



Impactos das biotécnicas reprodutivas no controle epigenético de genes *imprinted*

Impact of reproductive biotechniques on the epigenetic regulation of imprinted genes

M.F. Martucci¹, F.F. Bressan^{1,2}, J.R. Sangalli¹, J.C. Silveira², F.V. Meirelles^{1,2}, L.C. Smith³, F. Percin^{1,2,3,4}

¹Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

³Department of Veterinary Biomedicine, Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

⁴Correspondência: fperecin@usp.br

Resumo

Técnicas de reprodução assistida (TRAs) são utilizadas nas medicina humana e veterinária com o objetivo principal de corrigir infertilidades adquiridas ou herdadas. A transferência nuclear de célula somática (TNCS) ocupa um lugar de destaque na veterinária pela possibilidade de geração de indivíduos geneticamente idênticos, o que permite a produção de rebanhos homogêneos de alto mérito genético, e serve como modelo de estudo para técnicas de reprogramação. Porém, a utilização de TRAs, e em especial da TNCS, é considerada responsável pelo aumento na geração de conceptos portadores de alterações durante e após os desenvolvimentos embrionário e fetal. A provável causa é a alteração na regulação da reprogramação epigenética devido à manipulação de gametas e embriões no período inicial do desenvolvimento, que leva a alterações na regulação epigenética de genes *imprinted*. Esta revisão discute como marcas epigenéticas e expressão de genes *imprinted* podem influenciar no desenvolvimento de conceptos bovinos produzidos por TNCS ou inseminação artificial (IA). O entendimento dos mecanismos epigenéticos relacionados aos desenvolvimentos embrionário e fetal, em especial daqueles relacionados à dinâmica das alterações epigenéticas envolvidas no *imprinting* genômico, deve contribuir para a elaboração de biotécnicas mais eficientes para a medicina regenerativa ou a produção animal.

Palavras-chave: bovino, desenvolvimento, epigenética, murino, humano, reprogramação.

Abstract

Assisted reproductive technologies (ARTs) are usually used in both human and veterinary medicine aiming the correction of heritable or acquired infertilities. The somatic cell nuclear transfer technique (SCNT) is of particular importance in veterinary as it enables the generation of genetically identical organisms, allowing the production of homogeneous genetically improved herds, and also serving as a model for reprogramming studies. However, the use of TRAs, SCNT in special, may be responsible for the increase of developmental-related abnormalities in the conceptuses. Such phenotypes are probably caused by a disruption in the epigenetic reprogramming due to the manipulation of gametes and embryos during the early development period, and therefore leading to disturbances in the epigenetic regulation of imprinted genes. The present review discusses how the epigenetic marks and expression of imprinted genes may influence the developmental competence of animals generated by SCNT or artificial insemination (AI). The understanding of the epigenetic mechanisms related to embryonic and fetal development, and in special, of those related to the epigenetic dynamics during genomic imprinting may contribute to the generation of efficient ARTs to be used in both regenerative medicine and animal production.

Keywords: bovine, development, epigenetics, human, murine, reprogramming.

Introdução

Tanto em humanos quanto em animais, técnicas de reprodução assistida (TRAs) vêm sendo amplamente empregadas, seja para a correção de condições de baixa fertilidade, infertilidades congênitas ou adquiridas, seja, como no caso da produção animal, para a geração de animais com maior valor econômico em menor tempo. Porém, maiores perdas gestacionais são observadas nessas condições, e as causas prováveis ainda não são bem elucidadas (Ceelen e Vermeiden, 2001; Lucifero et al., 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que as próprias TRAs, tais como a fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI, do inglês *intracytoplasmic sperm injection*) e a transferência nuclear de células somáticas (TNCS ou clonagem), provocam alterações epigenéticas nos conceptos

gerados, muitas vezes interferindo na capacidade de desenvolvimento a termo ou mesmo no nascimento de indivíduos saudáveis (Smith et al., 2012; Urrego et al., 2014).

É conhecido que, durante o período de desenvolvimento embrionário inicial, eventos críticos de remodelação da cromatina levam à expressão gênica necessária para a manutenção dos desenvolvimentos embrionário e fetal adequados. Nessa fase, fatores ambientais são capazes de modificar tais marcações epigenéticas. A estimulação hormonal e/ou a superovulação, a exposição dos gametas e dos embriões aos meios de cultivo, a micromanipulação de gametas e de embriões, entre outros procedimentos *in vitro*, já foram reportados como potenciais influências (Le Bouc et al., 2010; Market-Velker et al., 2010).

Dessa maneira, a presente revisão tem como objetivo descrever e discutir alguns mecanismos epigenéticos e as consequências de sua desregulação no desenvolvimento inicial em mamíferos, em especial em bovinos derivados de TRAs, destacando o possível efeito dessas biotecnologias na manutenção de marcas epigenéticas, especificamente no *imprinting* genômico dos indivíduos derivados.

Epigenética e desenvolvimento embrionário

A metilação do DNA, as modificações pós-traducionais nas proteínas histonas e a ação dos RNAs não codificadores são os principais mecanismos epigenéticos envolvidos no desenvolvimento embrionário, sendo responsáveis pelo estabelecimento e manutenção dos padrões de expressão gênica tecido-específicos por meio da repressão transcricional e da remodelação da cromatina (Li, 2002).

As modificações pós-traducionais nas proteínas histonas incluem acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação (Lacoste e Côté, 2003). As diferentes combinações entre as modificações covalentes das histonas formam um código, conhecido como “código das histonas”. Essas modificações pós-traducionais determinam a estrutura, o padrão de condensação e a atividade transcricional da cromatina (Strahl e Allis, 2000; Jenuwein e Allis, 2001).

Além das alterações diretas na estrutura da cromatina, as modificações pós-traducionais das histonas permitem a interação da cromatina com uma série de outras proteínas, com ação enzimática ou não (Berger, 2002). De modo geral, a acetilação das proteínas histonas está associada a genes transcionalmente ativos, enquanto sua metilação é geralmente associada à repressão transcricional. Outras possíveis modificações de histonas são a ubiquitinação, a fosforilação, a SUMOilação e ADP-ribosilação, entre outras (Bannister e Kouzarides, 2011).

A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos mais estudados (Bird, 2002; Yoo e Jones, 2006), a qual se dá pela ligação covalente de um grupo metil (CH₃) ao carbono da posição 5 da citosina de um dinucleotídeo CpG, que se transformará em 5-metilcitosina.

Nos mamíferos, a metilação do DNA tem papel importante na regulação da expressão gênica, na inativação do cromossomo X, no *imprinting* genômico e na modificação da cromatina, sendo sua correta regulação essencial para o desenvolvimento embrionário normal (Surani, 1998; Ng e Bird, 1999).

Os padrões de metilação do genoma nas células somáticas diferenciadas são geralmente estáveis e hereditários, entretanto, durante o desenvolvimento embrionário, a metilação do DNA se altera de forma orquestrada por meio da desmetilação e “de novo” metilação (“de novo” metilação: adição de grupamento metil em fita de DNA sem que a fita oposta contenha citosinas metiladas). No período da embriogênese, ou seja, durante o desenvolvimento das células germinativas, os padrões de metilação prévios são apagados e os genes ficam desmetilados em ambos os alelos. Posteriormente, um padrão de metilação específico para cada sexo é novamente estabelecido, determinando, dessa maneira, o *imprinting* genômico (Reik e Walter, 2001). Assim, a expressão de genes sujeitos ao *imprinting* genômico depende da sua herança, paterna ou materna. Nos genes *imprinted* paternos, o alelo herdado do pai é epigeneticamente modificado, prevenindo sua transcrição, o que leva à expressão somente do alelo herdado da mãe, e o contrário ocorre nos genes *imprinted* maternos (Ferguson-Smith e Surani, 2001; Jones e Takai, 2001).

Tais células primordiais germinativas continuarão seu desenvolvimento e sua diferenciação durante a embriogênese e também durante a vida pós-natal dos organismos, gerando os gametas. Logo após a fertilização, o embrião inicial passa por uma nova onda de desmetilação, que “apaga” quase todo o padrão de metilação herdado dos pais, dessa vez excetuando-se os genes *imprinted*, seguida de uma “de novo” metilação, o que determina os padrões de metilação e, conseqüentemente, a expressão gênica do embrião (Kafri et al., 1992).

O *imprinting* genômico foi descoberto há cerca de 30 anos, como resultado de experimentos de transferência pronuclear em camundongos (Surani; Barton; Norris, 1984) nos quais se observava contribuição diferencial dos pronúcleos paternos e maternos. Nos anos subsequentes, diversos genes *imprinted* foram identificados, majoritariamente pela identificação de marcas epigenéticas diferenciais na cromatina entre alelos paternos e maternos e pela determinação de diferenças na expressão alélica. Atualmente, cerca de 200 genes são conhecidos *imprinted* no genoma dos mamíferos, embora o número exato para cada espécie possa variar segundo a fonte de referência. É possível dizer que aproximadamente 100 genes são *imprinted* em humanos, 120 em camundongos e 20 em bovinos. E discute-se, ainda, se diversos outros são *imprinted* ou não (www.geneimprint.org; <http://igc.otago.ac.nz>). Vários genes *imprinted* estão envolvidos no desenvolvimento e

no crescimento fetal, enquanto outros influenciam o comportamento ou outras características (Delaval e Feil, 2004; Bressan et al., 2009).

Resultados preliminares obtidos por este grupo de pesquisa indicaram a existência de polimorfismos de base única (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) entre taurinos e zebuínos tanto na região diferencialmente metilada (DMR) quanto na região transcrita dos genes IGF2 e H19. A análise das sequências permitiu identificar, por meio dos polimorfismos, a origem parental dos alelos e seus padrões de metilação (Suzuki et al., 2011; Smith et al., 2015), como ilustra a Fig. 1.

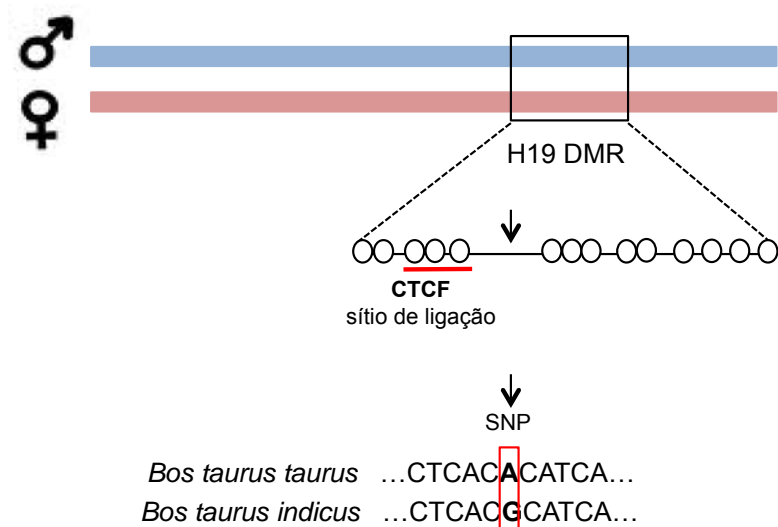


Figura 1. Identificação dos SNPs no sitio de ligação do CTCF no gene H19. Adaptado de Suzuki et al., 2011.

A expressão alélica de genes específicos pode explicar a teoria do conflito parental, no qual genes paternos maximizam o desenvolvimento fetal, e, reciprocamente, a fêmea se autoprotege, mediante a supressão da expressão de genes indutores de crescimento pelo alelo materno. O estado de *imprinting* de certos genes confere à fêmea um melhor controle sobre o desenvolvimento fetal, sem efeitos deletérios sobre isto ou sua própria vida (Moore e Haig, 1991; Reik e Walter, 2001).

Nesse contexto, o fenômeno de *imprinting* genômico tem sido demonstrado como essencial para a placentação e o desenvolvimento normais do organismo (Fowden et al., 2006). Os períodos de embriogênese e placentação são particularmente suscetíveis a alterações na expressão gênica, incluindo a regulação dos genes *imprinted* (Nothias et al., 1995). Alterações na aquisição ou na manutenção de genes *imprinted* são determinantes não somente durante a gestação mas também durante a vida pós-natal e geralmente levam a fenótipos letais durante o desenvolvimento inicial ou, então, a fenótipos relacionados a diversas síndromes e enfermidades pós-natais (Smith et al., 2015).

Consequências das TRAs no *imprinting* genômico

A utilização das TRAs, como a fertilização *in vitro* (FIV) em humanos e animais ou a clonagem por transferência de núcleo em animais, ainda que utilizadas com o objetivo de aumentar ou otimizar a geração de novos indivíduos, frequentemente resulta em proles com alteração no peso ao nascimento e taxas de sobrevivência neonatal reduzidas (Li, 2002; Smith et al., 2015).

Em humanos e camundongos, alterações nas marcações epigenéticas, tais como a metilação de DNA e a modificação pós-traducional de proteínas histonas (Li, 2002), foram observadas nos genes *imprinted* IGF2, H19, SNURF, PEG3, GNAS, entre outros, após a realização de TRAs (Laprise, 2009).

Uma condição bastante conhecida é o nascimento de bebês macrossômicos ou crias grandes, situação conhecida em ruminantes por síndrome da cria gigante (do inglês *large offspring syndrome* ou LOS; Young et al., 1998). A LOS assemelha-se à síndrome Beckwith–Wiedemann (do inglês *Beckwith–Wiedemann syndrome* ou BWS) em humanos. Ambas podem ter como causa modificações exclusivamente epigenéticas que levam a distúrbios no *imprinting* da região de controle do *imprinting* (do inglês *imprinting control region* ou ICR) 1 e 2 do gene IGF2, o que provoca sua expressão bialélica e a redução na expressão do H19 (Smith et al., 2012).

Embora a clonagem de mamíferos tenha sido alcançada com sucesso, a porcentagem da prole viva é baixa, principalmente devido ao tamanho fetal reduzido e à menor quantidade de sítios de implantação placentários. Estudos atribuem essas alterações à reprogramação anormal das células doadoras de núcleo usadas para a clonagem, o que provoca, ademais, uma elevada mortalidade pós-natal (Suzuki et al., 2011; Maiorca et al.,

2015).

Alterações placentárias graves no saco vitelino bem como em sua vasculatura, anomalias cardiovasculares, perturbação das funções imunológicas, aumento do tamanho corporal (síndrome da cria grande ou gigantismo) e múltiplos defeitos em diversos órgãos também são atribuídos a alterações nos padrões epigenéticos de animais gerados por transferência nuclear (Maiorca et al., 2015).

Os distúrbios de desenvolvimento encontrados em animais clonados têm sido atribuídos aos tratamentos artificiais das células germinativas e dos embriões, aos padrões de expressão gênica alterados, e a perturbações epigenéticas (Maiorca et al., 2015). A incapacidade dos oócitos de restaurar completamente o estado diferenciado de uma célula somática a seu estado pluripotente e indiferenciado é normalmente evidenciada por padrões aberrantes de metilação do DNA estabelecidos por meio do genoma durante o desenvolvimento do blastocisto (Suzuki et al., 2011).

Tais modificações epigenéticas são barreiras à reprogramação completa e adequada *in vitro* (Pasque et al., 2011). Portanto, agentes modificadores de cromatina (AMCs) que promovam a desmetilação do DNA e/ou a abertura da cromatina, como os inibidores de histona deacetilases (HDACis - *histone deacetylase inhibitors*), vêm sendo empregados na tentativa de aumentar a eficiência da clonagem, embora ainda sem resultados reproduzíveis (Kishigami et al., 2006; Sangalli et al., 2012, 2014; Bressan et al., 2015).

Em bovinos, evidências recentes obtidas por este grupo de pesquisas (Perecin et al., 2009; Suzuki et al., 2009, 2011; Smith et al., 2015), bem como por outros pesquisadores (Couldrey e Lee, 2010; Hori et al., 2010), demonstraram que as alterações epigenéticas em genes *imprinted* estão relacionadas à baixa eficiência da técnica de clonagem por transferência nuclear. Acredita-se que algumas das anormalidades observadas em animais produzidos por TNCS, tais como a LOS, podem estar associadas ao gene IGF2R. Mecanismos específicos para a alteração do *status imprinted* de um gene específico, apesar de ainda não reportados, começam a ser discutidos com a utilização da engenharia genética de precisão do sistema CRISPR/cas9 (Bashtrykov et al., 2015).

Regulação do imprinting no locus H19/IGF2

A importância da regulação do *imprinting* genômico na geração e no desenvolvimento de indivíduos saudáveis foi demonstrada por Kono e colaboradores, em 2004, quando se provou que o nascimento de camundongos partenogênicos era possível por meio da correção da relação de expressão entre os genes H19 e IGF2. Uma vez que o processo de aquisição do *imprinting* genômico ocorre nas fases finais da gametogênese, oócitos recuperados antes desse período (antes do período de crescimento) são considerados neutros em relação ao *imprinting*, e ambos, H19 e IGF2, são expressos. Mediante a deleção do H19 nesses oócitos, consequentemente interferindo no *imprinting* do IGF2, foi demonstrado que oócitos partenogênicos contendo a expressão adequada de H19/IGF2 foram capazes de gerar indivíduos vivos a termo (Kono et al., 2004). A regulação do *imprinting* nesse locus está descrita na Fig. 2.

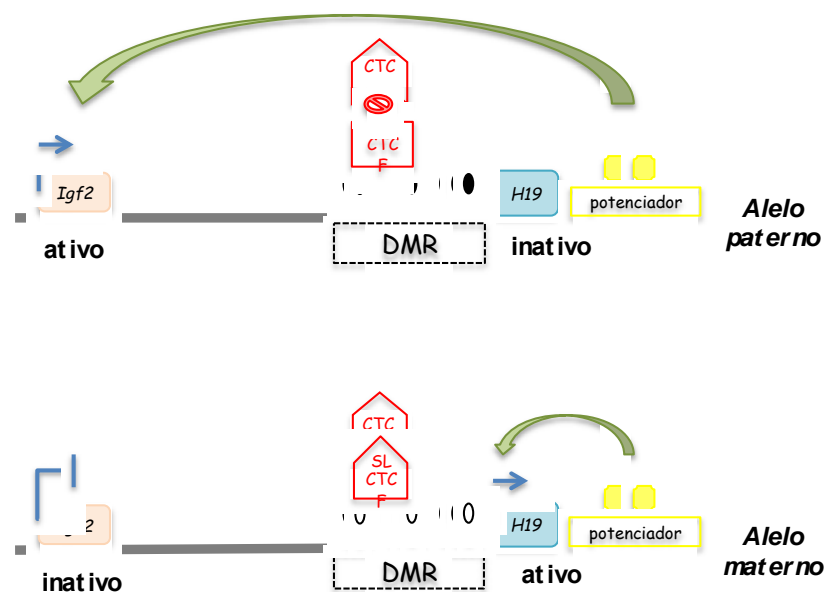


Figura 2. Mecanismo de ativação e inibição da transcrição dos genes imprinted IGF2 e H19.

O alelo materno do gene H19 é ativo, por isso desmetilado, enquanto o alelo paterno está inativo, característica conferida pela metilação do DNA e pela maior resistência da cromatina paternal à ação de enzimas

nucleases (Sasaki et al., 2000). O H19, que produz um RNA não codificante, é fortemente expresso em tecidos embrionários e extraembrionários durante o desenvolvimento, e sua regulação é expressamente diminuída após o nascimento (Ideraabdullah et al., 2008).

O primeiro gene *imprinted* a ser descrito foi o gene IGF2R em camundongos (Barlow et al., 1991). Esse gene *imprinted* paterno e expresso pelo alelo materno é um regulador negativo do crescimento fetal por meio do sequestro de IGF2 para o interior de lisossomos e sua subsequente degradação (Lau et al., 1994; Ludwig et al., 1996; Murphy e Jirtle, 2003). Em ovelhas, embriões partenogênicos que expressam altos níveis de IGF2R possuem crescimento retardado quando comparados aos controles (Young et al., 2003). A ausência da expressão do IGF2R em embriões ovinos submetidos a condições de cultivo *in vitro*, como já discutido, está associada ao crescimento fetal exacerbado ou LOS (Young et al., 2001), de tal maneira que uma patente que objetiva o diagnóstico de LOS em embriões produzidos *in vitro* por meio dos níveis de IGF2R já foi depositada (Patent n. WO200018902-A).

A regulação do *imprinting* no locus do IGF2R inclui as DMRs, as modificações pós-traducionais de proteínas histonas e a presença do transcrito antisseno do IGF2R, conhecido com *Airn*. As regiões de metilação do gene IGF2R incluem a ilha CpG presente na região promotora do gene, denominada DMR1, e outra situada no íntron 2, chamada DMR2. A importância da DMR1 no controle epigenético do gene IGF2R ainda permanece indefinida. Em murinos, a metilação do alelo materno na DMR2 determina a inibição da expressão do IGF2r no alelo paterno, pois, a partir do alelo paterno não metilado, há transcrição de um RNA não codificador denominado *Airn*, que impede a expressão paterna do IGF2r (Sleutels et al., 2002; Delaval e Feil, 2004). A regulação do *imprinting* nesse locus está descrita na Fig. 3. No entanto, evidências demonstram que a metilação na DMR2 não é determinante ou fundamental no estabelecimento do *imprinting* genômico do gene IGF2R em algumas espécies, como nos marsupiais, nos quais o IGF2R é *imprinted* apesar da ausência da DMR2 (Killian et al., 2001); ou em humanos, que apresentam expressão bialélica do IGF2R apesar de possuírem a DMR2 (Riesewijk et al., 1996, 1998).

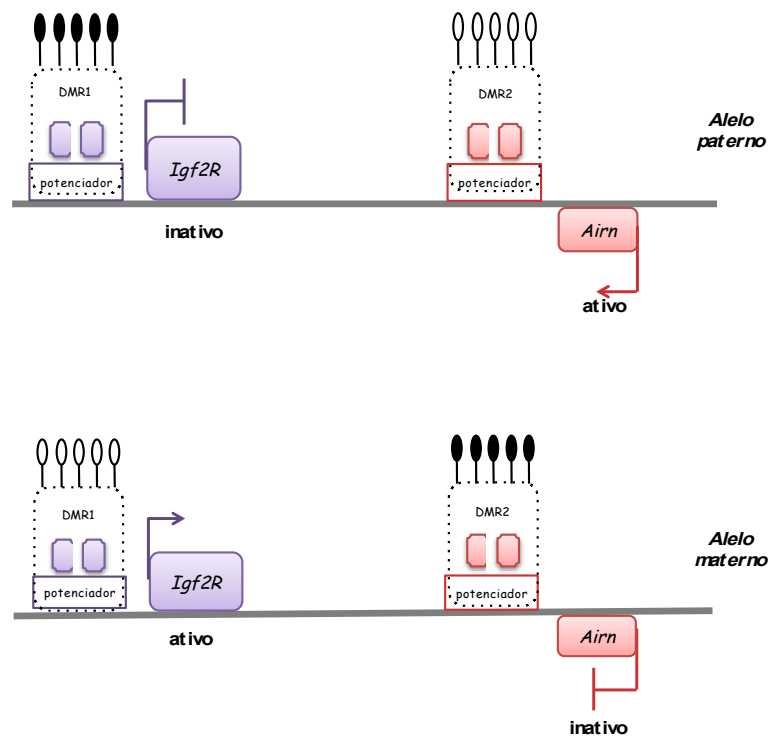


Figura 3. Mecanismo de ativação e inibição da transcrição dos genes imprintados IGF2R e *Airn*.

Por outro lado, acredita-se que a manutenção do *imprinting* genômico seja mais dependente de modificações nas proteínas histonas, o que impede a perda de *imprinting* durante a onda de desmetilação que ocorre logo após a fertilização (Wagschal et al., 2008).

Considerações finais

Erros epigenéticos podem ser associados a fenótipos pré e pós-natal indesejáveis em animais, sendo estes os prováveis principais responsáveis pela baixa eficiência das biotécnicas da reprodução atuais. Estratégias para a modificação epigenética durante o processo de reprogramação nuclear já são empregadas, porém com



resultados ainda insatisfatórios (Sangalli et al., 2014). O melhor entendimento dos mecanismos epigenéticos relacionados aos desenvolvimentos embrionário e fetal, em especial aqueles relacionados à dinâmica das alterações epigenéticas envolvidas no *imprinting* genômico, representa um importante avanço na busca por protocolos de produção *in vitro* de embriões que minimizem as alterações epigenéticas observadas, a fim de aumentar a eficiência nas taxas de produção embrionária.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio financeiro: Fapesp 2010/19768-8, 2013/08135-2, CNPq 479135/2013-4 e Capes.

Referências

- Bannister AJ, Kouzarides T.** Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, v.21, p.381-395, 2011.
- Barlow DP, Stöger R, Herrmann BG, Saito K, Schweifer N.** The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature*, v.349, n.6304, p.84-87, 1991.
- Bashtrykov P, Kungulovski G, Jeltsch A.** Correction of aberrant imprinting by allele specific epigenome editing. *Clin Pharmacol Ther*, 2015. doi: 10.1002/cpt.295.
- Berger SL.** Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, v.12, p.142-148, 2002.
- Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, v.16, p.6-21, 2002.
- Bressan FF, De Bem THC, Perecin F, Lopes FL, Ambrosio CE, Meirelles FV, Miglino MA.** Unearthing the roles of imprinted genes in the placenta. *Placenta*, v.30, p.823-834, 2009.
- Bressan FF, Fantinato-Neto P, Andrade GM, Sangalli JR, Sampaio RV, Silveira JC, Perecin F, Meirelles FV.** Challenges and perspectives to enhance cattle production via *in vitro* techniques: focus on epigenetics and cell-secreted vesicles. *Ciênc Rural*, v.45, p.1879-1886, 2015.
- Ceelen M, Vermeiden JP.** Health of human and livestock conceived by assisted reproduction. *Twin Res*, v.4, p.412-416, 2001.
- Couldrey C, Lee RS.** DNA methylation patterns in tissues from mid-gestation bovine fetuses produced by somatic cell nuclear transfer show subtle abnormalities in nuclear reprogramming. *BMC Dev Biol*, v.10, p.27, 2010.
- Delaval K, Feil R.** Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev*, v.14, p.188-195, 2004.
- Ferguson-Smith AC, Surani MA.** Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science*, v.293, n.5532, p.1086-1089, 2001.
- Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M.** Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm Res*, v.65, suppl.3, p.50-58, 2006.
- Hori N, Nagai M, Hirayama M, Hirai T, Matsuda K, Hayashi M, Tanaka T, Ozawa T, Horike S.** Aberrant CpG methylation of the imprinting control region KvDMR1 detected in assisted reproductive technology-produced calves and pathogenesis of large offspring syndrome. *Anim Reprod Sci*, v.122, p.303-312, 2010.
- Ideraabdullah FY, Vigneau S, Bartolomei MS.** Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutat Res*, v.647, p.77-85, 2008.
- Jenuwein T, Allis CD.** Translating the histone code. *Science*, v.293, n.5532, p.1074-1080, 2001.
- Jones PA, Takai D.** The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, v.293, n.5532, p.1068-1070, 2001.
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, Mccarrey J, Cedar H, Razin A.** Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*, v.6, p.705-714, 1992.
- Killian JK, Nolan CM, Stewart N, Munday BL, Andersen NA, Nicol S, Jirtle RL.** Monotreme IGF2 expression and ancestral origin of genomic imprinting. *J Exp Zool*, v.291, p.205-212, 2001.
- Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan N Van, Wakayama S, Bui H-T, 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.
- Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park ES, Seo J-S, Ogawa H.** Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, v.428, n.6985, p.860-864, 2004.
- Lacoste N, Côté J.** [The epigenetic code of histones]. *Méd Sci*, v.19, p.955-959, 2003.
- Laprise SL.** Implications of epigenetics and genomic imprinting in assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev*, v.76, p.1006-1018, 2009.
- Lau MM, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL.** Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev*, v.8, p.2953-2963, 1994.
- Le Bouc Y, Rossignol S, Azzi S, Steunou V, Netchine I, Gicquel C.** Epigenetics, genomic imprinting and



- assisted reproductive technology. *Ann Endocrinol*, v.71, p.237-238, 2010.
- Li E.** Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, v.3, p.662-673, 2002.
- Lucifero D, Mann MRW, Bartolomei MS, Trasler JM.** Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet*, v.13, p.839-849, 2004.
- Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercole AJ, Davenport ML, Efstratiadis A.** Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. *Dev Biol*, v.177, p.517-535, 1996.
- Maiorka PC, Favaron PO, Mess AM, Dos Santos CR, Alberto ML, Meirelles FV, Miglino MA.** Vascular Alterations Underlie Developmental Problems Manifested in Cloned Cattle before or after Birth. *PloS one*, v. 10, n. 1, p. e0106663, 13 jan, 2015.
- Market-Velker BA, Fernandes AD, Mann MRW.** Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance. *Biol Reprod*, v.83, p.938-950, 2010.
- Moore T, Haig D.** Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet*, v.7, p.45-49, 1991.
- Murphy SK, Jirtle RL.** Imprinting evolution and the price of silence. *BioEssays*, v.25, p.577-588, 2003.
- Ng HH, Bird A.** DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*, v.9, p.158-163, 1999.
- Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, Depamphilis ML.** Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem*, v.270, p.22077-22080, 1995.
- Pasque V, Jullien J, Miyamoto K, Halley-Stott R. P, Gurdon JB.** Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. *Trends Genet*, v.27, p.516-525, 2011.
- Perecin F, Méo SC, Yamazaki W, Ferreira CR, Merighe GKF, Meirelles FV, Garcia JM.** Imprinted gene expression in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos and chorio-allantoic membranes. *Genet Mol Res*, v.8, p.76-85, 2009.
- Reik W, Walter J.** Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, v.2, p.21-32, 2001.
- Riesewijk AM, Schepens MT, Welch TR, van den Berg-Loonen EM, Mariman EM, Ropers HH, Kalscheuer VM.** Maternal-specific methylation of the human IGF2R gene is not accompanied by allele-specific transcription. *Genomics*, v.31, p.158-166, 1996.
- Riesewijk AM, Xu YQ, Schepens MT, Mariman EM, Polychronakos C, Ropers HH, Kalscheuer VM.** Absence of an obvious molecular imprinting mechanism in a human fetus with monoallelic IGF2R expression. *Biochem Biophys Res Commun*, v.245, p.272-277, 1998.
- Sangalli JR, Chiaratti MR, De Bem THC, de Araújo RR, Bressan FF, Sampaio RV, Perecin F, Smith LC, King WA, Meirelles FV.** Development to term of cloned cattle derived from donor cells treated with valproic acid. *PloS one*, v.9, n.6, p.e101022, 2014.
- Sangalli JR, De Bem THC, Perecin F, Chiaratti MR, Oliveira L de J, de Araújo RR, Valim Pimentel JR, Smith LC, Meirelles FV.** Treatment of nuclear-donor cells or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. *Cell Reprogram*, v.14, p.235-247, 2012.
- Sasaki H, Ishihara K, Kato R.** Mechanisms of *Igf2/H19* imprinting: DNA methylation, chromatin and long-distance gene regulation. *J Biochem*, v.127, p.711-715, 2000.
- Sleutels F, Zwart R, Barlow DP.** The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature*, v.415, n.6873, p.810-813, 2002.
- Smith LC, Suzuki J, Goff AK, Filion F, Therrien J, Murphy BD, Kohan-Ghadr HR, Lefebvre R, Brisville AC, Buczinski S, Fecteau G, Perecin F, Meirelles FV.** Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod Domest Anim*, v. 47, suppl.4, p.107-114, 2012.
- Smith LC, Therrien J, Filion F, Bressan F, Meirelles FV.** Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes SNRPN, H19/IGF2, and IGF2R. *Frontiers Genet*, v.6, p.58, 2015.
- Strahl BD, Allis CD.** The language of covalent histone modifications. *Nature*, v.403, n.6765, p.41-45, 2000.
- Surani MA; Barton SC, Norris ML.** Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*. v. 308, n. 5959, p. 548-50, 5 abr .1984.
- Surani MA.** Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell*, v.93, p.309-312, 1998.
- Suzuki J, Therrien J, Filion F, Lefebvre R, Goff AK, Perecin F, Meirelles FV, Smith LC.** Loss of methylation at H19 DMD is associated with biallelic expression and reduced development in cattle derived by somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, v.84, p.947-956, 2011.
- Suzuki J, Therrien J, Filion F, Lefebvre R, Goff AK, Smith LC.** In vitro culture and somatic cell nuclear transfer affect imprinting of SNRPN gene in pre- and post-implantation stages of development in cattle. *BMC Dev Biol*, v.9, p.9, 2009.
- Urrego R, Rodriguez-Osorio N, Niemann H.** Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics*, v.9, p.803-815, 2014.
- Wagschal A, Sutherland HG, Woodfine K, Henckel A, Chebli K, Schulz R, Oakey RJ, Bickmore WA, Feil**



R. G9a histone methyltransferase contributes to imprinting in the mouse placenta. *Mol Cell Biol*, v.28, p.1104-1113, 2008.

Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, v.5, p.37-50, 2006.

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, Loi P, Feil R. Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech Dev*, v.120, p.1433-1442, 2003.

Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod*, v.3, p.155-163, 1998.
