

## EPIGENÉTICA EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: RAZONES Y EVIDENCIAS PARA UNA REFLEXIÓN

Ariadna Brotons <sup>1,2\*</sup>, Ana A. Fernández-Peinado <sup>1</sup>, Antonio Moya <sup>1</sup>, Paz Ibañez <sup>1</sup>, Francisco J. Vidal-Iglesias <sup>2</sup>, José Solla-Gullón <sup>2</sup>, Jesús Iniesta <sup>2</sup>

<sup>1</sup>In Vitam Centro de Medicina Reproductiva, Avenida Universidad, 24, 03202, Elche, Alicante, España.

<sup>2</sup>Instituto Universitario de Electroquímica, Universidad de Alicante, Carretera de San Vicente del Raspeig s/n, 03080, Alicante, España.

[ariadna@invitam.es](mailto:ariadna@invitam.es)

**Resumen:** Los procesos epigenéticos producen cambios covalentes en la cadena de ADN sin alteración en la secuencia de bases nitrogenadas. Una de las modificaciones epigenéticas más relevantes es el proceso de metilación de citosina. Este proceso es de vital importancia para mantener el silenciamiento génico en el desarrollo normal, la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X. Así, por ejemplo, cuando se producen alteraciones en la impronta, estos pueden desencadenar enfermedades, especialmente aquellas relacionadas con defectos en el desarrollo embrionario y el proceso neoplásico. En los últimos años se ha visto que mediante el uso de técnicas de reproducción asistida (TRAs), se pueden ver aumentados los desórdenes de este tipo, motivación suficiente por la que creemos que resulta de interés un mayor conocimiento de las modificaciones epigenéticas y su relación con numerosas enfermedades y disfunciones tras el uso de TRAs, con notables consecuencias sobre el manejo, tratamiento y prevención en el futuro de enfermedades en recién nacidos. En este trabajo, se describen los mecanismos de las modificaciones epigenéticas, más concretamente la metilación de citosina, las implicaciones que tiene dicha metilación de ADN sobre disfunciones y desarrollo de enfermedades en recién nacidos, los factores implicados en TRAs causantes y/o transmisión de la metilación de ADN y, finalmente, las metodologías analíticas para la determinación del grado de metilación en ADN.

**Palabras clave:** Impronta, epigenética, metilación de citosina, ADN, FIV, ICSI

**Abstract:** Epigenetic events lead to covalent modifications at the DNA chain without mutagenic alterations in the DNA sequence. One of the most relevant epigenetic modifications corresponds to the methylation process of cytosine. The above process is of outstanding importance to keep the gene silencing of normal development, genomic imprinting and inactivation of chromosome X. Thus, for instance, when the genomic imprinting suffers alterations, it can trigger the appearance of diseases, mainly those related to defects during the embryonic development or in neoplastic processes. Over the last few years, it has been observed that via the use of assisted reproductive techniques (ARTs) a number of the above disorders and dysfunctions can be proliferated, reason enough for which we strongly demand a more profound knowledge about the epigenetic modifications and their relationships with a wide number of diseases and dysfunctions after ARTs, with notable consequences in the management, treatment and prevention of diseases in newborn babies. In this work, the authors describe the mechanisms involved in epigenetic modifications -more particularly cytosine methylation-, the implications of cytosine methylation at DNA upon dysfunctions and development of diseases in newborn babies, causal factors implicated in ARTs and/or transmission of DNA methylation and, finally, the analytical methodologies used for the determination of methylation grade in DNA.

**Key words:** Imprinting, epigenetics, DNA methylation of cytosine, IVF, ICSI

### INTRODUCCIÓN

Entre un 10 y un 15% de la población de la sociedad moderna padece problemas de esterilidad/infertilidad, por lo que cada vez son más utilizadas las técnicas de reproducción asistida (TRA), y el número de niños nacidos gracias a ellas ha aumentado. Son muchos los estudios que aseguran que, tras el empleo de estas técnicas, existe un incremento del riesgo de crecimiento intrauterino restringido, parto pretérmino (Oakes CC et al., 2007), muerte fetal intrauterina (Ziller MJ et al., 2011), alteraciones

de los cromosomas sexuales (Li JY et al., 2004), cardiopatías (Hata K et al., 2002), síndrome de Beckwith-Wiedemann (Davis TL et al., 2000) y síndrome de Angelman (Ludwig M et al., 2005), aunque también existen autores que aseguran que aún no son suficientes las evidencias que confirmen una estrecha relación de las TRA con estos dos síndromes (Li JY et al., 2004). Las posibles causas del incremento de estas patologías, en comparación con los recién nacidos procedentes de embarazos espontáneos, parecen estar asociadas a alteraciones ya existentes en los

gametos de los padres o, por otra parte, a factores directamente derivados de las TRA. A lo largo de los años las causas cromosómicas se han estudiado ampliamente, sin embargo, las modificaciones en la expresión de genes que no se encuentran en la secuencia del ADN, conocidas como modificaciones epigenéticas (herencia epigenética) han sido menos estudiadas. En este artículo intentaremos ampliar este concepto y analizar en detalle las posibles consecuencias que estas alteraciones del ADN pueden producir en los futuros niños nacidos gracias a las TRA.

### EPIGENÉTICA

Los cambios epigenéticos son modificaciones covalentes de la cadena de ADN que no originan cambios en la secuencia de bases nitrogenadas (Wolffe AP y Matzke MA, 1999). La epigenética, por ejemplo, nos permite explicar la diferencia existente entre el ser humano y el chimpancé a pesar de compartir el 99% de los genes. Los tres principales tipos de información epigenética son: modificación de histonas, metilación de la citosina e impronta genética.

### MODIFICACIÓN DE HISTONAS

Las histonas pueden ser modificadas tras la traducción, lo que cambia sus propiedades de unión al ADN y a proteínas nucleares. Estas modificaciones, que pueden ser heredadas, influyen en la expresión génica y cambian la arquitectura local de la cromatina. Entre las modificaciones covalentes más importantes que pueden sufrir las histonas encontramos la acetilación, la metilación y la fosforilación. Hoy en día parece claro que determinados patrones de modificación de histonas

conducen a determinadas patologías entre las que podrían encontrarse, además de patologías tumorales, patologías inflamatorias de localización broncopulmonar como el asma.

### METILACIÓN DE ADN

La metilación, descrita por primera vez en los años 70 (Holliday R y Pugh JE, 1975), es una modificación del ADN, en la que un grupo metilo es transferido desde la S-adenosilmetionina a una posición C-5 de citosina por una ADN-5 metiltransferasa (DNMT) (Laird PW, 2003) dando lugar a la formación de la metilcitosina (mC), como se muestra en la Figura 1.

En las células somáticas humanas, las mC constituyen el 1% del total de las bases del ADN y en la mayoría de los casos se presentan en forma de dinucleótidos -CpG-. Estos dinucleótidos no están distribuidos de forma uniforme, sino que en el 98% del genoma los CpG están presentes en un promedio de uno por cada 80 dinucleótidos, existiendo regiones de 200 pb a varias kilobases

que tienen una frecuencia cinco veces mayor de dinucleótidos CpG, llamadas "islas CpG". En general, estas islas se localizan en la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión del gen cuando se encuentran hipermetiladas (Rodríguez-Dorantes M et al., 2004). En los últimos años también se ha observado metilación de las citosinas en células embrionarias en dinucleótidos CpA y CpT (Lister R y Ecker JR, 2009, Ziller MJ et al., 2011).

Existen dos tipos de metilación. La primera corresponde a la metilación de mantenimiento, que añade grupos metilo a cadenas de ADN en lugares opuestos a los metilados en la cadena madre, provocando que las moléculas hijas de ADN mantengan un patrón de metilación después de la división celular. La segunda corresponde a la metilación de novo, que añade grupos metilo en posiciones totalmente nuevas, pudiendo cambiar el patrón de metilación en una región localizada del genoma.

Inicialmente se pensó que las células normales estaban sin metilar, a

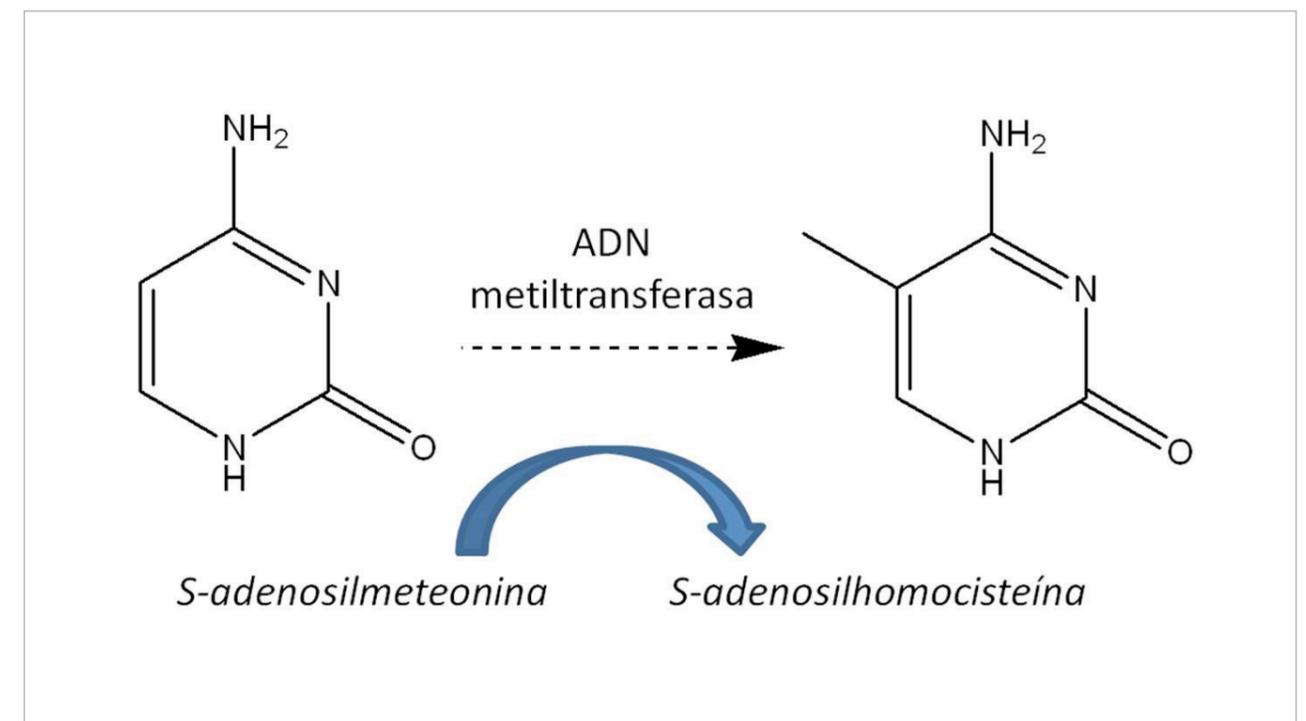


Figura 1: Proceso de metilación de la citosina.



líneas germinales de ambos sexos en los estadios fetales tardíos y continúa hasta el nacimiento (Thonneau P et al., 1991). En las células germinales femeninas (ovocitos), el restablecimiento del imprinting se produce durante el crecimiento y no se termina hasta la ovulación de cada ciclo menstrual, repitiéndose durante toda la vida reproductiva de la mujer (Boissonnas CC et al., 2013). En el caso de las células germinales masculinas se termina el proceso de imprinting durante la gametogénesis y durante el estadio de espermatide (De Kretser DM, 1997). En el modelo de ratón, se produce una desmetilación entre los días 8 y 13.5 post coito, provocando el borrado de todas las marcas de metilación (Hajkova P et al., 2008). La remetilación comienza antes del nacimiento (15.5-18.5 días postcoito) tanto en las hembras como en los machos, pero no se completa hasta el nacimiento (Li JY et al., 2004) Por el contrario, la metilación de novo se completa durante la fase final de maduración, justo antes o durante la ovulación de los ovocitos (Dohle GR et al., 2002, Simoni M et al., 1997).

Casi todo el conocimiento que tenemos sobre el imprinting de células germinales es en el modelo de ratón, siendo escasos los estudios en células germinales humanas. Existen dos estudios que confirman la metilación del H19 de forma diferencial entre las espermatogonias y los espermatocitos tipo I (Joana Marques C et al., 2011). Hasta ahora se ha considerado que en el modelo humano pasa algo parecido al de ratón, de modo que las marcas de metilación se deben adquirir antes de entrar en meiosis, pero no se sabe si esto ocurre durante el desarrollo fetal, en el periodo perinatal y/o durante la pubertad.

## RELACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES EPIGENÉTICAS Y LAS TRAS

Aunque el papel de la metilación del ADN no está totalmente entendido, sabemos que una de sus funciones principales es el control de la expresión genética y la protección del organismo frente a la expresión

de secuencias indeseadas (Havlis J y Trbusek M, 2002). Sin embargo, la hipermetilación de las islas CpG está asociada a algunas enfermedades. Por ejemplo, está asociada con la inactivación de la transcripción del gen supresor de tumores, lo cual observamos en carcinomas (Parry L y Clarke AR, 2011), leucemia (Chen J et al., 2010), cáncer de pulmón (Belinsky SA et al., 1998), tiroides (Russo D et al., 2011) páncreas (Delpu Y et al., 2011) y próstata (Donkena KV et al., 2010), entre otros muchos. También encontramos fallos de metilación en casos de esterilidad masculina (Navarro-Costa P et al., 2010, Wu W et al., 2010) y en algunos desórdenes como los síndromes Beckwith-Wiedemann y Angelman en recién nacidos concebidos mediante TRA (Maher ER et al., 2003, Owen CM y Segars JH, Jr., 2009). Esto puede ser debido a la manipulación existente en muchas de las etapas de la fecundación, incluyendo: utilización de hormonas para la estimulación ovárica, maduración in vitro de ovocitos, uso de espermatozoides inmaduros, microinyección de espermatozoides, cultivo in vitro de embriones, crioconservación de gametos y crioconservación de embriones. Cualquiera de estos procesos puede alterar el imprinting, pero debido a los problemas éticos que supone trabajar con embriones humanos, la mayor parte de los datos que se poseen provienen de modelos animales. Algunas de las evidencias existentes entre la relación de los desórdenes de la impronta y las TRA las enumeramos a continuación:

### ESTERILIDAD MASCULINA

En el caso de las causas de esterilidad masculina, durante años se han estudiado diferentes aspectos como las anomalías en el cariotipo (Dohle GR et al., 2002) y microdeleciones del cromosoma Y (Simoni M et al., 1997), pero las causas epigenéticas se han mantenido al margen en los estudios, y se desconocen aún sus consecuencias, aunque ya existen evidencias en la bibliografía que relacionan los marcadores epigenéticos y la

fertilidad masculina. En estudios realizados con ratones a los cuales se les administró un agente desmetilante (5-aza-2'-deoxycytidine), se observó una disminución en la producción de esperma, tamaño del teste, epidídimo y aumento de mortalidad neonatal (Doerksen T y Trasler JM, 1996, Kelly TLJ et al., 2003). También se han relacionado niveles altos de metilación en el ADN espermático con tasas altas de embarazo y los defectos de metilación con infertilidad (Benchaib M et al., 2005). Otros trabajos ven en las muestras de baja calidad un elevado grado de metilación en genes imprintados y no imprintados (Houshdaran S et al., 2007). Por tanto, se ha propuesto que el elevado grado de metilación se debe al borrado incompleto de las marcas de metilación en casos de oligoastenoteratozoospermia, más que debido a errores en la metilación de novo. Además, se han asociado defectos de metilación espermática con la fertilidad (Aston KI et al., 2012). Otros autores han comparado los genes H19DMR metilado y MESTDMR no metilado en espermatozoides de varones fértiles e infértiles y relacionaron una pérdida de metilación del H19 DMR con oligoastenoteratozoospermia (OTA) (Marques CJ et al., 2004). También se ha asociado la pérdida de metilación en H19, GTL2 y cambios en el patrón de metilación en PEG1, LIT1, ZAC, PEG3 y SNRPN con oligozoospermia severa (Kobayashi H et al., 2007).

### EMBRIOGÉNESIS

La embriogénesis no se puede dar de forma adecuada sin el mecanismo correcto de regulación epigenética. Se han realizado experimentos con ratón y se ha observado que se producen abortos cuando se bloquea la expresión de la metiltransferasa o se modifican las histonas (Benchaib M et al., 2005, Bourc'His D y Bestor TH, 2004, Hata K et al., 2002, Kerjean A et al., 2000, Li E et al., 1992, Okano M et al., 1999). También se ha visto que utilizando el modelo de ratón es necesaria tanto la contribución cromosómica materna como paterna para el desarrollo normal (McGrath J

y Solter D, 1984, Surani MAH et al., 1984).

### CULTIVO EMBRIONARIO

Un estudio reciente ha confirmado que los embriones de ratón en dos células tienen un grado de metilación superior a los desarrollados in vivo. En el mismo estudio se apreció un mayor grado de desmetilación en los pronúcleos masculinos de los embriones cultivados in vitro comparado con aquéllos in vivo, mientras que en los pronúcleos femeninos no se encontraron diferencias (Zaitseva I et al., 2007). Este hallazgo soporta la hipótesis de que el cultivo embrionario puede ser el responsable de la hipermetilación hallada en los embriones (Niemann H y Wrenzycki C, 2000). Otro estudio en ratones ha demostrado una expresión diferencial y un imprinting distinto en el gen H19 usando dos medios de cultivo diferentes, a pesar de que la ADN metiltransferasa y la distribución de la proteína DNMT1 era similar en ambos grupos (Doherty AS et al., 2000). Por el contrario, en otro estudio también en ratón, se muestra un grado distinto de expresión en distintos genes imprintados, incluyendo H19, IGF2, GRB10 y GRB7 en embriones cultivados in vivo, ex vivo en medio M16 y ex vivo en medio M6 mas suero bovino fetal (Khosla S et al., 2001). También se ha observado que los embriones en 2 células poseen menos alteraciones de la metilación que los blastocistos, aumentándose las aberraciones en un mayor número de genes y observándose tanto en tejido embrionario como extraembrionario (Rivera RM et al., 2008). Todos estos estudios parecen reforzar la hipótesis de que el medio de cultivo afecta a la impronta. Algunos mecanismos por los cuales los medios de cultivo pueden afectar en la impronta son: (1) fallo del movimiento de la DNMT1 hacia el interior del núcleo en el estadio correcto del desarrollo embrionario (Thompson JR y Williams CJ, 2005), (2) alteración de la expresión de la DNMT y otras proteínas que intervienen en el imprinting (Thompson JR y Williams CJ, 2005),

(3) alteración del ciclo celular en el momento de la reprogramación epigenética (De Rycke M et al., 2002, Thompson JR y Williams CJ, 2005) e (4) interacción del grupo metilo con el medio de cultivo (De Rycke M et al., 2002).

### ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Siguiendo con el modelo en ratón, se ha observado que los embriones obtenidos de ovocitos tras estimulación hormonal presentan más alteraciones de la metilación comparados con los obtenidos sin estimulación (Shi W y Haaf T, 2002). Para evitar esto, algunos autores han propuesto el uso de la maduración in vitro de ovocitos, pero en estudios con ovocitos bovinos se han encontrado también alteraciones de la metilación tras maduración in vitro (Hiendleder S et al., 2006). El número de ovocitos estudiados es muy pequeño, pero parece que los defectos de metilación son menores cuando se utiliza esta técnica (de un estudio de 20 ovocitos, se encontraron defectos en sólo 5) (Borghol N et al., 2006).

### ABORTOS

Existen trabajos que relacionan abortos espontáneos con las mismas alteraciones de metilación que se encuentran en los espermatozoides tras la utilización de TRA (Kobayashi H et al., 2009, Kobayashi H et al., 2007).

### CONSECUENCIAS DE LAS ALTERACIONES EPIGENÉTICAS TRAS TRAS

A continuación citamos algunos síndromes que están asociados con el mayor o menor grado de metilación en genes humanos y animales y de los que se ha observado un aumento en niños nacidos tras TRA.

#### SÍNDROME DE LA CRÍA GRANDE (LARGE OFFSPRING SYNDROME)

Este síndrome se caracteriza por sobrepeso en el nacimiento, distrés respiratorio, hiperplasia de los órganos, anomalías esqueléticas, y

un aumento de muerte súbita (Young LE et al., 1998). Se relaciona con una disminución de la metilación y de la expresión del gen IGF2R, lo cual ocurre en ovejas tras TRA con cocultivo de células de la granulosa y/o suero (Young LE et al., 2001).

#### SÍNDROME DE BECKWITH-WIEDEMANN

El síndrome de Beckwith-Wiedemann es un desorden congénito que implica crecimiento exagerado hiperplasia-hipertrofica. Los primeros indicios de la enfermedad son macrosomía (elevado peso al nacer), macroglosia (lengua grande), defectos de la pared media abdominal como onfalocela (los pacientes presentan de forma típica vísceras fuera de la zona abdominal) y predisposición a cáncer embrionario (DeBaun MR et al., 2003). Este síndrome está causado por mutaciones en los genes reguladores del crecimiento situados en el cromosoma 11 (en la región 11p15.5) o por errores en impronta genómica. La zona imprintada del cromosoma 11 incluye dos subdominios: uno más centromérico que incluye en p57KIP2, LIT, TSSC3 y TSSC5 y otro más telomérico que incluye IGF2 y H19 (Lee J et al., 2002). Existen diversas publicaciones donde se confirma el aumento de casos de niños nacidos con este síndrome cuando se utilizan TRA (Gicquel C et al., 2003, Halliday J et al., 2004, Maher ER et al., 2003) (de un 1.2% de la población general a un 4% en los nacidos tras TRA (Maher ER et al., 2003)).

#### SÍNDROME DE ANGELMAN

El síndrome de Angelman se caracteriza por un retraso en el desarrollo cognitivo, una capacidad lingüística reducida o nula, escasa receptividad comunicativa, escasa coordinación motriz, con problemas de equilibrio y movimiento, ataxia, estado aparente permanentemente de alegría, con risas y sonrisas en todo momento, siendo fácilmente excitables, hipermotricidad y déficit de atención. Es un ejemplo clásico de enfermedad con herencia epigenética, dado que las mutaciones y defectos que lo causan podrían

estar implicadas en el desarrollo de la enfermedad en función de si la copia del gen alterado proviene del padre o de la madre. La zona donde se encuentran estas mutaciones está en el cromosoma 15, en el loci 15q11-q13 (Cox GF et al., 2002). Desafortunadamente, no hay datos claros sobre cuál es el aumento de este síndrome en niños nacidos por TRA, pero sí que se ha podido observar que el 20% de niños con este síndrome proceden de parejas subfértiles (Ludwig M et al., 2005).

## RETINOBLASTOMA

El retinoblastoma es un cáncer de la retina causado por una mutación en la proteína Rb, codificada por un gen supresor tumoral denominado RB1, en el cromosoma 13q14. En algunos casos este gen se silencia epigenéticamente mediante la hipermetilación del promotor situado en el exón 1 (Greger V et al., 1989). Este tumor se produce fundamentalmente en niños pequeños y representa el 3% de los cánceres en menores de quince años. Constituye la primera causa de malignidad intraocular primaria en los niños, por lo que la incidencia anual estimada es del 1-1.5% de la población; sin embargo, entre los nacidos mediante TRA esta cifra asciende y ronda el 4.9 y 7.2 %.

## DETERMINACIÓN DE LA METILACIÓN DEL ADN

La importancia en la determinación del grado de metilación del ADN ha hecho que se pongan a punto diversas técnicas con dicho fin como el Bisulfito (Frommer M et al., 1992), PCR (Kane MF et al., 1997), MSP (Methylation-specific PCR) (Herman JG et al., 1996), MS-SNuPE (methylation-sensitive single nucleotide primer extension) (Kuppuswamy MN et al., 1991), y microarrays (Adorján P et al., 2002), entre otras. Las metodologías citadas anteriormente son potentes para el estudio de la metilación del ADN pero técnicamente laboriosas, largas, poco sensibles, caras y no lo suficientemente reproducibles. En los últimos años se están desarrollando diferentes

biosensores electroquímicos (Brett AMO et al., 2000, Brotons A et al., 2013, Kato D et al., 2011) que permiten realizar diferentes ensayos más sencillos, baratos y rápidos, con el fin de implantarlos en los laboratorios de FIV con aplicaciones diagnósticas. La bibliografía en este campo es numerosa, por lo que no es el objeto de este artículo una revisión exhaustiva de las diferentes líneas de investigación sobre el uso de biosensores electroquímicos para la determinación del grado de metilación en ADN.

## CONCLUSIONES

El conocimiento de las modificaciones epigenéticas que ocurren en las enfermedades humanas es de vital importancia para abordar el tratamiento de las mismas en el futuro. Los cambios en los patrones de metilación podrán ser empleados como biomarcadores en cáncer y en reproducción asistida, entre otras enfermedades o disfunciones. El estado potencialmente reversible de este proceso constituye un blanco ideal para crear estrategias terapéuticas que impliquen la reactivación o el re-silenciamiento de genes específicos, por lo que debemos seguir investigando en este campo y desarrollando técnicas que faciliten la detección y análisis del grado de avance de dichas alteraciones.

## BIBLIOGRAFÍA

Adorján P, Distler J, Lipscher E, Model F, Müller J, Pelet C, et al. Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:e21

Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB y Issa JJP. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5489-5494

Aston KI, Punj V, Liu L y Carrell DT. Genome-wide sperm deoxyribonucleic acid methylation is altered in some men with abnormal chromatin packaging or poor in vitro fertilization embryogenesis. *Fertil Steril* 2012; 97:285-292.e284

Barton SC, Surani MAH y Norris ML. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 1984; 311:374-376

Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:11891-11896

Benchaib M, Braun V, Ressenkoff D, Lornage J, Durand P, Niveleau A, et al. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod* 2005; 20:768-773

Bird AP y Wolffe AP. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999; 99:451-454

Boissonnas CC, Jouannet P y Jammes H. Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil Steril* 2013; 99:624-631

Borghol N, Lornage J, Blachère T, Sophie Garret A y Lefèvre A. Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation. *Genomics* 2006; 87:417-426

Bourc'His D y Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 2004; 430:96-99

Brett AMO, Piedade JAP y Serrano SHP. Electrochemical oxidation of 8-oxoguanine. *Electroanalysis* 2000; 12:969-973

Brotons A, Mas LA, Metters JP, Banks CE y Iniesta J. Voltammetric behaviour of free DNA bases, methylcytosine and oligonucleotides at disposable screen printed graphite electrode platforms. *Analyst* 2013; 138:5239-5249

Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002; 71:162-164

Chen J, Odenike O y Rowley JD. Leukaemogenesis: more than mutant genes *Nat Rev Cancer* 2010; 10:23

Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR y Bartolomei MS. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2885-2894

De Kretser DM. Male infertility. *Lancet* 1997; 349:787-790

De Rycke M, Liebaers I y Van Steirteghem A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum Reprod* 2002; 17:2487-2494

DeBaun MR, Niemitz EL y Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003; 72:156-160

Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, et al. Genetic and Epigenetic Alterations in Pancreatic Carcinogenesis. *Curr Genet* 2011; 12:15-24

Doerksen T y Trasler JM. Developmental exposure of male germ cells to 5-azacytidine results in abnormal preimplantation development in rats. *Biol Reprod* 1996; 55:1155-1162

Doherty AS, Mann MRW, Tremblay KD, Bartolomei MS y Schultz RM. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 2000; 62:1526-1535

Dohle GR, Halley DJJ, Van Hemel JO, Van Den Ouwel AMW, Pieters MHEC, Weber RFA, et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17:13-16

Donkena KV, Young CYF y Tindall DJ. Oxidative stress and DNA methylation in prostate cancer. *Obstet Gynecol* 2010; 2010:302051-302051

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5- methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:1827-1831

Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J,

Siffroi JP, Flahault A y Le Bouc Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCNQ10T gene [1]. *Am J Hum Genet* 2003; 72:1338-1341

Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E y Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 1989; 83:155-158

Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, et al. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature* 2008; 452:877-881

Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E y Amor DJ. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: A case-control study [4]. *Am J Hum Genet* 2004; 75:526-528

Hata K, Okano M, Lei H y Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 2002; 129:1983-1993

Havlis J y Trbusek M. 5-Methylcytosine as a marker for the monitoring of DNA methylation. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2002; 781:373-392

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD y Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:9821-9826

Hiendleder S, Wirtz M, Mund C, Klempt M, Reichenbach HD, Stojkovic M, et al. Tissue-specific effects of in vitro fertilization procedures on genomic cytosine methylation levels in overgrown and normal sized bovine fetuses. *Biol Reprod* 2006; 75:17-23

Hoal-van Helden EG y van Helden PD. Age-related methylation changes in DNA may reflect the proliferative potential of organs. *Mutat Res* 1989; 219:263-266

Holliday R y Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Developmental clocks may depend on the enzymic modification*

of specific bases in repeated DNA sequences. *Science* 1975; 187:226-232

Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW y Sokol RZ. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *Plos One* 2007; 2:e1289

Joana Marques C, Pinho MJ, Carvalho F, Bièche I, Barros A y Sousa M. DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics* 2011; 6:1354-1361

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57:808-811

Kato D, Goto K, Fujii S-i, Takatsu A, Hirono S y Niwa O. Electrochemical DNA Methylation Detection for Enzymatically Digested CpG Oligonucleotides. *Anal Chem* 2011; 83:7595-7599

Kelly TLJ, Li E y Trasler JM. 5-Aza-2-Deoxycytidine Induces Alterations in Murine Spermatogenesis and Pregnancy Outcome. *J Androl* 2003; 24:822-830

Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Paldi A, et al. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2183-2187

Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W y Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* 2001; 64:918-926

Kobayashi H, Hiura H, John RM, Sato A, Otsu E, Kobayashi N, et al. DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet* 2009; 17:1582-1591

Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, et al. Aberrant

DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 2007; 16:2542-2551

Kuppuswamy MN, Hoffmann JW, Kasper CK, Spitzer SG, Groce SL y Bajaj SP. Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: Experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88:1143-1147

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:253-266

Lee J, Inoue K, Ono R, Ogonuki N, Kohda T, Kaneko-Ishino T, et al. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 2002; 129:1807-1817

Li E, Bestor TH y Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69:915-926

Li JY, Lees-Murdock DJ, Xu GL y Walsh CP. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* 2004; 84:952-960

Lister R y Ecker JR. Finding the fifth base: Genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res* 2009; 19:959-966

Ludwig M, Katalinic A, Groß S, Sutcliffe A, Varon R y Horsthemke B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005; 42:289-291

Maher ER, Afnan M y Barratt CL. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Epigenetics, imprinting, ART and icebergs? *Hum Reprod* 2003; 18:2508-2511

Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART) [5]. *J Med Genet* 2003; 40:62-64

Manipalviratn S, DeCherney A y Segars J. Imprinting disorders and assisted

reproductive technology. *Fertil Steril* 2009; 91:305-315

Marques CJ, Carvalho F, Sousa M y Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004; 363:1700-1702

McGrath J y Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984; 37:179-183

Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JRM, Schouten-van Meeteren AYN, Boers M y Van Leeuwen FE. Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. *Lancet* 2003; 361:309-310

Morison IM, Ramsay JP y Spencer HG. A census of mammalian imprinting. *Trends Genet* 2005; 21:457-465

Navarro-Costa P, Nogueira P, Carvalho M, Leal F, Cordeiro I, Calhaz-Jorge C, et al. Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm(dagger). *Hum Reprod* 2010; 25:2647-2654

Niemann H y Wrenzycki C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology* 2000; 53:21-34

Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, Robaire B y Trasler JM. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol* 2007; 307:368-379

Okano M, Bell DW, Haber DA y Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99:247-257

Owen CM y Segars JH, Jr. Imprinting Disorders and Assisted Reproductive Technology. *Semin Reprod Med* 2009; 27:417-428

Parry L y Clarke AR. The Roles of the Methyl-CpG Binding Proteins in Cancer. *Genes cancer* 2011; 2:618-630

Pérez Jurado LA. Genomic imprinting and endocrinology. *Impronta genómica y endocrinología* 2004; 60:49-54

Reik W y Dean W. DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis* 2001; 22:2838-2843

Rivera RM, Stein P, Weaver JR, Mager J, Schultz RM y Bartolomei MS. Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1-14

Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, Cerbón MA, Lez M y Cervantes A. DNA methylation: An epigenetic process of medical importance. *Rev Invest Clin.* 2004; 56:56-71

Russo D, Damante G, Puxeddu E, Durante C y Filetti S. Epigenetics of thyroid cancer and novel therapeutic targets. *J Mol Endocrinol* 2011; 46:R73-R81

Shi W y Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 2002; 63:329-334

Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischke A, et al. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril* 1997; 67:542-547

Surani MAH, Barton SC y Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984; 308:548-550

Thompson JR y Williams CJ. Genomic imprinting and assisted reproductive technology: Connections and potential risks. *Semin Reprod Med* 2005; 23:285-295

Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991; 6:811-816

Wolffe AP y Matzke MA. Epigenetics: Regulation through repression. *Science* 1999; 286:481-486

Wu W, Shen O, Qin Y, Niu X, Lu C, Xia Y, et al. Idiopathic Male Infertility Is Strongly Associated with Aberrant Promoter Methylation of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR). *Plos One* 2010; 5:e13884

Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001; 27:153-154

Young LE, Sinclair KD y Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reprod* 1998; 3:155-163

Zaitseva I, Zaitsev S, Alenina N, Bader M y Krivokharchenko A. Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed in vivo and in vitro. *Mol Reprod Dev* 2007; 74:1255-1261

Ziller MJ, Müller F, Liao J, Zhang Y, Gu H, Bock C, et al. Genomic distribution and Inter-Sample variation of Non-CpG

methylation across human cell types. *PLoS Genetics* 2011; 7:e1002389