 2, p. 271-279, 2004.

SEKIDO, R.; LOVELL-BADGE, R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. **Nature**, v. 453, n. 7197, p. 930-934, 2008.

SHALET, S. M. Normal testicular function and spermatogenesis. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 53, n.2, p. 285-288, 2009.

SHETTY, S.; GRIFFIN, D. K.; GRAVES, J. A. M. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. **Chromosome research**, v. 7, n. 4, p. 289-295, 1999.

SHIODA, K.; ODAJIMA, J.; KOBAYASHI, M.; KOBAYASHI, M.; CORDAZZO, B.; ISSELBACHER, K. J.; SHIODA, T. Transcriptomic and Epigenetic Preservation of Genetic Sex Identity in Estrogen-feminized Male Chicken Embryonic Gonads. **Endocrinology**, v. 162, n. 1, p. 1-21, 2021.

DA SILVA, S. M.; HACKER, A.; HARLEY, V.; GOODFELLOW, P.; SWAIN, A.; LOVELL-BADGE, R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. **Nature Genetics**, v. 14, n. 1, p. 62-68, 1996.

SINCLAIR, A. H.; BERTA, P.; PALMER, M. S.; HAWKINS, J. R.; GRIFFITHS, B. L.; SMITH, M. J.; FOSTER, J. W.; FRISCHAUF, A. M.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P. N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**, v. 346, n. 6281, p. 240-244, 1990.

SMEDS, L.; WARMUTH, V.; BOLIVAR, P.; UEBBING, S.; BURRI, R.; SUH, A.; NATER, A.; BUREŠ, S.; GARAMSZEGI, L. Z.; HOGNER, S.; MORENO, J. Evolutionary analysis of the female-specific avian W chromosome. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2015.

SMITH, C. A.; MCCLIVE, P. J.; WESTERN, P. S.; REED, K. J.; SINCLAIR, A. H. Conservation of a sex-determining gene. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 601-602, 1999.

SMITH, C. A.; ROESZLER, K. N.; OHNESORG, T.; CUMMINS, D. M.; FARLIE, P. G.; DORAN, T. J.; SINCLAIR, A. H. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. **Nature**, v. 461, n. 7261, p. 267-271, 2009.

SMITH, C. A.; KATZ, M.; SINCLAIR, A. H. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 2, p. 560-570, 2003.

SMITH, C. A.; MAJOR, A. T.; ESTERMANN, M. A. The Curious Case of Avian Sex Determination. **Trends in Genetics**, v. 37, n. 6, p. 496-497, 2021.

SMITH, C. A.; SINCLAIR, A. H. Sex Determination in the Chicken Embryo. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, p. 691-699, 2001.

SMITH, C. A.; SMITH, M. J.; SINCLAIR, A. H. Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 395-402, 1999.

STERN, C. D. The chick embryo - Past, present and future as a model system in developmental biology. **Mechanisms of Development**, v. 121, p. 1011-1013, 2004.

STERN, C. D. The Chick: A Great Model System Becomes Even Greater. **Developmental Cell**, v. 8, n. 1, p. 9-17, 2005.

STUDENT. The probable error of a mean. **Biometrika**, v. 6, n. 1, p. 1-25, 1908.

SWAIN, A.; LOVELL-BADGE, R. Mammalian sex determination: A molecular drama. **Genes and Development**, v. 13, n. 7, p. 755-767, 1999.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTA-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, K.P.;

- KUHN, M. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. 447-452, 2015.
- TAFT, R. J.; PANG, K. C.; MERCER, T. R.; DINGER, M.; MATTICK, J. S. Non-coding RNAs: Regulators of disease. **Journal of Pathology**, v. 220, n. 2, p. 126-139, 2010.
- TAGAMI, T.; MIYAHARA, D.; NAKAMURA, Y. Avian primordial germ cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 1001, p. 1-18, 2017
- TAJIMA, S.; SUETAKE, I.; TAKESHITA, K.; NAKAGAWA, A.; KIMURA, H. Domain structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA methyltransferases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 945, p. 63-86, 2016.
- TAKADA, S.; OTA, J.; KANSAKU, N.; YAMASHITA, H.; IZUMI, T.; ISHIKAWA, M.; WADA, T.; KANEDA, R.; CHOI, Y. L.; KOINUMA, K.; FUJIWARA, S. I. Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 208-213, 2006.
- TERANISHI, M.; SHIMADA, Y.; HORI, T.; NAKABAYASHI, O.; KIKUCHI, T.; MACLEOD, T.; PYM, R.; SHELDON, B.; SOLOVEI, I.; MACGREGOR, H.; MIZUNO, S. Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus. **Chromosome Research**, v. 9, n. 2, p. 147-165, 2001.
- TURNER, B. M. Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3403-3418, 2009.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 2, p. 71-74, 2007.
- VILCHES-MOURE, J. G. Embryonic Chicken (*Gallus gallus domesticus*) as a Model of Cardiac Biology and Development. **Comparative Medicine**, v. 69, n. 3, p. 184-203, 2019.
- WADDINGTON, C. H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature**, v. 150, n. 3811, p. 563-565, 1942.
- WILHELM, D.; YANG, J. X.; THOMAS, P. Mammalian Sex Determination and Gonad Development. In: **Current Topics in Developmental Biology**, v. 106, p. 89-121, 2013.
- WOLPERT, L. Much more from the chicken's egg than breakfast - A wonderful model system. **Mechanisms of Development**, v. 121, n. 9, p. 1015-1017, 2004.
- WU, C.; DING, X.; TAN, H.; LI, H.; XIONG, C. Alterations of testis-specific promoter methylation in cell-free seminal deoxyribonucleic acid of idiopathic nonobstructive azoospermic men with different testicular phenotypes. **Fertility and Sterility**, v. 106, n. 6, p. 1331-1337, 2016.
- WU, X.; ZHANG, Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. **Nature Reviews Genetics** 2017 18:9, v. 18, n. 9, p. 517-534, 2017.

YADAV, P.; BANDYOPADHAYAYA, S.; FORD, B. M.; MANDAL, C. Interplay between DNA Methyltransferase 1 and microRNAs During Tumorigenesis. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 10, p. 1129-1148, 2021.

YANG, X.; DENG, J.; ZHENG, J.; XIA, L.; YANG, Z.; QU, L.; CHEN, S.; XU, G.; JIANG, H.; CLINTON, M.; YANG, N. A window of MHM demethylation correlates with key events in gonadal differentiation in the chicken. **Sexual Development**, v. 10, n. 3, p. 152-158, 2016.

YIN, X.; XU, Y. Structure and Function of TET Enzymes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 945, p. 275-302, 2016.

YOSHINO, T.; MURAI, H.; SAITO, D. Hedgehog-BMP signalling establishes dorsoventral patterning in lateral plate mesoderm to trigger gonadogenesis in chicken embryos. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016.

ZHAO, D.; MCBRIDE, D.; NANDI, S.; MCQUEEN, H. A.; MCGREW, M. J.; HOCKING, P. M.; LEWIS, P. D.; SANG, H. M.; CLINTON, M. Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. **Nature**, v. 464, n. 7286, p. 237-242, 2010.

ZILLER, M. J.; GU, H.; MÜLLER, F.; DONAGHEY, J.; TSAI, L. T. Y.; KOHLBACHER, O.; DE JAGER, P. L.; ROSEN, E. D.; BENNETT, D. A.; BERNSTEIN, B. E.; GNIRKE, A. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 477-481, 2013.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 075/2007, sobre o projeto intitulado “*Aspectos moleculares da determinação e diferenciação sexuais em aves*”, sob a responsabilidade da Professora Doutora Ester Silveira Ramos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de *02 de julho de 2007*.

(We certify that the protocol nº 075/2007, about “*Molecular aspects of sexual determination and differentiation in birds*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in *07/02/2007* meeting).

Ribeirão Preto, 10 de julho de 2007.

Prof. Dra. CLÁUDIA MARIA LEITE MAFFEI
Vice-Presidente da Comissão de Ética
em Experimentação Animal, em exercício

ANEXO B – Certificado de Qualidade em Biossegurança



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



OF.ATAc.12662008/FMRP/09042008
RSC

Senhora Professora,

A Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), desta Faculdade, analisou a documentação enviada por Vossa Senhoria, referente ao Projeto *Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação Sexuais em Aves*, e deliberou, conforme manifestação anexa, pela aprovação da emissão do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para tal projeto.

Devo informar-lhe que a concessão do **número** relacionado abaixo é de **uso exclusivo do referido Projeto e de responsabilidade de Vossa Senhoria**, não podendo ser fornecido a terceiros, sendo que o mesmo deverá ficar mantido sob sua guarda. Caso esta Comissão tenha conhecimento de irregularidades, tomará as providências cabíveis no sentido de cessar automaticamente a concessão do Certificado.

Esperando contar com a compreensão de Vossa Senhoria, aproveito a oportunidade para renovar os protestos de estima e consideração.


Rogério Sordi Campanini
Secretário da CIBio

CBQ-FMRP. 0030/97-08.49-1

Ilustríssima Senhora
Professora Doutora **ESTER SILVEIRA RAMOS**
Mui Digna Professora Doutora do Departamento de
Genética, desta Faculdade.