



Reprogramação epigenética em gametas e embriões de mamíferos

Epigenetic reprogramming in gametes and embryos of mammals

A.R. Ferreira¹, M.M. Franco²

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

Correspondência: allicerodrigues@gmail.com

Resumo

A epigenética refere-se aos processos que regulam a atividade gênica e que não estão relacionados à sequência primária do DNA. Um evento importante e específico que ocorre em gametas é uma extensa reprogramação epigenética pela qual passam essas células para estarem aptas à fecundação e à formação de um embrião viável. Quanto melhor se compreender sobre a reprogramação epigenética que acontece durante a gametogênese e a embriogênese inicial, maior será a capacidade de se desenvolver melhores sistemas de produção de embriões.

Palavras-chave: bovino, embrião, gametas, reprogramação epigenética.

Abstract

Epigenetics is the study of factors that regulate gene expression and that are not related to the primary sequence of DNA. An important and specific event that happens in gametes is an extensive epigenetic reprogramming, which is essential to produce viable gametes and embryos. The better understanding this epigenetic reprogramming that occurs in gametogenesis and embryogenesis is necessary to develop better systems of embryo production.

Keywords: bovine, embryo, epigenetic reprogramming, gametes.

Introdução

Em 1942, Conrad Waddington usou o termo "epigenética" para descrever a ideia de que a forma de vida de um organismo pode fazer com que seus genes se comportem (ou "se expressem") de forma diferente. A epigenética refere-se aos processos que regulam a atividade gênica e que não estão relacionados à sequência primária do DNA, sendo herdáveis ao longo das divisões celulares (Reik, 2007; Whitelaw e Whitelaw, 2008). Os principais fatores epigenéticos são metilação de DNA e metilação, fosforilação, acetilação, glicosilação, SUMOilação, ubiquitinação e ADP-ribosilação das proteínas histonas (Strahl e Allis, 2000). Essas modificações pós-traducionais das histonas, que estão relacionadas a alterações na conformação da cromatina, formam uma verdadeira linguagem molecular, conhecida como "Código das Histonas".

Uma extensa reprogramação epigenética acontece durante a formação dos gametas e o desenvolvimento embrionário inicial (Reik, 2007), e seu estabelecimento pode ser influenciado pelos sistemas de produção *in vitro* de embriões. Busca-se, com esta revisão, discutir e atualizar o conhecimento sobre os principais mecanismos moleculares envolvidos na reprogramação epigenética que acontece durante a ovogênese e a embriogênese inicial, subsidiando uma melhor compreensão destes eventos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de protocolos de produção de embriões mais eficientes.

Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma das mais estáveis modificações epigenéticas conhecidas, sendo a principal candidata a coordenar a herança epigenética entre as gerações (Migicovsky e Kovalchuk, 2011). Trata-se de marca epigenética herdável e reversível, que é propagada após a replicação do DNA, influenciando a expressão gênica (Whitelaw e Whitelaw, 2008). Nos mamíferos, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento embrionário, tendo importante papel na regulação da expressão gênica, na inativação do cromossomo X, no *imprinting* genômico e na modificação da cromatina (Ng e Bird, 1999; Simonsson e Gurdon, 2004). Ocorre em moléculas de citosinas antecedendo moléculas de guaninas, em dinucleotídeos 5'CpG'3, transformando a citosina em 5-metil-citosina. A regulação da expressão gênica se dá devido à inibição direta da ligação dos fatores de transcrição em sequências específicas do DNA geralmente ricas em CpGs, onde se encontram os sítios de reconhecimento e ligação destes fatores (Robertson et al., 2004). A maquinaria transcricional requer contato com a citosina para que ocorra sua ligação com a dupla hélice do DNA, sendo esta ligação desfavorecida pela



metilação das CpGs (Robertson et al., 2004).

Nos mamíferos, a metilação do DNA é catalisada por duas classes de enzimas DNA metiltransferases. A DNA metiltransferase 1 (DNMT1) é uma enzima de manutenção, que metila dinucleotídeos CpG na fita nova de DNA após a replicação, sendo essencial na manutenção da metilação do DNA na divisão celular (Xu et al., 2010). As DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L são necessárias para a metilação *de novo* na formação dos gametas, na aquisição dos padrões de metilação dos genes *imprinted* e durante o desenvolvimento embrionário inicial (O'Doherty et al., 2012).

Tanto as alterações pós-traducionais das histonas, que serão tratadas mais adiante, quanto o padrão de metilação do DNA são cruciais para a regulação da expressão gênica, sendo a S-adenosilmetionina (SAM) o precursor ou substrato essencial para o fornecimento de grupamentos metil no processo de metilação do DNA (Jaenisch e Bird, 2003). O subproduto do metabolismo da SAM doando um grupo metil é a S-adenosilhomocisteína (SAH). Esta molécula pode atuar como inibidor da atividade DNA metiltransferase em outra rota potencial para modificação epigenética, via metionina/ácido fólico. Além disso, o uso da SAM resulta na produção de SAM descarboxilada, que é também um inibidor competitivo das DNA metiltransferases (Ross, 2003). A maior parte das alterações fisiológicas no padrão de metilação do genoma embrionário ocorre durante o desenvolvimento pré-implantacional, requerendo alta concentração de SAM (Young e Beaujean, 2004).

A susceptibilidade de embriões, na fase pré-implantacional, à perturbação epigenética foi demonstrada em várias espécies, incluindo humanos, ratos, ovinos e bovinos (Gosden et al., 2003; Maher et al., 2003; Allegrucci et al., 2004). Fatores ambientais como o *status* nutricional de doadoras de gametas e embriões e as condições de maturação de gametas e cultivo *in vitro* podem alterar o padrão de metilação do DNA, comprometendo o desenvolvimento embrionário (Young et al., 2001; Mann et al., 2004).

***Imprinting* genômico**

O *imprinting* genômico é um fenômeno controlado epigeneticamente, no qual os genomas materno e paterno se distinguem um do outro como resultado de uma metilação diferencial gameta específico, sendo que a presença de metilação resulta em uma estrutura de cromatina mais condensada e resistente à transcrição (Reik e Walter, 2001). A teoria mais aceita para explicar o *imprinting* genômico é a chamada "Teoria do Conflito Genético" (Haig e Graham, 1991), proposta a partir de observações sobre a participação dos genes *imprinted*, relacionados aos seus efeitos antagonísticos sobre o desenvolvimento do feto e da placenta. Exemplo disso é o gene paternalmente expresso, *IGF2*, que estimula o crescimento fetal, enquanto o gene maternalmente expresso, *IGF2R*, tende a diminuir o crescimento fetal (Reik e Dean, 2001), participando da regulação do *IGF2*.

A formação e o desenvolvimento das células germinativas e o início da embriogênese são períodos cruciais na determinação, aquisição e manutenção do padrão de *imprinting* genômico, sendo a regulação dos genes *imprinted* essencial para o crescimento fetal e a função placentária (Reik e Walter, 2001). Estudos sugerem que há desordens no padrão normal de *imprinting* em humanos associadas com alterações em crianças concebidas por ARTs (Chang et al., 2005; Katari et al., 2009). O efeito do cultivo *in vitro* no *imprinting* genômico foi observado pela primeira vez em ruminantes em um estudo com ovinos. Young et al. (2001) mostraram uma relação entre a *Large Offspring Syndrome (LOS)*, ou síndrome da cria grande, e alterações da expressão e do padrão de metilação do gene *IGF2R* em ovinos produzidos *in vitro*. Muito se tem discutido acerca de possíveis alterações epigenéticas em consequência do cultivo, da manipulação de embriões *in vitro* e da estimulação ovariana por hormônios exógenos (Market-Velker et al., 2010). Para Chang et al. (2005), a estimulação ovariana é o principal fator que pode resultar em erros no estabelecimento dos genes *imprinting* durante o uso de ARTs. Experimentos evidenciam que os mecanismos epigenéticos também estão envolvidos na mudança do perfil de genes durante a foliculogênese e a luteinização (Seneda et al., 2008). Portanto, parece plausível que o uso de hormônios exógenos para promover a produção de vários ovócitos maduros pode realmente induzir a erros de *imprinting*, que, posteriormente, podem levar a anomalias, síndromes ou doenças durante o desenvolvimento embrionário ou após o nascimento.

Modificações pós-traducionais das histonas

As histonas são proteínas nucleares que se associam ao DNA para formar a cromatina, sendo os principais componentes proteicos dela. A estrutura básica da cromatina é o nucleossomo, e seu DNA está associado a um octâmero de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e a uma molécula de histona H1, a qual se associa externamente ao DNA que envolve o octâmero. As histonas não são somente proteínas estruturais. São também fundamentais, mediante modificações pós-traducionais, para controle da expressão gênica, ativação do genoma, metilação do DNA e inativação do cromossomo X (Simonsson e Gurdon, 2004). Estas modificações estão associadas a uma maior compactação dos nucleossomos, sendo a cromatina mais compactada chamada de heterocromatina, e a menos compactada eucromatina. Quando as alterações pós-traducionais das histonas favorecem a uma maior compactação da cromatina, deixam inacessíveis os sítios de ligação dos fatores de transcrição.



É sabido que as modificações estão concentradas nas caudas das histonas e incluem principalmente acetilação e ubiquitinação de lisina, metilação de lisina e arginina e fosforilação de serina (Bernstein et al., 2007; Shi e Whetstone, 2007). Além disso, não só uma modificação em um local específico mas a quantidade com que ela ocorre como mono, di ou trimetilação de um aminoácido podem ter significado biológico diferente (Bottomley, 2004). A acetilação de histona contribui para o estabelecimento ou a manutenção de um ambiente permissivo à transcrição, embora não necessariamente causando ativação transcricional (Legube e Trouche, 2003). Em contraste, a desacetilação promove condensação da cromatina e a repressão da transcrição.

A acetilação favorece a atividade de transcrição pelo relaxamento das interações DNA-nucleossomo, as quais formam uma barreira para o recrutamento dos fatores de transcrição (Legube e Trouche, 2003). A metilação do DNA e as modificações das histonas estão intimamente correlacionadas (Cedar et al., 2009). A metilação covalente das histonas ocorre nos resíduos de arginina e lisina. Resíduos de lisina podem estar mono, di ou trimetilados, enquanto os de arginina podem estar monometilados (Bottomley, 2004). As duas modificações da H3 mais associadas com metilação do DNA são a metilação da lisina 4 e a da lisina 9 (H3K4me e H3K9me). Estes dois sítios de modificações da histona parecem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento e na diferenciação celular em mamíferos. Especificamente, a metilação do DNA está associada com a ausência de metilação da H3K4 e a presença de metilação na H3K9 (Eissenberg et al., 2010), reprimindo a transcrição.

A fosforilação desempenha papel importante no controle da transcrição, reparo do DNA, apoptose e condensação cromossômica (Cheung et al., 2000). Essa modificação contribui para a função estrutural e a arquitetura da cromatina, na maioria dos casos, por meio de fosforilação da serina ou da treonina (Fillingham e Greenblatt, 2008). Além dos processos regulados pela fosforilação da cauda N-terminal da histona, há evidências sugerindo que a fosforilação no interior da molécula e na região C-terminal também seria responsável pelas alterações na estrutura da cromatina e na função de regulação celular (Dawson et al., 2009). Além das modificações covalentes mais conhecidas, as histonas também podem ser modificadas por meio de ubiquitinação, glicosilação, SUMOilação e ADP-ribosilação (Strahl e Allis, 2000). A ubiquitina (Ub) é uma proteína de 76 aminoácidos, altamente conservada, presente em todos os organismos eucarióticos. Há vários processos celulares, incluindo proteólise, resposta ao estresse, regulação do ciclo celular, endocitose de sinalização e regulação da transcrição, que estão associados a esta molécula (Pickart, 2001). A ubiquitinação é um mecanismo de sinalização, e as informações transmitidas por esta marca podem depender da natureza da modificação, como mono ou poli-Ub, ou em quais resíduos de lisina ela ocorre (Di Fiore et al., 2003). Um exemplo disto é a monoubiquitinação das histonas H2A e H2B (Osley, 2006). No entanto, em mamíferos, ocorre apenas monoubiquitinação em ambas, Lys-119 da H2A (ubH2A) e Lys-120 da H2B (ubH2B; Osley, 2006).

A glicosilação de proteínas é um evento controlado por fatores que diferem entre os tipos celulares e entre as espécies. A ligação de resíduos de açúcares às proteínas é a mais complexa modificação pós-traducional que uma proteína pode receber (Spiro, 2002). A SUMOilação é uma importante modificação das proteínas, desempenhando função em uma ampla variedade de processos celulares. Envolve a ligação covalente de um grupo SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) em resíduos de lisina por meio de uma cascata enzimática semelhante, mas distinta, da via de ubiquitinação (Wilkinson e Henley, 2010). A ADP-ribosilação desempenha papel importante em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo sinalização inter e intracelular, transcrição, reparo do DNA, regulação do ciclo celular, necrose e apoptose (Hassa et al., 2006). Mono-ADP-ribosilação de proteínas celulares por meio de mecanismos não enzimáticos, geralmente, envolve a ligação de ADP-ribose com resíduos de lisina ou cisteína.

A reprogramação epigenética

As células germinativas são as únicas células que sofrem meiose, sendo as responsáveis pela transmissão das informações genéticas e epigenéticas para a próxima geração de indivíduos (Combes e Whitelaw, 2010). Um evento vital e específico de gametas é uma extensa reprogramação epigenética pela qual passam essas células para estarem aptas à fecundação e à formação de um embrião viável (Reik, 2007). Sabe-se que esta reprogramação deve ser totalmente estabelecida durante a gametogênese para a produção de um gameta viável. No entanto, quando exatamente começa e termina não está totalmente estabelecido em nenhuma espécie de mamífero, principalmente nas espécies domésticas de interesse econômico.

Experimentos de transferência nuclear demonstraram que tanto o genoma materno quanto o paterno são necessários para o desenvolvimento embrionário normal, por serem programados de maneira diferente, não sendo funcionalmente equivalentes (McGrath e Solter, 1984). Essas diferenças entre os genomas paterno e materno são atribuídas à expressão diferencial entre os alelos parentais de dezenas de genes *imprinted* durante o desenvolvimento, causadas por modificações epigenéticas diferenciais que ocorrem nos gametas (Reik e Walter, 2001).

Ovócitos e espermatozoides maduros têm um padrão epigenético completamente diferente. Além disso, a cromatina nas células espermáticas é compactada em grande parte com protaminas, e a dos ovócitos empacotada abundantemente com as proteínas histonas (Puri et al., 2010). Após a fecundação, os cromossomos



de origem paterna descondensam e remodelam a cromatina, com substituição das protaminas por histonas maternas, ocorrendo uma rápida desmetilação ativa do DNA (Puri et al., 2010). O genoma materno é desmetilado mais lentamente por um mecanismo passivo, após sucessivas replicações do DNA.

De acordo com Reik et al. (2001), para a maioria dos tipos celulares, as marcas epigenéticas se fixam uma vez que as células se diferenciam. Os padrões de metilação do genoma nas células somáticas diferenciadas são geralmente estáveis e herdáveis. No entanto, há dois períodos do desenvolvimento – nos embriões durante o período inicial de desenvolvimento e na formação das células germinativas – em que esses padrões são reprogramados, gerando células com amplos e distintos potenciais de desenvolvimento (Reik, 2007). Os genomas do espermatozoide e do ovócito estão transcricionalmente inativos e altamente metilados durante a fase pronuclear (Bestor, 2000). Em camundongos, após quatro horas da fecundação, o genoma do espermatozoide é ativamente desmetilado, enquanto o genoma do ovócito é passivamente desmetilado durante as sucessivas clivagens devido à remoção da DNMT1 do núcleo, após o estágio de duas células até oito-16 células (Sasaki e Matsui, 2008). Em bovinos, a desmetilação também ocorre logo após a fecundação (Dean et al., 2001). Esse processo de desmetilação do genoma no início do desenvolvimento só ocorre para regiões metiladas não *imprinted*. Os genes *imprinted* permanecem com o seu padrão de metilação advindo dos gametas, apesar do estado hipometilado em que se encontra o genoma (Reik e Walter, 2001). Durante a desmetilação do genoma materno em camundongos, a DNMT1 é excluída do núcleo e supõe-se que tal fato impeça a manutenção dos padrões de metilação do DNA durante a replicação. Isto permite que as células obtenham pluripotência e ocorre durante a transição de uma célula (zigoto) para 16 células (estágio de mórula; Sasaki e Matsui, 2008; Combes e Whitelaw, 2010).

Em camundongos, a metilação *de novo* ocorre no estágio de blastocisto na MCI, enquanto o trofoblasto é praticamente desprovido de metilação, sugerindo um papel importante na diferenciação das linhagens celulares (Santos et al., 2002). Em bovinos acontece no estágio de oito-16 células, concomitante com a ativação do genoma embrionário (Maalouf et al., 2008). Isoformas específicas da enzima DNMT1 são candidatas a estabelecer o padrão de metilação nas células germinativas (Xu et al., 2010), mas é possível que as DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L, necessárias para a metilação *de novo* no embrião, também realizem essa função nas células germinativas (O'Doherty et al., 2012). Evidências demonstraram que a DNMT1 está presente associada à cromatina no estágio de metáfase II (MII) de ovócitos e em embriões em fase pré-implantação (Kurihara et al., 2008), sendo suficiente para manter as marcas de metilação dos genes *imprinted* (Hirasawa et al., 2008).

Já é sabido que a estrutura da cromatina tem uma importante relação com o “Código das Histonas”, uma memória celular que é responsável por manter uma identidade diferenciada das células (Cheung et al., 2000). Certas modificações das histonas são conhecidas por serem essenciais para o estabelecimento da competência meiótica e para o desenvolvimento do ovócito (Kageyama et al., 2007). Entretanto, a maturação dos ovócitos é caracterizada por uma redução global na acetilação (Kim et al., 2003). Embora a fosforilação seja importante para a regulação da histona durante a espermatogênese (Meetei et al., 2002), a acetilação parece ser o tipo predominante de modificação das histonas na ovogênese. Kageyama et al. (2007) analisaram alterações globais na acetilação das histonas H3 e H4 durante o crescimento de ovócitos em camundongos, e mostraram que os níveis de acetilação nas lisinas K9 e K18 na histona H3, e em K5 e K12 em histona H4 aumentaram com a idade dos camundongos e crescimento dos ovócitos.

Nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário bovino, o padrão de metilação da H3K9 se comporta como o da metilação do DNA, ou seja, reduz a metilação da histona no estágio de duas a quatro células, ocorrendo a metilação *de novo* no estágio de oito células (Santos et al., 2003). Ao mesmo tempo, a H3K9 pode ser modificada por acetilação. Ocorre desacetilação no estágio de quatro células, seguida por acetilação *de novo* na fase de oito células. No estágio de blastocisto, tanto DNA quanto H3K9 estão hipermetilados na MCI, com um padrão menos metilado no trofoblasto. Esta pode ser a primeira assimetria relacionada ao surgimento de linhagens celulares específicas no desenvolvimento pós-fecundação (Santos et al., 2003).

No segundo ciclo de reprogramação, nas células germinativas primordiais, as marcas parentais são apagadas e a totipotência restaurada, iniciando o restabelecimento do *imprinting* genômico (Reik e Walter, 2001). Os genes *imprinted* perdem suas marcas de metilação e um padrão sexo-específico começa a ser restabelecido na gametogênese (Harlt e Jones, 2004). Um estudo recente realizado por Popp et al. (2010) mostrou que a desmetilação do DNA ou desprogramação nas células germinativas é um processo global e que a deficiência de citidina deaminase (AID) limita a herança epigenética transgeracional por interferir na eliminação dos padrões de metilação do genoma, indicando que a AID tem uma função crítica na reprogramação epigenética.

As principais modificações epigenéticas descritas acima podem ser influenciadas por fatores ambientais e pelas biotecnologias de reprodução assistida. Dentro deste contexto, a produção de animais clones por transferência nuclear tem sua eficiência comprometida, entre outros fatores, por uma ineficiente reprogramação epigenética do núcleo doador. Após a transferência nuclear de células somáticas (TNCS), os padrões epigenéticos precisam ser reprogramados de maneira correta no genoma de núcleos somáticos já diferenciados introduzidos no ovócito enucleado (Jouneau e Renard, 2003).



Durante a gametogênese e a fecundação natural, as marcas epigenéticas vão sendo estabelecidas por um longo período de tempo (Reik e Walter, 2001). Na TNCS, no entanto, um padrão epigenético somático adulto, que é normalmente muito estável, deve ser reprogramado em um curto período de tempo, antes da ativação do genoma embrionário (Jouneau e Renard, 2003). As regiões diferencialmente metiladas (DMR) de genes *imprinted* devem ser protegidas para não sofrerem esta reprogramação, mantendo, assim, essas marcas intactas no embrião clone (Reik e Walter, 2001), o que assegura um perfil de expressão gênica compatível com o desenvolvimento embrionário e o fetal normais. Para Reik e Walter (2001), o fato de que a grande maioria dos clones morre durante o desenvolvimento pode indicar que o processo de reprogramação é ineficiente.

Bourc'his et al. (2001) relataram alterações no padrão de metilação do DNA de embriões bovinos de quatro e oito células produzidos por transferência nuclear. Dean et al. (2001), em seus achados com embriões clones, notaram que tanto o processo de desmetilação passiva quanto o de metilação *de novo* não aconteceram nos mesmos padrões dos embriões normais. Dean et al. (2001) observaram que, no estágio de blastocisto, o estado de metilação das células da MCI estava relativamente normal, enquanto as células do trofoblasto encontravam-se anormalmente hipermetiladas. O estado de metilação da lisina 9 da H3 também mostrou um padrão semelhante, com altos níveis de metilação no trofotoderma do blastocisto de bovinos clones (Santos et al., 2003). Kishigami et al. (2006) observaram que a inibição da enzima histona desacetilase (HDAC), utilizando a tricostatina A (TSA), promoveu hiperacetilação de histonas, aumentando a eficiência da clonagem. Isto sugere que um estado de hipoacetilação pode ser um fator limitante no processo da clonagem, prejudicando o desenvolvimento embrionário.

Além disso, os animais clones frequentemente apresentam anormalidades, como alterações no desenvolvimento placentário e fetal e morte perinatal (Young et al., 2003), que são típicas de alterações em genes *imprinted*. Um padrão de desmetilação aberrante poderia levar à perda de marcações *imprinted* em regiões do DNA onde geralmente são mantidas estas marcas, como, por exemplo, na diferenciação dos tecidos na linhagem germinativa, onde não se sabe se todas as células do tecido em formação irão manter estas marcas (Reik e Walter, 2001). Defeitos epigenéticos descritos em animais clones incluem erros no processo de inativação do cromossomo X (Xue et al., 2002), no *imprinting* genômico (Mann et al., 2003), no padrão de metilação do DNA em genes específicos e em sequências repetitivas (Bourc'his et al., 2001), no padrão de acetilação e metilação de histonas (Santos et al., 2003), bem como alterações generalizadas na expressão gênica (Humpherys et al., 2002). Quanto melhor se conhecerem e se compreenderem os mecanismos moleculares que coordenam o processo da reprogramação epigenética e toda a regulação gênica que acontece durante a gametogênese e a embriogênese *in vivo* nos mamíferos, maior será a capacidade de se desenvolverem melhores sistemas de produção de embriões, viabilizando cada vez mais as técnicas de reprodução assistida.

Agradecimentos

O autor agradece à EMBRAPA, e à FAPESP pela bolsa de estudos concedida.

Referências

- Allegrucci C, Denning C, Priddle H, Young L.** Stem cell consequences of embryo epigenetic defects. *Lancet*, v.364, p.206-220, 2004.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES.** The mammalian epigenome. *Cell*, v.128, p.669-681, 2007.
- Bestor TH.** The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, v.9, p.2395-2402, 2000.
- Bonasio R, Tu S, Reinberg D.** Molecular signals of epigenetic states. *Science*, v.330, p. 612-16, 2010.
- Bottomley MJ.** Structures of protein domains that create or recognize histones modifications. *EMBO Rep*, v.5, p.464-469, 2004.
- Bourc'his D, Xu G-L, Lin C-S, Bollman B, Bestor TH.** Dnmt3L and the Establishment of Maternal Genomic Imprints. *Science*, v.294, p.2536-2539, 2001.
- Cedar H, Bergman Y.** Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*, v.10, p.295-304, 2009.
- Chang AS, Moley KH, Wangler M, Feinburg AP, DeBaun MR.** Association between Beckwith-Widemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients. *Fertil Steril*, v.83, p.349-54, 2005.
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P.** Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, v.103, p.263-271, 2000.
- Combes A, Whitelaw E.** Epigenetic reprogramming: enforcer or enabler of developmental fate? *Dev Growth Differ*, v.52, p.483-491, 2010.
- Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, Kouzarides T.** JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*, v.461, p.819-822, 2009.
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W.** Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.98, p.13734-13738, 2001.



- Di Fiore PP, Polo S, Hofmann K.** When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.4, p. 491-497, 2003.
- Eissenberg JC, Shilatfard A.** Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev Biol*, v.339, p.240-249, 2010.
- Fillingham J, Greenblatt JF.** A histone code for chromatin assembly. *Cell*, v.134, p.206-208, 2008.
- Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M.** Rare congenital disorders, *imprinted* genes, and assisted reproductive technology. *Lancet*, v.361, p.1975-1977, 2003.
- Haig D, Graham C.** Genomic imprinting and the strange case of the insulinlike growth factor II receptor. *Cell*, v.64, p.1045-1046, 1991.
- Hartl DL, Jones EW.** Genetics: analysis of genes and genomes. 6.ed. Boston, MA: Jones e Bartlett, 2004. 477p.
- Hassan PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO.** Nuclear ADP-Ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev*, v.70, p.789-829, 2006.
- Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, Tajima S, Li E, Jaenisch R, Sasaki, H.** Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev*, v.22, p.1607-1616, 2008.
- Humpherys D, Eggen K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR, Jaenisch R.** Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, p.12889-12894, 2002.
- Jaenisch R, Bird A.** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, v.33, p.245-254, 2003.
- Jouneau A, Renard JP.** Reprogramming in nuclear transfer. *Curr Opin Genet Dev*, v.13, p.486-491, 2003.
- Kageyama S, Liu H, Kaneko N, Ooga M, Nagata M, Aoki F.** Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction*, v.133, p.85-94, 2007.
- Katari S, Turan N, Bibikova M, Erinle O, Chalian R, Foster M, Gaughan JP, Coutifaris C, Sapienza C.** DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet*, v.18, p.3769-3778, 2009.
- Kim JM, Liu H, Tazaki M, Nagata M, Aoki F.** Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J Cell Biol*, v.162, p.37-46, 2003.
- Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T.** Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, v.340, p.183-189, 2006.
- Kurihara Y, Kawamura Y, Uchijima Y, Amamo T, Kobayashi H, Asano T, Kurihara H.** Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase1. *Dev Biol*, v.313, p.335-346, 2008.
- Legube G, Trouche D.** Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Rep*, v.4, p.944-947, 2003.
- Maalouf WE, Alberio R, Campbell KH.** Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. *Epigenetics*, v.3, p.199-209, 2008.
- Maher ER, Afnan M, Barratt CL.** Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs? *Hum Reprod*, v.18, p.2508-2511, 2003.
- Mann MR, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Latham KE, Bartolomei MS.** Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod*, v.69, p.902-914, 2003.
- Mann MR, Lee SS, Doherty AS, Verona RI, Nolen LD, Schultz RM, Bartolomei MS.** Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development*, v.131, p.3727-3735, 2004.
- Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MR.** Epigenetics, genomic imprinting and assisted reproductive technology. *Ann Endocrinol (Paris)*, v.71, p.237-238, 2010.
- McGrath J, Solter D.** Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, v.37, p.179-183, 1984.
- Meetei AR, Ullas KS, Vasupradha V, Rao MR.** Involvement of protein kinase A in the phosphorylation of spermatidal protein TP2 and its effect on DNA condensation. *Biochemistry*, v.41, p.185-195, 2002.
- Migicovsky Z, Kovalchuk I.** Epigenetic memory in mammals. *Front Genet*, v.2, art.28, 2011. doi: 10.3389/fgene.2011.00028
- Ng HH, Bird A.** DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*, v.9, p.158-163, 1999.
- O'Doherty AM, O'Shea LC, Fair T.** Bovine DNA methylation imprints are established in an oocyte size-specific manner, which are coordinated with the expression of the DNMT3 family proteins. *Biol Reprod*, v.86, p.1-10, 2012.
- Osley MA.** Regulation of histone H2A and H2B ubiquitylation. *Brief Funct Genomic Proteomic*, v.5, p.179-189, 2006.



- Pickart CM.** Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, v.70, p.503-533, 2001.
- Popp C, Dean WL, Feng S, Cokus SJ, Andrews SR, Pellegrini M, Jacobsen SE, Reik W.** Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, v.463, p.1101-1105, 2010.
- Puri D, Dhawan J, Mishra RK.** The paternal hidden agenda: epigenetic inheritance through sperm chromatin. *Epigenetics* v.5, p.386-391, 2010.
- Reik W.** Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, v.24, p.425-432, 2007.
- Reik W, Dean W.** DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis*, v.22, p.2838-2843, 2001.
- Reik W, Dean W, Walter J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, v.293, p.1089-1093, 2001.
- Reik W, Walter J.** Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, v.2, p.21-32, 2001.
- Robertson AK, Geiman TM, Sankpal UT, Hager GL, Robertson, KD.** Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3a *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, v.322, p.110-118, 2004.
- Ross SA.** Diet and DNA methylation interactions in cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*, v.983, p.197-207, 2003.
- Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W.** Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*, v.241, p.172-182, 2002.
- Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W.** Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, v.13, p.1116-2111, 2003.
- Sasaki H, Matsui Y.** Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet*, v.9, p.129-140, 2008.
- Seneda MM, Godmann M, Murphy BD, Kimmins S, Bordignon V.** Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in the porcine ovary. *Reproduction*, v.135, p.829-838, 2008.
- Shi Y, Whetstone JR.** Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell*, v.25, p.1-14, 2007.
- Simonsson S, Gurdon J.** DNA methylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol*, v.6, p.984-990, 2004.
- Spiro RG.** Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptides bonds. *Glycobiology*, v.12, p.43R-53R, 2002.
- Strahl B, Allis CD.** The language of covalent histone modification. *Nature*, v.403, p.41-45, 2000.
- Waddington CH.** Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, v.150, p.563-565, 1942.
- Whitelaw NC, Whitelaw E.** Transgene rational epigenetic inheritance in health and disease. *Curr Opin Genet Dev*, v.18, p.273-279, 2008.
- Wilkinson KA, Henley M.** Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J*, v.428, p.133-145, 2010.
- Xu F, Mao C, Ding Y, Rui C, Wu L, Shi A, Zhang H, Zhang L, Xu Z.** Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. *Curr Med Chem*, v.17, p.4052-4071, 2010.
- Xue F, Tian XC, Du F, Kubota C, Taneja M, Dinnyes A, Dai Y, Levine H, Pereira LV, Yang X.** Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet*, v.31, p.216-220, 2002.
- Young LE, Beaujean N.** DNA methylation in the preimplantation embryo: The differing stories of the mouse and sheep. *Anim Reprod Sci*, v. 82/83, p.61-78, 2004.
- Young LE, Fernandes K, Mcevoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD.** Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet*, v.27, p.153-154, 2001.
- Young LE, Schnieke AE, McCreath KJ, Wieckowski S, Konfortova G, Fernandes K, Ptak G, Kind AJ, Wilmut I, Pasqualino L, Feil R.** Conservation of IGF2-H19 and IGF2r imprinting in the sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech Dev*, v.120, p.1433-1442, 2003.
-