



**CAPTAR**  
ciência e ambiente para todos

volume 7 • número 1 • p 39-54

## O papel da epigenética na compreensão das respostas dos organismos dulçaquícolas às flutuações ambientais: teria Lamarck razão?

A epigenética tem sido apontada como uma evidência de que a ideia defendida por Lamarck, acerca da aquisição de caracteres pelo uso e desuso, poderá ter algum sentido na explicação de determinados processos evolutivos. De facto, a epigenética caracteriza-se pelo estudo da herdabilidade, tanto meiótica como mitótica, de variações na expressão ou atividade dos genes, sem que se observe qualquer alteração na sequência de ADN. As alterações epigenéticas podem surgir como resposta a fatores ambientais naturais, como a variação da temperatura, ou a fatores ambientais exógenos, como a exposição a metais ou a poluentes orgânicos. Tendo efeito na expressão dos genes, estas marcas epigenéticas podem provocar alterações fenotípicas nos organismos. Sabe-se ainda que estas alterações podem ser transmitidas ao longo das gerações, permanecendo mesmo naquelas que já não se encontram expostas a qualquer agente de stress, configurando, portanto, um efeito transgeracional. Apesar dos estudos iniciais de epigenética terem sido em mamíferos, o género *Daphnia* é visto como um modelo de investigação nesta área, uma vez que, para além das suas características morfofisiológicas, reúne ainda um conjunto de condições favoráveis a este tipo de estudos: vasta base bibliográfica relativa à sua morfo- e eco-fisiologia; especificidade de resposta a diversos tipos de flutuações ambientais; ciclo de vida curto, passível de ser mantido em partenogénese a longo-prazo, o que permite eliminar a variabilidade genética do conjunto de fatores experimentais; fácil manutenção e manuseamento em laboratório em ciclos muito produtivos que proporcionam trabalhos com elevado número de organismos. Apesar de já existirem alguns estudos epigenéticos com recurso a *Daphnia*, é essencial que a investigação seja incrementada de modo a possibilitar a melhor compreensão de alguns mecanismos epigenéticos e das implicações que estes podem ter, quer a nível fenotípico do indivíduo, quer ao nível da dinâmica das populações nos ecossistemas, atualmente sob constante pressão ambiental.

### Palavras-chave

*Daphnia*  
epigenética  
mecanismos epigenéticos  
efeito transgeracional

João Barbosa<sup>1\*\*</sup>

Guilherme Jeremias<sup>1\*\*</sup>

Sérgio Marques<sup>1,2</sup>

Fernando JM Gonçalves<sup>1,2</sup>

Joana L Pereira<sup>1,2</sup>

\*Contribuição idêntica.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

<sup>2</sup> CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

\* jandrebarbosa@ua.pt

\*\* jeremias@ua.pt

ISSN 1647-323X



## INTRODUÇÃO

O ponto central da biologia moderna encontra-se na teoria da evolução, proposta por Charles Darwin, na década de cinquenta do século XIX. Segundo esta teoria, através de um processo de seleção natural, os organismos melhor adaptados ao ambiente em que se inserem são capazes de se multiplicar e prosperar, até que ocorram alterações nesses mesmos organismos que sejam ainda mais favoráveis, promovendo assim a evolução e o aparecimento de novas espécies, como resultado da acumulação de diferentes características ao longo do tempo. Nesta altura, eram ainda desconhecidos os mecanismos moleculares subjacentes a esta teoria. Tais mecanismos foram apenas compreendidos ao longo do século XX, como consequência dos significativos avanços que ocorreram em áreas como a genética e a biologia molecular.

Assim, e tendo em conta estes novos conhecimentos, foi proposta uma extensão à teoria original de Darwin, conhecida como neo-Darwinismo. Segundo o neo-Darwinismo, ocorrem mutações aleatórias na sequência de ADN de todos os organismos, prevalecendo aqueles que possuem a sequência de ADN que melhor se adapta ao nicho ecológico no qual se inserem. Estando o ambiente em constante mudança, as alterações na sequência de ADN que inicialmente tornam os organismos mais aptos podem, no futuro, tornar os organismos menos aptos, promovendo uma cadência constante do processo evolutivo. Como resultado do aumento do conhecimento sobre genética evolutiva, constatou-se que as mutações propostas pelo neo-Darwinismo ocorrem a um ritmo demasiado lento para justificar todas as alterações adaptativas observadas nos organismos. Assim, foram propostos outros mecanismos, que em última instância têm uma base molecular, capazes de acelerar o ritmo evolutivo, tais como a deriva genética<sup>1</sup> e a epistasia<sup>2</sup>. Ainda assim, em organismos de maior complexidade, como é o caso dos humanos, a aceleração evolutiva conferida por estes mecanismos não é suficiente para explicar o ritmo a que ocorrem as alterações adaptativas.

Nesse sentido, um nome e uma teoria até então esquecidos e subestimados ressurgem como possibilidades para colmatar a lacuna supra exposta. Cinquenta anos antes de Darwin dar a conhecer a sua teoria, Jean-Baptiste Lamarck, professor no Museu Nacional de História Natural de Paris, propôs que o ambiente pode influenciar diretamente as características dos organismos, sendo essas alterações transmitidas às gerações seguintes. Apesar da sua prestigiada carreira, as ideias propostas por Lamarck foram imediatamente rejeitadas uma vez que contrariavam não só os seus homólogos contemporâneos, mas também todos os que o antecederam. A falta de conhecimento dos mecanismos moleculares impediu Lamarck de provar a sua teoria, tendo esta sido completamente desvalorizada. Contudo, em 1953, Conrad Waddington, da Universidade de Edimburgo, provou que, quando expostas a estímulos químicos ou variações de temperatura durante o desenvolvimento embrionário, as moscas da fruta desenvolvem alterações na estrutura das asas, sendo essas alterações transmitidas às gerações seguintes (Waddington 1953). Para descrever tal fenómeno, Waddington havia introduzido, em 1939, o termo epigenética, tendo, após o referido estudo, reconhecido o impacto que este teria na teoria da evolução, por ir ao encontro da ideia proposta por Lamarck (Waddington 1939). No entanto, tal como Lamarck, Waddington foi incapaz de

<sup>1</sup> mecanismo microevolutivo que modifica aleatoriamente as frequências alélicas.

<sup>2</sup> interação entre dois ou mais genes, em que um interfere com o efeito fenotípico do outro.

demonstrar os mecanismos subjacentes a este fenómeno. Contudo, os constantes avanços da biologia molecular mostram que os conceitos propostos por Lamarck, e apoiados por Waddington, têm cada vez mais seguidores.

Neste sentido, a epigenética começou por se afirmar no contexto da saúde humana, mas atualmente já há estudos de epigenética em vários outros campos. Nomeadamente, têm havido avanços significativos na incorporação da epigenética no estudo da resposta ecológica às flutuações ambientais, um contexto extremamente atual dado o impacto direto e indireto das atividades antrópicas nos ecossistemas e a sua consequente degradação. As modificações epigenéticas são afetadas por fatores ambientais e são consideradas cruciais para a interpretação do genoma sob a influência de fatores fisiológicos (Bernstein et al. 2007; Vandegehuchte e Janssen 2011).

De entre os vários fatores ambientais que afetam o estado epigenético dos organismos destaca-se a nutrição. Esta noção foi primeiramente introduzida como consequência de estudos realizados com crianças nascidas durante o “Hunger Winter” holandês (1944-45), tendo sido observado que os adultos expostos a períodos de fome durante a gestação possuem menor grau de metilação do ADN (*vide* secção “Mecanismos epigenéticos” para a definição do termo) num *locus* do gene responsável pela produção de insulina, e ainda uma maior suscetibilidade para a ocorrência de doenças coronárias, quando comparados com adultos não expostos a este fator (Heijmans et al. 2008). Um outro exemplo clássico da forma como a nutrição induz alterações epigenéticas é o das abelhas, *Apis mellifera*. Nesta espécie, tanto as rainhas como as trabalhadoras desenvolvem-se a partir de uma larva geneticamente idêntica. No entanto, as larvas destinadas a serem rainhas são alimentadas com geleia real, ao passo que as que se destinam a ser trabalhadoras possuem uma dieta menos complexa, levando esta diferença na alimentação a diferentes graus de metilação em vários loci do ADN (Kucharski et al. 2008).

Geralmente, as alterações epigenéticas são restabelecidas a cada geração. No entanto, sabe-se que tais alterações podem ser transmitidas ao longo das gerações, mesmo que as mais recentes já não se encontrem expostas ao agente de *stress* (Skinner 2009; Daxinger e Whitelaw 2010; Vandegehuchte e Janssen 2011); uma vez que estas alterações podem ser transmitidas via seleção meiótica, podem ter valor adaptativo. Este efeito transgeracional, apesar de apenas presumivelmente existente em *Daphnia*, encontra-se documentado em organismos como humanos (Morgan e Whitelaw 2008), ratos (Cropley et al. 2006), moscas-da-fruta (*Drosophila* sp.) (Xing et al. 2007) e plantas (*Arabidopsis* sp.) (Johannes et al. 2009). A suportar esta hipótese encontram-se uma série de estudos anteriormente realizados que relatam a existência de transmissão de características entre gerações, ainda que nunca além da segunda geração não exposta, conferindo, assim, uma base científica para tal presunção (Schield et al. 2016; Bell e Stein 2017; Donelson et al. 2017; Hales et al. 2017).

Os ecossistemas dulçaquícolas, especialmente os lênticos, são suscetíveis ao impacto antrópico (Foley et al. 2005; Malmqvist et al. 2008; Carpenter et al. 2011). Como consequência, são também um reservatório relativamente estável de contaminantes vários e, como apresentam de forma frequente uma distribuição isolada e fragmentada, constituem um laboratório privilegiado para a observação de processos evolutivos (Dudgeon et al. 2006; Woodward et al. 2010). Os organismos que habitam estes sistemas, e que não têm fases de vida que lhes facilitem migrações (não sendo, portanto, capazes de evitar a degradação do

ecossistema e procurar melhores condições), ou se adaptam às novas condições do meio ou acabam por ser dizimados (Dudgeon et al. 2006; Woodward et al. 2010; Eros e Campbell Grant 2015). No entanto, no contexto particular dos ecossistemas dulçaquícolas lênticos, até mesmo as espécies com maior capacidade de dispersão têm dificuldade em evitar alguns agentes de *stress*, uma vez que as características do meio são limitantes. Assim, pequenas flutuações nas características do meio podem ter consequências exponenciadas, levando a grandes alterações na biodiversidade e, conseqüentemente, a uma total disrupção das dinâmicas estabelecidas (Nielsen et al. 2003; Schallenberg et al. 2003).

Os dafnídeos são espécies-chave nos ecossistemas dulçaquícolas lênticos, devido à sua posição central nas cadeias tróficas, e são excelentes modelos experimentais em diferentes áreas, como é discutido mais à frente. A epigenética não é exceção e o gênero *Daphnia* tem sido destacado como um proeminente modelo para estudos epigenéticos.

Sendo a epigenética um campo em crescendo a nível científico, e considerando *Daphnia* um organismo modelo para a realização de tais estudos, o objetivo deste artigo de revisão é identificar os diversos mecanismos epigenéticos melhor estudados até ao momento e sumariar os estudos já efetuados com *Daphnia* no âmbito da epigenética.



## EPIGENÉTICA – PERSPETIVA HISTÓRICA E DEFINIÇÃO

O conceito de epigenética sofreu, ao longo dos anos, fortes alterações devido ao crescente interesse nesta ciência e conseqüente descoberta dos diversos papéis da mesma. Num contexto histórico, o termo epigenética foi, primeiramente, introduzido por Conrad Waddington (1939). Este descreveu epigenética como “the causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being”, numa tentativa de evidenciar a relação causal existente entre os genes e os seus produtos, ainda que de forma pouco específica. Em meados da década dos anos 80, tornou-se claro que existia um novo tipo de herdabilidade não associada a mudanças na sequência de ADN. O artigo “The inheritance of epigenetic defects” (Holliday 1987) abordou pela primeira vez a possível influência da epigenética humana no cancro e no envelhecimento, tendo ainda sugerido que alguns dos efeitos transgeracionais, que não encontravam explicação na teoria Mendeliana da hereditariedade, podiam ter origem na transmissão de marcas de metilação do ADN, ou na falta das mesmas. Também neste artigo foi introduzido o termo “epimutação” para descrever as mudanças herdáveis que ocorriam nos genes, mas que não tinham origem em alterações na sequência de ADN. Por todos estes motivos, acredita-se que o trabalho de Holliday (1987) foi o ponto de partida para a globalização do uso do termo epigenética. Anos mais tarde, na última década do século vinte, constatou-se que o papel da epigenética era muito mais vasto e Holliday (1994) propôs duas novas definições. A primeira, “The study of the changes in gene expression which occur in organisms with differentiated cells, and the mitotic inheritance of given patterns of gene expression”, abordava a herdabilidade das marcas epigenéticas através da divisão mitótica, não referindo qualquer tipo de mecanismo epigenético ou molecular. No entanto, a segunda, “Nuclear inheritance which is not based on changes in DNA sequence”, evidenciava a evolução do conhecimento na área da genética através da referência a mecanismos que não se relacionam com a sequência de ADN. Tendo por base estas duas definições, Riggs e os seus colaboradores (1996), propuseram uma nova definição, “Epigenetics is the

study of mitotically and/or meiotically heritable changes in gene function that cannot be explained by changes in the DNA sequence”, sendo esta a mais aceita atualmente.



## EPIGENÉTICA – PERSPETIVA HISTÓRICA E DEFINIÇÃO

São vários os mecanismos epigenéticos já conhecidos, no entanto, apenas três se encontram realmente bem estudados, sendo eles a metilação do ADN, a modificação de histonas e o ARN não codificante, sendo ainda importante referir que estes mecanismos podem interagir entre si (Fuks 2005). Assim, o presente artigo focar-se-á nesses três mecanismos.

### Metilação do ADN

Em eucariotas, a metilação do ADN dá-se através da transferência de um grupo metilo da S-adenosil-L-metionina para a posição 5 da citosina<sup>3</sup>, formando assim a 5-metilcitosina. Nos mamíferos, este processo ocorre no contexto de um dinucleótido CpG<sup>4</sup>, enquanto nas plantas a metilação é também encontrada em contextos CZG ou CZZ (podendo Z corresponder a A, C ou T, dependendo se se trata de uma adenina, uma citosina ou uma timina, respetivamente) (Zhang 2008). As metiltransferases do ADN (DNMTs) são as enzimas responsáveis pela sua metilação. Sabe-se que a espécie humana possui três grupos de DNMTs, tendo cada um destes grupos diferentes funções. A DNMT 1 assegura a manutenção das metilações, nas novas cadeias de ADN, durante a replicação. A DNMT 2, por ter uma fraca atividade, está envolvida na metilação do tARN. Por fim, a DNMT 3 estabelece padrões de metilações *de novo*.

Os níveis e padrões de metilação variam substancialmente, tanto interespecificamente como entre estágios de desenvolvimento numa mesma espécie. Um exemplo da enorme variabilidade interespecifica que pode ocorrer na metilação do ADN é o de *Caenorhabditis elegans*, um nematode que se pensava não possuir qualquer tipo de metiltransferase e, conseqüentemente, qualquer tipo de metilação do ADN, tendo sido, apenas muito recentemente, verificado o oposto (Greer et al. 2015). Acreditava-se que também a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, não possuía qualquer tipo de metilação associada ao seu ADN, no entanto, é agora sabido que esta espécie possui um gene que codifica uma proteína semelhante a uma metiltransferase, tendo sido também observado que 0,1-0,4% das citosinas do genoma de *Drosophila melanogaster* são metiladas, sendo os níveis mais altos de metilação verificados nos estágios embrionários iniciais. Verificou-se ainda que, ao contrário do que acontece com os vertebrados, a metilação do ADN nesta espécie se dá nos dinucleótidos CpT e CpA (Tweedie et al. 1999; Lyko 2001; Vandegehuchte e Janssen 2011). Um outro exemplo significativo é o das abelhas, *Apis mellifera*, e das vespas, *Nasonia vitripennis*, uma vez que foram encontrados nos seus genomas homólogos dos três grupos de DNMTs presentes nos humanos. Além disso, e apesar de não terem sido ainda quantificados os níveis de metilação do ADN daquelas espécies, observou-se já a metilação do dinucleótido CpG (Wang et al. 2006; Schaefer e Lyko 2007; The Nasonia Genome Working Group 2010). Vandegehuchte e os seus colaboradores (2009),

<sup>3</sup> enquanto cofator enzimático envolvido na transferência de grupos metilo, a S-adenosil-L-metionina adiciona um grupo metilo ao carbono presente na posição 5 das citosinas presentes do ADN.

<sup>4</sup> região do ADN na qual um nucleótido de citosina é seguido por um nucleótido de guanina, estando estes separados apenas por um fosfato.

verificaram que também *Daphnia magna* possui homólogos das três DNMTs já referidas e que a metilação do ADN se dá no dinucleótido CpG.

### Modificação de histonas

O genoma está organizado em cromatina, um complexo formado entre o ADN e proteínas, organizado em pequenas unidades designadas de nucleossomas que ajudam na compactação do ADN. Estas pequenas unidades são compostas por um octâmero de histonas (duas de H2A, H2B, H3 e H4). A histona H1, que assegura a ligação das restantes histonas, encontra-se fora do nucleossoma e tem por função adensar a compactação da cromatina (Pruss et al. 1995). A estrutura destas histonas não é estática, podendo a afinidade, quer entre si, quer com o ADN, variar devido a modificações que ocorrem no N-terminal após a transcrição do mesmo. Destas modificações fazem parte a acetilação, a ubiquitinação, a fosforilação e a metilação. Em conjunto, estas modificações são capazes de afetar a estrutura da cromatina e a transcrição de genes (Lennartsson e Ekwall 2009). Na origem destas modificações estão enzimas específicas tais como acetiltransferases, metiltransferases e deacetilases. Como consequência, pode ocorrer descondensação da cromatina, que resulta na formação de eucromatina, criando assim condições para a transcrição dos genes.

Associadas a estas modificações das histonas estão as proteínas do grupo *trithorax* e *polycomb*. As primeiras estão associadas à eucromatina transcriptamente ativa, enquanto as segundas associam-se à heterocromatina transcriptamente silenciosa (Schuettengruber et al. 2007). Sabe-se, apesar de ainda não se compreender por completo o mecanismo subjacente, que existe interação entre a modificação de histonas e a metilação de ADN. Henckel et al. (2009) demonstraram que, em ratos, a ausência de metiltransferases levou a uma diminuição significativa da metilação das histonas em algumas regiões do genoma, ficando assim comprovada a influência da metilação do ADN na criação ou manutenção da metilação das histonas. O ADN metilado é ainda capaz de, em associação com proteínas como a MeCP2 (que interage com as deacetilases das histonas), provocar a desacetilação das mesmas (Nan et al. 1998). Numa perspetiva totalmente oposta, Viré et al. (2006) comprovaram que, para alguns processos de metilação de ADN, o recrutamento das DNMTs dependia da anterior metilação da histona H3K27. De igual forma, como revisto por Rose e Klose (2014), um dos mecanismos de metilação *de novo* do ADN, por parte da DNMT3, também está dependente do reconhecimento de metilações no aminoácido lisina 36 da histona 3. Assim, é importante compreender melhor a interação entre estes mecanismos uma vez que esta pode ter implicações no entendimento atual acerca dos processos do normal desenvolvimento dos organismos, assim como na reprogramação tanto de células somáticas como tumorigénese (Mazaki et al. 2001; Cedar e Bergman 2009).

### ARN não codificante (ncARN)

Os ARNs não-codificantes (ncARN) dividem-se em ncARNs infraestruturais, como é o caso dos ARNs ribossomais e de transferência, e ncARNs regulatórios, que englobam os micros ARNs (miARN), os ARNs de curta interferência (siARN), os ARNs não-codificantes longos (lncARN) e ainda os *Piwi-interacting* ARNs (piARN) (Kaikkonen et al. 2011). Os diversos ncRNAs regulatórios foram classificados como silenciadores

de genes que têm por função proteger o genoma contra sequências genéticas invasoras, como é o caso dos transposões e dos vírus, e têm origem em precursores de moléculas maiores e de cadeia dupla da enzima *Dicer* (Zilberman e Henikoff 2005; Carthew e Sontheimer 2009; Ünlü et al. 2015). Quando associados a moléculas efectoras, formam um complexo silenciador induzido pelo ARN. O silenciamento de genes pode ocorrer através de uma inibição tanto ao nível da transcrição como da tradução, da formação de heterocromatina ou da degradação do ADN/ARN (Carthew e Sontheimer 2009). Também os ncRNAs regulatórios são capazes de interagir com outros mecanismos epigenéticos, sendo exemplo disso a capacidade de ativação ou atração que o referido complexo silenciador, quando associado a polimerases de ARN, tem relativamente às metiltransferases do ADN, ocorrendo assim a metilação do mesmo (Lippman e Martienssen 2004). Acredita-se que estes também têm um importante papel na proteção do genoma contra defeitos epigenéticos de longa duração (Johannes et al. 2009). Descobriu-se ainda que na levedura *Saccharomyces pombe*, o complexo silenciador orienta uma metiltransferase de modo a metilar a histona H3K9, tendo por consequência a formação de heterocromatina. Este processo ocorre também em animais e plantas (Wassenegger 2005).



### **Daphnia COMO MODELO EPIGENÉTICO**

No âmbito de Ecologia e Ecotoxicologia, são vários os estudos já realizados referentes a *Daphnia*, género pertencente à ordem Cladocera, um dos mais abundantes e importantes grupos de consumidores primários dos ecossistemas dulçaquícolas lênticos (ver Pereira et al. 2007; Loureiro et al. 2015). Estes organismos apresentam diferentes tolerâncias fisiológicas quando exposto a diversos compostos químicos e são um excelente indicador de alterações no ambiente, tendo este género especial relevo devido ao seu enquadramento ecológico. Neste contexto, os cladóceros, e em especial os pertencentes ao género *Daphnia*, são organismos zooplantónicos que desempenham um papel ecológico central na teia alimentar pelágica (Figura 1) (Sommer e Stibor 2002; Lampert 2006), independentemente da perspetiva que se adote para caracterizar a sua estrutura trófica (revisão por Leibold et al. 1997). Assumindo que os mecanismos de regulação dos ecossistemas funcionam obedecendo a um controlo do tipo *bottom-up*, que reflete o efeito de fatores abióticos/disponibilidade de nutrientes na produtividade em biomassa dos vários níveis tróficos, os cladóceros, no contexto da competição pelos recursos disponíveis, acabam por ser um elo fundamental na transferência de energia dos produtores para os níveis superiores da cadeia trófica (McQueen et al. 1986; Castro e Gonçalves 2011). Por outro lado, ao adotar a perspetiva de que os ecossistemas são regulados por sistemas *top-down*, os cladóceros assumem-se como um item alimentar preferencial para os seus predadores vertebrados, em função das suas dimensões, e as variações nas suas populações devidas à intensidade da predação têm consequências diretas na intensidade da herbivoria sobre o fitoplâncton. É também reconhecida, neste contexto, a relevância da reciclagem de nutrientes pelos cladóceros, como fator complementar à herbivoria, na indução de variações na composição específica e consequentemente na produtividade primária do ecossistema (Brooks e Dodson 1965; Hall et al. 1976; Carpenter et al. 1985). A capacidade reguladora dos cladóceros, quer via interações *top-down*, quer via interações *bottom-up*, está bem documentada (Gliwicz 2001; Castro e Goncalves 2007; Abrantes et al. 2009).

No âmbito destes dois mecanismos potencialmente reguladores da estrutura trófica dos ecossistemas aquáticos, as populações de *Daphnia* devem ser destacadas face aos restantes grupos zooplantónicos e,

mais particularmente, face aos restantes cladóceros. Foi já demonstrado, por exemplo, que a transferência de efeitos via *top-down* dos níveis tróficos superiores (peixes piscívoros e plantívoros) é mais eficaz em lagos em que a herbivoria é feita predominantemente por *Daphnia* (Pace 1984; McQueen et al. 1986; Leibold et al. 1997). Este facto estará relacionado quer com a capacidade superior destes organismos na supressão de fitoplâncton (Gliwicz 1990), quer com o facto de se tratar de itens alimentares preferenciais para os predadores visuais, dado o seu maior tamanho corporal relativo (Brooks e Dodson 1965; Hall et al. 1976). A interação entre os mecanismos reguladores da estrutura trófica dos ecossistemas lênticos condiciona a dinâmica populacional nos diferentes níveis tróficos. As comunidades zooplantónicas não são exceção, e esta interação promove a sucessão dinâmica de populações, obedecendo a padrões de sazonalidade bastante bem estabelecidos; a dinâmica sazonal das populações zooplantónicas é naturalmente balizada pelas características morfo-fisiológicas e pela flexibilidade permitida pelo ciclo de vida dos organismos (vide revisão por Castro 2007).

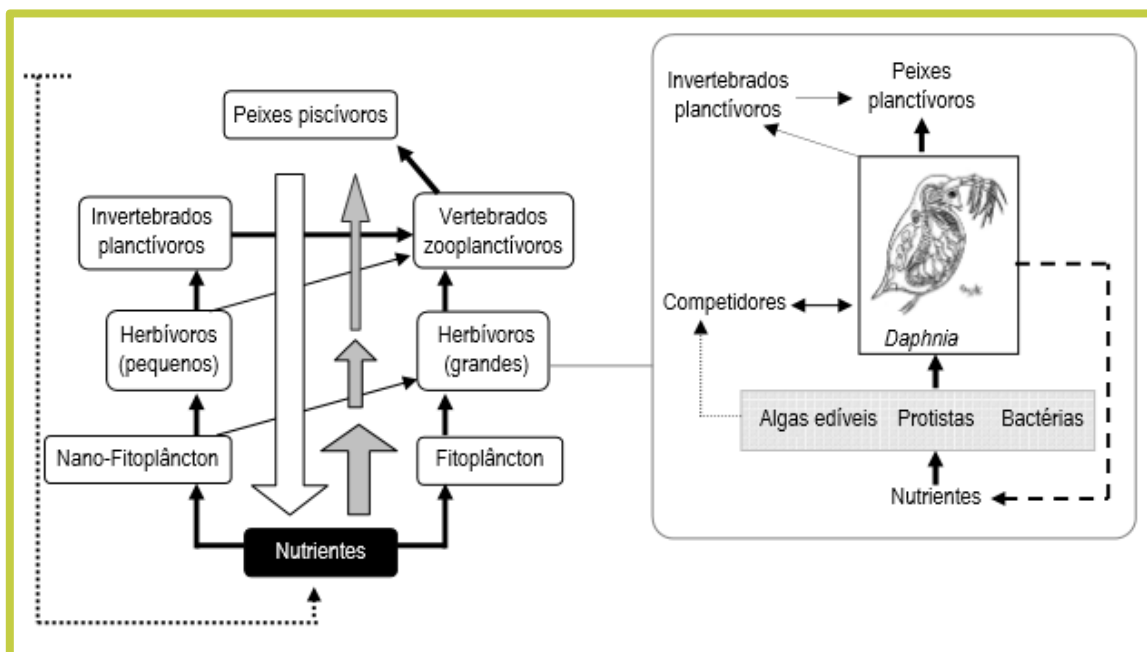


FIGURA 1: Representação esquemática simplificada da teia trófica da zona pelágica de um ecossistema lêntico, com referência aos mecanismos fundamentais envolvidos na regulação da estrutura trófica (controlo *top-down* [ ⇨ ]; controlo *bottom-up* [ ⇨ ]; a espessura das setas sugere a intensidade dos mecanismos). À direita, na figura, representam-se de forma mais detalhada as interações tróficas que determinam o papel central de *Daphnia* nestes sistemas. Adaptado de Carpenter et al. (1985) e Lampert (2006); ilustração de *Daphnia* obtida no site *Biodidac: a bank of digital resources for teaching Biology* (<http://biodidac.bio.uottawa.ca>; acesso em Março 2018).

Além do importantíssimo papel desempenhado por *Daphnia* na regulação trófica, é imperativo mencionar as características morfo-fisiológicas que munem estes organismos de uma capacidade ímpar para estudos epigenéticos. A maioria das espécies pertencentes ao género *Daphnia* possui um ciclo de vida partenogénico cíclico, sendo capazes de produzir ovos partenogénicos haploides ou ovos diploides que permitem a reprodução sexual quando os organismos se encontram em condições ambientalmente desfavoráveis, estando a produção de machos restrita a estas circunstâncias. Esta estratégia reprodutiva



torna *Daphnia* um género extremamente adequado para os referidos estudos uma vez que, quando os organismos são mantidos em partenogénese cíclica (algo que se aplica na maior parte das culturas laboratoriais), toda a variabilidade genética decorrente da reprodução sexuada é eliminada, possibilitando, assim, uma clara distinção dos efeitos das marcas epigenéticas face à normal variabilidade decorrente da reprodução sexuada (Koivisto 1995; Deng e Lynch 1996). Além disso, o género apresenta ainda um ciclo de vida curto e muito produtivo, no que às taxas reprodutivas diz respeito, assegurando assim a existência de um número de organismos que permite satisfazer a grande maioria dos desenhos experimentais e, conseqüentemente, a realização de diversos estudos detalhados (Sommer e Stibor 2002; Lampert 2006). Também a sua manutenção em laboratório é pouco exigente uma vez que se tratam de organismos de pequenas dimensões, mas grandes o suficiente para serem “manuseados” individualmente, quando necessário (Koivisto 1995). Em suma, estas são características que tornam o género *Daphnia* extremamente aliciante para a realização de estudos no âmbito da epigenética.



### AS RESPOSTAS EPIGENÉTICAS DE *Daphnia* A AGENTES DE STRESS AMBIENTAL

Os estudos realizados com *Daphnia*, tendo em vista a melhor compreensão do papel da epigenética na expressão genética e morfológica destes organismos e, conseqüentemente, no meio em que estes se inserem, são pontuais. É fulcral compreender de que modo a epigenética é capaz de influenciar o ciclo de vida dos dafniídeos (ver secções anteriores, onde se destaca o valor de *Daphnia* nos ecossistemas dulçaquícolas), sendo que, quando analisados em fase partenogénicas do ciclo de vida (em que não ocorrem alterações genómicas), as alterações provocadas pelas marcas epigenéticas são ainda mais evidentes. Neste âmbito, sabe-se que a sensibilidade do epigenoma é variável ao longo do ciclo de vida dos organismos. Assim, pensa-se que os dafniídeos, em estágios embrionários de desenvolvimento, se encontram mais suscetíveis a mudanças epigenéticas em genes associados a variações fenotípicas, e que a exposição ao mesmo agente de *stress* em estágios pós-embrionários permite a manutenção do estado epigenético anteriormente adquirido (Harris et al. 2012).

Durante a reprodução assexuada também se verifica a influência do ambiente na resposta dos organismos, uma vez que é este que determina a produção de ovos haploides ou diploides, através de fatores como a temperatura ou o fotoperíodo (Kleiven et al. 1992). Assim, as condições ambientais existentes, aquando da primeira divisão meiótica, serão determinantes, uma vez que até esta fase o ovário pode conter tanto ovos haploides como diploides (Zaffagnini 1987). A produção de machos é induzida por um processo semelhante ao supramencionado durante o ciclo partenogénico (tanto machos como fêmeas são geneticamente idênticos à progenitora) sendo tipicamente, mas não exclusivamente, produzidos em ninhadas que contêm unicamente machos (Sanford 1947; Zaffagnini e Sabelli 1972; Olmstead e LeBlanc 2007). Além destas ninhadas, em certas espécies, os machos podem também ter origem em ovos de resistência, as *ephippia* (Schwartz e Herbert 1985). Toyota et al. (2015) mostraram que a presença de concentrações elevadas da hormona metilfarnesoato induz a produção de machos, verificando que a tradução dos estímulos ambientais pode ser feita através do sistema neuro-endócrino (Olmstead e LeBlanc 2007; LeBlanc e Medlock 2015; Toyota et al. 2015).

Ao contrário do que acontece com a determinação da produção de ovos, a determinação sexual ocorre aquando da maturação do oócito, antes da primeira fase do desenvolvimento embrionário. Sandorf (1947), num estudo direccionado para a produção de ninhadas mistas em *Daphnia longispina*, verificou que a existência destas ninhadas se estendia a gerações de organismos que não haviam sido expostas ao agente de *stress*, tendo assim vincado a preponderância dos estímulos ambientais na determinação sexual, e ainda dado a conhecer a possibilidade da existência de efeito transgeracional associado à mesma. As diferenças entre machos e fêmeas não são unicamente morfológicas, tendo-se verificado maior expressão do gene nuclear *doublesex* associada à determinação de machos ao longo da embriogénese, sugerindo assim que a determinação sexual através de estímulos ambientais se sobrepõe à determinação por via genética (Kato et al. 2011).

Diversos foram os estudos já realizados com vista a compreender de que modo a exposição a químicos influencia a fertilidade partenogénica, com enfoque nos mecanismos epigenéticos potencialmente subjacentes às variações observadas. Vários químicos foram testados tendo sido obtidos resultados contraditórios. Por exemplo, a exposição a agentes como genisteína, biochanina A, cádmio, 5-azacitidina e 5-aza-2'-desoxicitidina provocam uma diminuição da fertilidade das fêmeas, ao passo que a vinclozolina não produz qualquer tipo de efeitos (Vandeghechuchte et al. 2009, 2010a). Além destes, foram ainda efetuados ensaios com zinco, tendo os resultados sido inconclusivos. Observou-se um efeito negativo na fertilidade da F0, geração exposta, tendo este efeito sido nulo tanto na F1 como na F2 quando estas já não se encontravam expostas. No entanto, quando os autores prolongaram a exposição a zinco para as gerações F1 e F2, apenas na F1 se verificou diminuição da fertilidade. Estes resultados foram interpretados como uma aclimatização dos organismos ao meio contaminado uma vez que tal situação se encontra comprovada para exposições a cádmio, cobre e zinco (Bossuyt e Janssen 2004; Muysen e Janssen 2004; Vandeghechuchte et al. 2010b). Em suma, e uma vez que os organismos testados eram geneticamente idênticos e se verificou transmissão de características entre gerações em alguns dos casos, acredita-se que a origem destas variações é epigenética, sendo esta ideia suportada pelo facto de alguns destes químicos alterarem o estado de metilação do ADN (Vandeghechuchte et al. 2010a).

O interesse na descoberta dos efeitos que a epigenética pode ter nestes organismos transcende os efeitos reprodutivos, tendo os estudos explorado também processos de alteração morfológica em *Daphnia*. Neste âmbito, os estudos dividem-se em três áreas distintas. A primeira aborda o crescimento corporal dos organismos quando expostos a meios contaminados com agentes capazes de alterar o estado de metilação, como é o caso do 5-azacetidina, genisteína, vinclozolina, biochanina A e zinco (Vandeghechuchte et al. 2010a, c). Os resultados obtidos após as respetivas exposições permitiram conclusões consistentes, tendo todos os agentes provocado uma diminuição do comprimento corporal mesmo nas gerações não expostas (F1 e F2) (Vandeghechuchte et al. 2010a). Uma vez mais surge a dúvida relativamente à possibilidade de herdabilidade transgeracional podendo, de forma alternativa, a exposição embrionária estar na origem destes resultados.

Além dos estudos relativos ao crescimento corporal, foram também realizados testes de modo a aferir se o desenvolvimento de estruturas anti-predatórias, como o capacete ou os *neckteeth* (dificultam a ingestão do organismo pelos predadores), é alterado quando os organismos se encontram expostos a infoquímicos que denotam a presença de predadores (Tollrian e Dodson 1999; Miyakawa et al. 2010). No caso do capacete,

uma extensão craniana do exoesqueleto, foram realizados estudos com *D. cucullata*, *D. lumholtzi* e *D. ambigua* tendo, em todas as espécies, sido observado um aumento do capacete na geração exposta (Tollrian 1990; Agrawal et al. 1999; Sagawa et al. 2005). Quando os neonatos foram expostos ao agente de stress ainda nos primeiros estágios de desenvolvimento, observou-se uma resposta imediata, demonstrando assim que, neste período específico, o epigenoma se encontra vulnerável a estímulos externos (Agrawal et al. 1999). Estes autores avaliaram a resposta dos organismos em gerações não expostas, verificando que os neonatos destas gerações mantinham a indução do desenvolvimento do capacete, podendo isto ser sinónimo da existência de efeito transgeracional ou de sensibilidade epigenómica ao longo do desenvolvimento embrionário. No que aos *neckteeth* diz respeito, Sagawa et al. (2005) demonstraram que *D. pulex*, tal como outras espécies, induz o crescimento desta estrutura quando exposta a infoquímicos. Para que se dê o desenvolvimento destas estruturas é necessário, segundo Miyakawa et al. (2010), que haja exposição a infoquímicos durante o desenvolvimento embrionário, além da já reconhecida exposição ao longo dos três primeiros estágios pós-embrionários, intervalo no qual se dá o desenvolvimento dos *neckteeth* (Imai et al. 2009; Miyakawa et al. 2010). Assim, verificou-se que a exposição na fase embrionária promove a indução do desenvolvimento desta estrutura, sendo a exposição nos estágios pós-embrionários essencial para a manutenção e expressão fenotípica dessa indução. Miyakawa et al. (2010) propuseram ainda que seria o *Differential Display 1 (DD1)*, um gene associado à alteração de expressão em estágios embrionários em dáfnias expostas a infoquímicos, o responsável pela receção do estímulo infoquímico e pelo estabelecimento das alterações epigenéticas que levam à produção dos *neckteeth*. Além disso, verificaram ainda que diversos genes, como é o caso do *DD1*, *DD2*, *DD3*, *Met*, *InR*, *IRS-1*, *exd*, *JHAMT* e *Hox3*, se encontram sobre-regulados em organismos expostos. Sendo conhecido o papel de genes como *Met* e *exd* na alteração do estado epigenético de genes subjacentes, e dos genes *Hox* na produção de um fator de transcrição associado à cromatina, é possível argumentar que a formação e manutenção dos *neckteeth* terão origem em alterações epigenéticas (Rauskolb et al. 1993; Miura et al. 2005; Lemons e McGuinnis 2006).

## EFEITOS EPIGENÉTICOS TRANSGERACIONAIS

Apesar de ser comum ocorrer o restabelecimento das marcas epigenéticas em cada nova geração, sabe-se que tal pode não acontecer, dando-se assim a transmissão das mesmas para as gerações subsequentes, ainda que estas já não se encontrem expostas ao agente indutor. A descoberta deste fenómeno permitiu estudar os mecanismos e o modo como o efeito transgeracional das marcas epigenéticas pode afetar as populações e a evolução.

Durante a divisão de células somáticas, a transferência transgeracional dos padrões de metilação de ADN é efetuada pela ação de metiltransferases de ADN. Neste fenómeno destacam-se os organismos que se reproduzem sexuadamente. Nestes, para que se dê a transmissão das marcas epigenéticas, é necessário que estas ultrapassem os processos de meiose, gametogénese e embriogénese, no caso dos organismos multicelulares (Bocock e Aagaard-Tillery 2009). No entanto, é importante realçar que, quando fêmeas gestantes são expostas a qualquer tipo de agente de *stress*, só se considera a ocorrência de efeito transgeracional das marcas epigenéticas adquiridas caso estas estejam presentes até à terceira geração ( $F_3$ ), após a exposição. Este conceito baseia-se no facto das células germinativas que darão origem à  $F_2$  já

se encontrarem presentes nos embriões da F<sub>1</sub> que, por sua vez, se encontram no interior da fêmea exposta (F<sub>0</sub>) (Youngson e Whitelaw 2008). Xing et al. (2007) comprovaram a ocorrência de um efeito epigenético transgeracional relativo à suscetibilidade de desenvolvimento de tumores em *Drosophila*. Os referidos autores descobriram que algumas das mutações induzidas por uma quinase hiperativa eram também responsáveis pela modificação fenotípica do tumor, através de marcas epigenéticas, tendo ainda verificado que estas modificações persistiam nas gerações subseqüentes, mesmo quando nestas já não se verificavam as mutações induzidas pela referida quinase. Os autores sugerem, assim, que diversas mutações, que ocorrem a nível do genoma, podem alterar as marcas epigenéticas através da indução ou repressão da metilação do ADN e que a possibilidade da hiperatividade das referidas quinases estará na origem da disrupção da reprogramação epigenética, promovendo assim a herdabilidade das epimutações.

Também em *Arabidopsis thaliana* foi reportada a existência de efeito transgeracional associado às marcas epigenéticas. Johannes et al. (2009) destacaram que o primeiro obstáculo a ultrapassar se prendia com a dificuldade em identificar de que modo as marcas epigenéticas têm influência a nível fenotípico, uma vez que estas eram facilmente confundidas com o polimorfismo apresentado pela sequência de ADN. Para contornar esta questão foram selecionados dois progenitores que possuíam entre si poucas diferenças na sequência de ADN, mas padrões de metilação de ADN bastante distintos, tendo estes sido mantidos em ambiente controlado ao longo de várias gerações. As observações efetuadas tornaram clara a alta herdabilidade de algumas características da planta (tempos de florescência e peso), mas também a estabilidade da transmissão de padrões de metilação de ADN desde os progenitores até à oitava geração.

Além de ocorrer em insetos e em plantas, sabe-se que também nos mamíferos é possível a transmissão transgeracional de marcas epigenéticas, sendo um exemplo demonstrativo o dos ratos. No seguimento dos trabalhos já levados a cabo (Hadchouel et al. 1987; Allen et al. 1990; Roemer et al. 1997), Morgan et al. (1999) reportaram a primeira evidência convincente da existência de efeito transgeracional no locus A<sup>xy</sup>. Neste estudo, os autores verificaram que o facto de progenitores *agouti* serem mais suscetíveis a ter ninhadas *agouti*, e progenitores amarelos a ter ninhadas amarelas, se prende com o ambiente uterino em que as crias se desenvolvem, sendo este efeito possível devido a uma remoção incompleta das marcas epigenéticas.

Tendo em conta os exemplos acima mencionados e as características já abordadas do género *Daphnia*, é plausível que também nas espécies deste género ocorra a transmissão de marcas epigenéticas ao longo das gerações. Assim, a prioridade de investigação neste campo será a verificação desta hipótese, para posteriormente aprofundar o estudo do efeito que a transmissão epigenética pode ter nas populações naturais de *Daphnia* e, conseqüentemente, nos ecossistemas em que ocupam uma posição trófica e funcional central.

---

**agradecimentos** • Este trabalho teve o apoio financeiro do CESAM (UID/AMB/50017), da FCT/MEC através de fundos nacionais e cofinanciamento pelo FEDER, no âmbito do Acordo de Parceria PT2020 e Compete 2020. Joana Pereira e Sérgio Marques são financiados por bolsas atribuídas pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BPD/101971/2014 e SFRH/BPD/112803/2015, respetivamente).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrantes N, Nogueira A, Gonçalves F (2009) Short-term dynamics of cladocerans in a eutrophic shallow lake during a shift in the phytoplankton dominance. *Annales de Limnologie* 45:237–245.
- Agrawal AA, Laforsch C, Tollrian R (1999) Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature* 401:60–63.
- Allen ND, Norris ML, Surani MA (1990) Epigenetic Imprinting Control of Transgene by Genotype-Specific Expression Imprinting by Genotype-Specific Modifiers. *Cell* 61:853–861.
- Bell AM, Stein LR (2017) Transgenerational and developmental plasticity at the molecular level: Lessons from *Daphnia*. *Molecular Ecology* 26:4859–4861.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The Mammalian Epigenome. *Cell* 128:669–681.
- Bocock PN, Aagaard-Tillery KM (2009) Animal Models of Epigenetic Inheritance. *Seminars in Reproductive Medicine* 27.
- Bossuyt BTA, Janssen CR (2004) Influence of multigeneration acclimation to copper on tolerance, energy reserves, and homeostasis of *Daphnia magna* straus. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:2029–2037.
- Brooks JL, Dodson SI (1965) Predation, Body Size, and Composition of Plankton. *Science* 150:28–35.
- Carpenter SR, Kitchell JF, Hodgson JR (1985) Fish predation and herbivory can regulate lake ecosystems. *Bioscience* 35:634–639.
- Carpenter SR, Stanley EH, Vander Zanden MJ (2011) State of the World's Freshwater Ecosystems: Physical, Chemical, and Biological Changes. *Annual Review in Environmental Resources* 36:75–99.
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642–655.
- Castro BB (2007) Ecologia e selecção de habitat em crustáceos zooplancónicos de lagos pouco profundos. Universidade de Aveiro, Aveiro. 168 p.
- Castro BB, Goncalves F (2007) Seasonal dynamics of the crustacean zooplankton of a shallow eutrophic lake from the Mediterranean region. *Fundamental and Applied Limnology* 169:189–202.
- Castro BB, Gonçalves F (2011) Planktivory in non-indigenous fish and implications for trophic interactions in a Mediterranean shallow lake. *Annales de Limnologie* 47:269–280.
- Cedar H, Bergman Y (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics* 10:295–304.
- Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DIK (2006) Germ-line epigenetic modification of the murine Avy allele by nutritional supplementation. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* 103:17308–12.
- Daxinger L, Whitelaw E (2010) Transgenerational epigenetic inheritance: More questions than answers. *Genome Research* 1623–1628.
- Deng HW, Lynch M (1996) Change of genetic architecture in response to sex. *Genetics* 143:203–212.
- Donelson JM, Salinas S, Munday PL, Shama LNS (2017) Transgenerational plasticity and climate change experiments: Where do we go from here? *Global Change Biology* 1–22.
- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, et al (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81:163.
- Eros T, Campbell Grant EH (2015) Unifying research on the fragmentation of terrestrial and aquatic habitats: patches, connectivity and the matrix in riverscapes. *Freshwater Biology* 60:1487–1501.
- Foley JA, Defries R, Asner GP, et al. (2005) Global consequences of land use. *Science* 309:570–4.
- Fuks F (2005) DNA methylation and histone modifications: Teaming up to silence genes. *Current Opinion in Genetics & Development* 15:490–495.
- Gliwicz ZM (2001) Species-specific population-density thresholds in cladocerans? *Hydrobiologia* 442:291–300.
- Gliwicz ZM (1990) Food thresholds and body size in cladocerans. *Nature* 343:638–640.
- Greer EL, Blanco MA, Gu L, et al. (2015) DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. *Cell* 161:868–878.
- Hadchouel M, Farza H, Simon D, et al (1987) Maternal inhibition of hepatitis B surface antigen gene expression in transgenic mice correlates with de novo methylation. *Nature* 329:454–456.
- Hales NR, Schield DR, Andrew AL, et al (2017) Contrasting gene expression programs correspond with predator-induced phenotypic plasticity within and across generations in *Daphnia*. *Molecular Ecology* 26:5003–5015.
- Hall DJ, Threlkeld ST, Burns CW, Crowley PH (1976) The size-efficiency hypothesis and the size structure of zooplankton communities. *Annual Review of Ecology and Systematics* 7: 177–208.

- Harris KDM, Bartlett NJ, Lloyd VK (2012) *Daphnia* as an emerging epigenetic model organism. *Genetics Research International* 2012:147892.
- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, et al. (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:17046–17049.
- Henckel A, Nakabayashi K, Sanz LA, et al. (2009) Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals. *Human Molecular Genetics* 18:3375–3383.
- Holliday R (1987) Epigenetic Defects. *Science* 238:163–170.
- Holliday R (1994) Epigenetics : An Overview. *Developmental Genetics* 15(6):453-7.
- Imai M, Naraki Y, Tochinali S, Miura T (2009) Elaborate regulations of the predator-induced polyphenism in the water flea *Daphnia pulex*: kairomone-sensitive periods and life-history tradeoffs. *Journal of Experimental Zoology Part A* 311:788–795.
- Johannes F, Porcher E, Teixeira FK, et al. (2009) Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genetics* 5(6): e1000530.
- Kaikkonen MU, Lam MTY, Glass CK (2011) Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular Research* 90(3):430-40.
- Kato Y, Kobayashi K, Watanabe H, Iguchi T (2011) Environmental Sex Determination in the Branchiopod Crustacean *Daphnia magna*: Deep Conservation of a Doublesex Gene in the Sex-Determining Pathway. *PLoS Genetics* 7(3): e1001345.
- Kleiven OT, Larsson P, Hobek A (1992) Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos* 65:197–206.
- Koivisto S (1995) Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution* 90:263–267.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R (2008) Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. *Science* 319:1827–1830.
- Lampert W (2006) *Daphnia*: Model herbivore, predator and prey. *Polish Journal of Ecology* 54:607–620.
- LeBlanc GA, Medlock EK (2015) Males on demand: The environmental-neuro-endocrine control of male sex determination in daphnids. *FEBS Journal* 282:4080–4093.
- Leibold MA, Chase JM, Shurin JB, et al. (1997) Species Turnover and the Regulation of Trophic Structure Source. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 467-494.
- Lemons D, McGuinnis W (2006) Genomic evolution of hox gene clusters. *Science* 313:1918–1922.
- Lennartsson A, Ekwall K (2009) Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790: 863–868.
- Lippman Z, Martienssen R (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431:364–370.
- Loureiro C, Cuco AP, Claro MT, et al. (2015) Progressive acclimation alters interaction between salinity and temperature in experimental *Daphnia* populations. *Chemosphere* 139:126–132.
- Lyko F (2001) DNA methylation learns to fly. *Trends in Genetics* 17:169–172.
- Malmqvist B, Rundle SD, Covich AP, et al. (2008) Prospects for streams and rivers: an ecological perspective. *Aquatic Ecosystems* 19–29.
- Mazaki Y, Hashimoto S, Okawa K, et al. (2001) An ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Git2-short/KIAA0148 is involved in subcellular localization of paxillin and actin cytoskeletal organization. *Molecular Biology of the Cell* 12:645–662.
- McQueen D, Post J, Mills E (1986) Trophic relationships in freshwater pelagic ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43:1571–1581.
- Miura K, Oda M, Makita S, Chinzei Y (2005) Characterization of the *Drosophila Methoprene*-tolerant gene product: Juvenile hormone binding and ligand-dependent gene regulation. *FEBS Journal* 272:1169–1178.
- Miyakawa H, Imai M, Sugimoto N, et al. (2010) Gene up-regulation in response to predator kairomones in the water flea, *Daphnia pulex*. *BMC Developmental Biology* 10:45.
- Morgan DK, Whitelaw E (2008) The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mamm Genome* 19:394–397.
- Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E (1999) Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature Genetics* 23:314–318.

- Muysen BTA, Janssen CR (2004) Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus. *Environmental Pollution* 130:309–316.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386–389.
- Nielsen DL, Brock MA, Rees GN, Baldwin DS (2003) Effects of increasing salinity on freshwater ecosystems in Australia. *Aust Journal of Botany* 51:655–665.
- Olmstead AW, LeBlanc GA (2007) The environmental-endocrine basis of gynandromorphism (intersex) in a crustacean. *International Journal of Biological Sciences* 3:77–84.
- Pace ML (1984) Zooplankton Community Structure, but not Biomass, influences the phosphorus-chlorophyll a relationship. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41(7): 1089-1096.
- Pereira JL, Mendes CD, Gonçalves F (2007) Short- and long-term responses of *Daphnia* spp. to propanil exposures in distinct food supply scenarios. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68:386–396.
- Pruss D, Hayes JJ, Wolffe AP (1995) Histone and DNA contributions to nucleosome structure In AP Wolffe (Ed.), *The Nucleosome: a multi-volume Treatise*. Vol.1: pp 3–29.
- Rauskolb C, Peifer M, Wieschaus E (1993) Extradenticle, a Regulator of Homeotic Gene Activity, Is a Homolog of the Homeobox-Containing Human Proto-Oncogene Pbx1. *Cell* 74:1101–1112.
- Riggs AD, Martienssen RA, Russo VEA (1996) Introduction. In *Epigenetic mechanisms of gene regulation* (ed. Russo VEA et al.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 1–4.
- Roemer I, Reik W, Dean W, Klose J (1997) Epigenetic inheritance in the mouse. *Current Biology* 7:277–280.
- Rose NR, Klose RJ (2014) Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1839:1362–1372.
- Sagawa K, Yamagata H, Shiga Y (2005) Exploring embryonic germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing VASA as a marker. *Gene Expression Patterns* 5:669–678.
- Sanford KK (1947) The effect of temperature on the intersex character of *Daphnia longispina*. *Physiological Zoology* 20:325–332
- Schaefer M, Lyko F (2007) DNA methylation with a sting: An active DNA methylation system in the honeybee. *BioEssays* 29:208–211.
- Schallenberg M, Hall CJ, Burns CW (2003) Consequences of climate-induced salinity increases on zooplankton abundance and diversity in coastal lakes. *Marine Ecology Progress Series* 251:181–189.
- Schild DR, Walsh MR, Card DC, et al. (2016) EpiRADseq: Scalable analysis of genomewide patterns of methylation using next-generation sequencing. *Methods in Ecology and Evolution* 7:60–69.
- Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, et al (2007) Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell* 128:735–745.
- Schwartz S, Herbert PD (1985) *Daphniopsis ephemeralis* sp. n. (Cladocera, Daphniidae): a new genus for North America. *Canadian Journal of zoology* 63(11): 2689–2693.
- Skinner MK (2009) What is an Epigenetic Transgenerational Phenotype? F3 or F2. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (2):116–125.
- Sommer U, Stibor H (2002) Copepoda-Cladocera-Tunicata: The role of three major mesozooplankton groups in pelagic food webs. *Ecological Research* 17:161–174.
- The Nasonia Genome Working Group (2010) Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science* 327:343–349.
- Tollrian R (1990) Predator-induced helmet formation in *Daphnia cucullata* (Sars). *Archives fur Hydrobiologie* 119:191–196.
- Tollrian R, Dodson ST (1999) Inducible defenses in Cladocera: constraints, costs, and multipredator environments. In: *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA, pp 177–202
- Toyota K, Miyakawa H, Yamaguchi K, et al. (2015) NMDA receptor activation upstream of methyl farnesoate signaling for short day-induced male offspring production in the water flea, *Daphnia pulex*. *BMC Genomics* 16:1–12.
- Tweedie S, Ng HH, Barlow AL, et al. (1999) Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nature Genetics* 23:389–390.
- Ünlü ES, Gordon DM, Telli M (2015) Small RNA sequencing based identification of MiRNAs in *Daphnia magna*. *PLoS One* 10: e0137617.
- Vandegheuchte MB, Janssen CR (2011) Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20:607–624.

- Vandeghechuchte MB, Kyndt T, Vanholme B, et al. (2009) Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multigeneration Cd exposure. *Environment International* 35:700–706.
- Vandeghechuchte MB, Lemière F, Vanhaecke L, et al. (2010a) Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C* 151:278–285.
- Vandeghechuchte MB, Vandenbrouck T, Coninck DD, et al (2010b) Can metal stress induce transferable changes in gene transcription in *Daphnia magna*? *Aquatic Toxicology* 97:188–195.
- Vandeghechuchte MB, Vandenbrouck T, De Coninck D, et al. (2010c) Gene transcription and higher-level effects of multigenerational Zn exposure in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 80:1014–1020.
- Viré E, Brenner C, Deplus R, et al. (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 446:824–824.
- Waddington CH (1953) Genetic Assimilation of an Acquired Character. *Evolution* 7(2): 118-126
- Waddington CH (1939) Introduction to modern genetics. Allen and Unwin, London.
- Walsh MR, Whittington D, Funkhouser C (2014) Thermal Transgenerational Plasticity in Natural Populations of *Daphnia*. *Integrative and Comparative Biology* 54:822–829.
- Wang Y, Jorda M, Jones PL, et al. (2006) Functional CpG Methylation System in a Social Insect. *Science* 314:645–647.
- Wassenegger M (2005) The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* 122:13–16.
- Woodward G, Perkins DM, Brown LE (2010) Climate change and freshwater ecosystems: impacts across multiple levels of organization. *Philosophical Transactions of the Royal Society -Part B* 365: 2093–2106.
- Xing Y, Shi S, Le L, et al (2007) Evidence for transgenerational transmission of epigenetic tumor susceptibility in *Drosophila*. *PLoS Genetics* 3:1598–1606.
- Youngson NA, Whitelaw E (2008) Transgenerational Epigenetic Effects. *Annual Review in Genomics and Human Genetics* 9:233–257.
- Zaffagnini F (1987) Reproduction in *Daphnia*. *Memorie Dell'Istituto Italiano Di Idrobiologia* 45:245–284
- Zaffagnini F, Sabelli B (1972) Karyologic observations on the maturation of the summer and winter Eggs of *Daphnia pulex* and *Daphnia middendorffiana*. *Chromosoma* 36:193–203.
- Zhang X (2008) The Epigenetic Landscape of Plants. *Science* 320:489–492.
- Zilberman D, Henikoff S (2005) Epigenetic inheritance in *Arabidopsis*: Selective silence. *Current Opinion in Genetics & Development* 15:557–562.