Epigenetičko reprogramiranje spolnih prastanica

Stipoljev, Sunčica

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:963293

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

EPIGENETIČKO REPROGRAMIRANJE SPOLNIH PRASTANICA

EPIGENETIC REPROGRAMMING IN PRIMORDIAL GERM CELLS

SEMINARSKI RAD

Sunčica Stipoljev
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: Prof.dr.sc. Gordana Lacković – Venturin

Zagreb, 2015.

SADRŽAJ:

1. UVOD ____ 2

2. EPIGENETIČKI DOGAĐAJI U PRIMORDIJALNIM ZAMETNIM STANICAMA ____ 3

2.1. Demetilacija spolnih prastanica ____ 4

2.2 Spolno-specifična remetilacija zametnih stanica ____ 10

3. POTENCIJALNE ULOGE EPIGENETIČKOG REPROGRAMIRANJA U SPOLNIM PRASTANICAMA ____ 12

5. LITERATURA ____ 13

6. SAŽETAK ____ 14

7. SUMMARY ____ 15

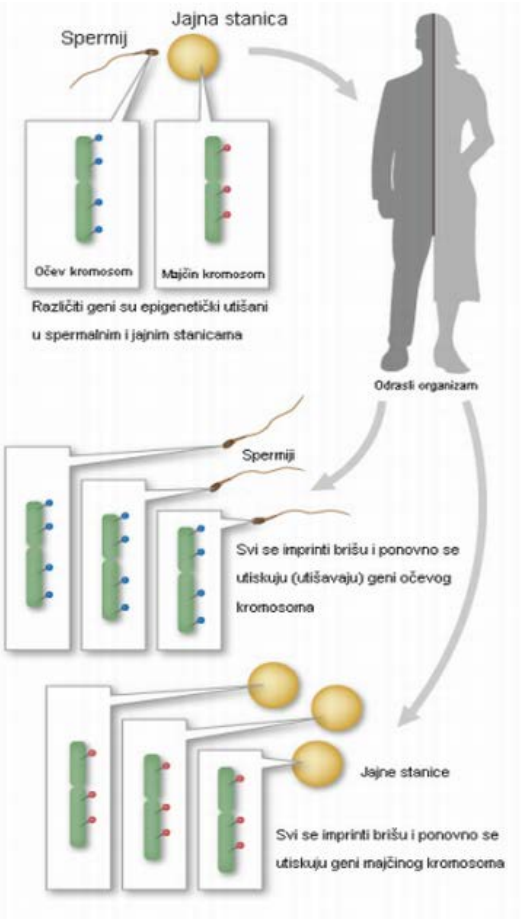
1. UVOD

Spolne stanice posjeduju izvanrednu sposobnost da stvore novi organizam. Da bi stekle to svojstvo, primordijalne zametne stanice prolaze kroz jedinstveni proces uzastopnih epigenetičkih događaja, odnosno kroz epigenetičko reprogramiranje koje je ključno obilježje gametogeneze. Događaji kulminiraju u epigenomskom bazalnom stanju koje je temelj totipotencije. Time je omogućeno ponovno uspostavljanje spolno-specifičnih utisaka (inaktivnih gena). Za vrijeme spermatogeneze, uspostavlja se očinski utisak, a za vrijeme oogeneze, majčin (Sl. 1.).

Za vrijeme razvitka primordijalnih zametnih stanica u zrele gamete, epigenetičko reprogramiranje obuhvaća DNA demetilaciju njihovih genoma. Brišu se DNA metilacijski biljezi povezani sa utišanim genima, a nakon toga prolaze *de novo* metilaciju i očuvanje uzorka metiliranosti gena u sazrijevanju muških i ženskih gameta.

Također se događa i opsežno reprogramiranje histonskih modifikacija tj. remodeliranje kromatinske strukture, čime se olakšava demetilacija DNA.

Broj početnih spolnih prastanica je vrlo ograničen, stoga je presudno da se epigenetski program događa kroz višestruke paralelne mehanizme koji omogućavaju fleksibilnost, učinkovitost i visoku vjernost procesa na razini skoro svake stanice (Hackett i sur., 2012).

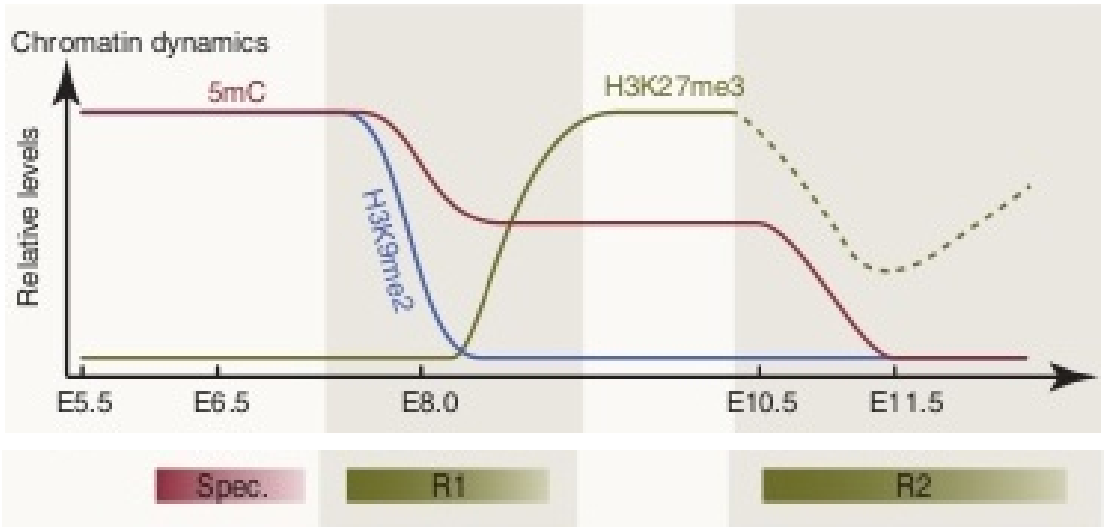


Slika 1. Različiti su geni epigenetički utišani u spermalnim i jajnim stanicama (http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/imprinting/index.html).

2. EPIGENETIČKI DOGAĐAJI U PRIMORDIJALNIM ZAMETNIM STANICAMA

Kada se spolne prastanice nakon implantacije specificiraju iz stanica epiblasta, one se epigenetski ne razlikuju od susjednih stanica, jer su naslijedile somatske epigenetske biljege koji su prisutni i u stanicama epiblasta u to vrijeme. Stoga naslijeđeno epigenetsko stanje početnih spolnih prastanica, koje uključuje metiliranu DNA i inaktivirani X kromosom, čini epigenetsku barijeru za stjecanje totipotencije. Zbog toga je važno da se na početku gametogeneze inicira proces reprogramiranja koji će izbrisati te stabilne epigenetske barijere.

Epigenetske promjene koje odmah slijede specifikaciju, su recipročan gubitak dimetilacije lizina 9 histona H3 (H3K9me2) oko 7.5. embrionalnog dana i, u većini spolnih prastanica, povećanje trimetilacije lizina 27 histona H3 (H3K27me3) oko 9.5. dana (Sl.2)
(Hackett i sur., 2012).



Slika 2. Kromatinske promjene i epigenomsko reorganiziranje u spolnim prastanicama. Nakon specifikacije (Spec.), spolne prastanice prolaze kroz dvije uzastopne faze reprogramiranja, prva za vrijeme migracije (R1) i druga nakon ulaska u genitalni nabor (R2). U fazi R1 spolne prastanice pokazuju globalno brisanje dimetilacije lizina 9 histona H3 (H3K9me2), povećanje trimetilacije lizina 27 histona H3 (H3K27me3) i mali gubitak metilacijskih signala DNA. U R2 fazi se nastavlja gubitak metilacije DNA, koji uključuje brisanje utisaka i u uzajamnoj je vezi sa daljnjim remodeliranjem kromatinskih modifikacija (Hackett i sur., 2012).

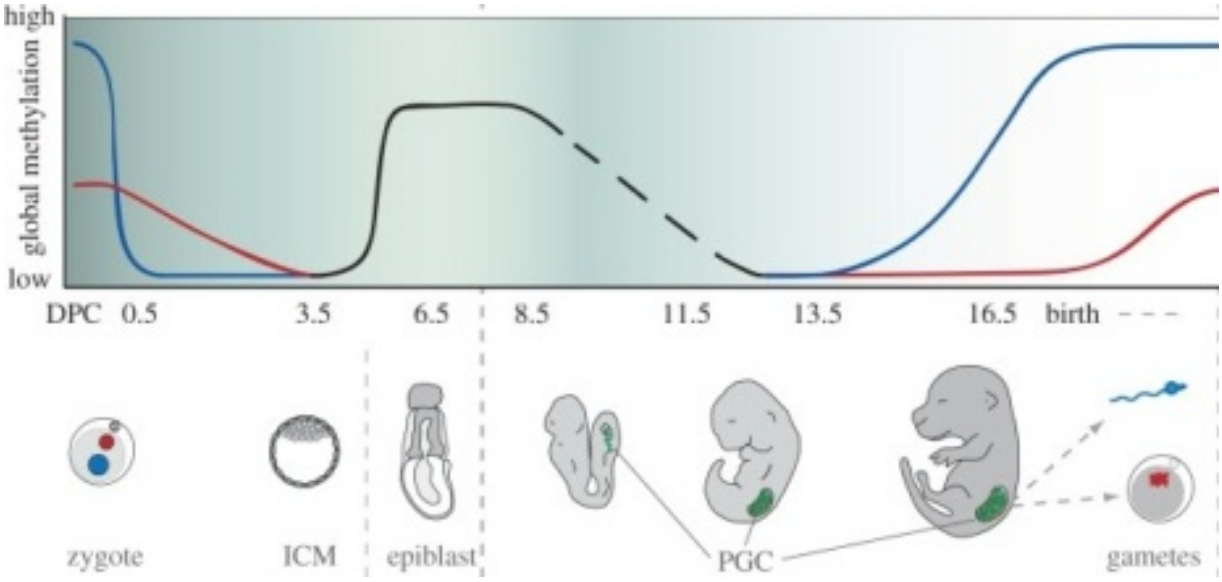
Ova oba histonska modifikacijska obilježja, H3K9me2 i H3K27me3, su represorski signali, pokazatelji kondenziranog, transkripcijski inaktivnog heterokromatina. Vrlo je vjerojatno da povećanje H3K27me3 nadopunjuje brisanje H3K9me2 kako bi se održalo odgovarajuće represivno stanje kromatina. Smanjenje H3K9me2 u korelaciji je sa periodom G2 faze staničnog ciklusa, dok je nedavna studija pokazala da je povećanje H3K27me3 prisutno u migrirajućim spolnim prastanicama (Hyldig i sur., 2011). Postoji uska povezanost između H3K9me2 i metilacije DNA, te je moguće da niska koncentracija H3K9me2 olakšava demetilaciju DNA u spolnim prastanicama (Leitch i sur., 2013). Promjene u histonskim modifikacijama se događaju paralelno sa redukcijom metilacije DNA (5-metilcitozina) oko 8. dana (Hackett i sur., 2012).

Metilacija DNA (5mC) unutar CpG dinukleotidnih sekvenci je izrazito nasljedni epigenetski biljeg koji utječe na ekspresiju gena tako što dovodi do njihovog transkripcijskog utišavanja. Prema tome, demetilacija unutar CpG konteksta na gotovo svim genskim lokusima za vrijeme razvoja spolnih prastanica je temeljni događaj prema stjecanju totipotencije.

2.1. Demetilacija spolnih prastanica

Kada spolne prastanice stignu do genitalnog nabora, slijedi opsežno epigenetsko reprogramiranje, uključujući globalnu demetilacija genoma koja započinje 11. dana. To rezultira demetilacijom mnogih ponavljajućih sekvenci, ali ključno je da se brišu roditeljski utisci, čime se omogućava uspostava spolno-specifičnih utisaka koji dakle odražavaju spol embrija. Sekvence koje se odupiru reprogramiranju mogu potencionalno djelovati kao nosači epigenetske informacije kroz generacije, dovodeći do transgeneracijskog epigenetskog nasljeđivanja (Leitch i sur., 2013).

Istraživanja mehanizama demetilacije DNA u spolnim prastanicama se uglavnom fokusiraju na period između 11.5. i 13.5. dana (Sl. 3).



Slika 3. Ciklus epigenetičkog reprogramiranja kod sisavaca (Seisenberg i sur., 2012). Epigenetičko reprogramiranje odvija se u dvije faze, prva u gametogenezi i druga nakon fertilizacije. Jajna stanica je gotovo nemetilirana, jer za vrijeme svog rasta i sazrijevanja pokazuje intezivnu aktivnost, dok je genom spermija metiliran i neaktivan. Nakon oplodnje taj se obrazac drastično mijenja, dolazi do ukupnog pada metilacije. Nakon implantacije dolazi do procesa *de novo* metilacije koji se nastavlja i dalje kako razvitak teče. Simultanim procesima metilacije i demetilacije, uspostavlja se razlika u aktivnosti gena u raličitim vrstama stanica. Skraćenice: DPC, dana poslije oplodnje, od eng./lat. *days post coitum*; ICM, unutarnja stanična masa (embrioblast), od eng. *inner cell mass*; PGC, primordijalne zametne stanice, od eng. *primordial germ cells*

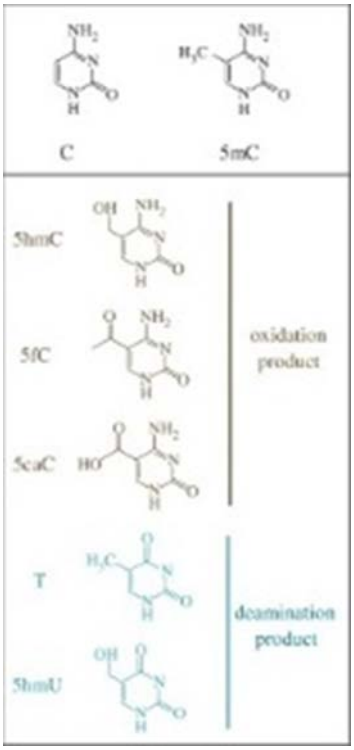
S obzirom da je taj period prekratak za pasivno brisanje obrasca metilacije kroz nekoliko staničnih podjela, demetilacija DNA se događa brzo, što upućuje na aktivan proces, iako postoji dovoljno dokaza da se demetilacija DNA događa barem djelomično i na pasivan način (Seisenberg i sur., 2012).

Kako bi se ispitalo da li se opseg i vremenski raspored promjena u metilaciji DNA događaju u istoj mjeri u muških i ženskih embrija, zasebno su istraživane spolne prastanice muških i ženskih embrija u fazi 11.5. i 12.5. dana. I vrijeme i stupanj demetiliranosti su bili identični u spolnim prastanicama muških i ženskih embrija, ukazujući da na inicijaciju ovog procesa ne utječe spol embrija. Nediferencirane muške i ženske gonade bi stoga trebale osigurati ekvivalentnu sredinu za epigenetičko reprogramiranje zametnih stanica (Hajkova i sur., 2002).

DNA demetilaza koja je sposobna cijepati ugljik-ugljik vezu između metilne grupe i deoksiriboze citozina nije identificirana u genomu sisavaca, ali postoje indirektni putovi demetilacije koji uključuju deaminaciju ili oksidaciju 5-metilcitozina potencijalno povezani sa ekscizijskim popravkom baza.

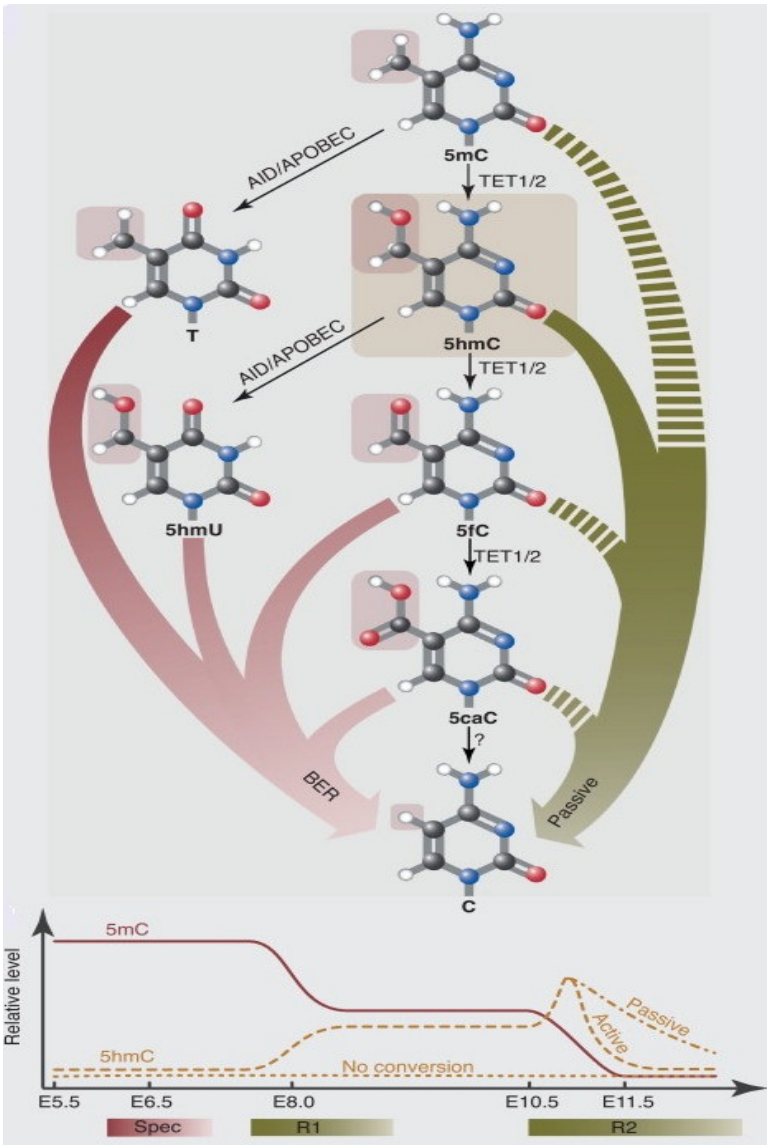
Tri 5mC-dioksigenaze, TET1, TET2 i TET3, reguliraju DNA metilacijski status i olakšavaju demetilaciju DNA pretvarajući 5-metilcitozin (5mC) u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC), 5-formilcitozin (5fC) i 5-karboksilcitozin (5caC) u genomima sisavaca (Sl.4). Oksidacija 5mC u 5hmC i dalje do 5fC i 5caC može imati dvije posljedice: ukidanje represivnog učinka izvornog 5mC i zamjenu sa nemodificiranim citozinom. Gubitak TET proteina može rezultirati povećanom metilacijom DNA.

Dok TET3 protein nije prisutan u spolnim prastanicama, već je jedina 5mC-dioksigenaza koja je značajno eksprimirana u zigoti i njen gubitak dovodi do neuspjeha u brisanju 5mC i neonatalne smrtnosti, TET1 i TET2 su prisutni u spolnim prastanicama i dokaz su da 5-hidroksimetilcitozin zamjenjuje 5-metilcitozin za vrijeme gametogeneze. 5-hidroksimetilcitozin djeluje kao intermedijer u putu aktivne demetilacije ili može olakšati pasivnu DNA demetilaciju isključujući proteine uključene u održavanje metilacije (Li i Sasaki, 2011).



Slika 4. Produkti nastali reakcijama oksidacije i deaminacije 5-metilcitozina (5mC).

Pretvorba 5-metilcitozina u 5-hidroksimetilcitozin omogućava nekoliko alternativnih, ali preklapajućih putova za dobivanje nemodificiranog citozina (C) (Sl. 5).



Slika 5. Višestruki paralelni mehanizmi demetilacije DNA i mogući vremenski obrazac pretvorbe 5mC u 5hmC za vrijeme razvoja primordijalnih zametnih stanica. Metilirani citozin (5mC) može se demetilirati kroz nekoliko preklapajućih putova, uključujući pasivne i aktivne mehanizme, koji se mogu događati paralelno. Pasivna demetilacija (desno) može se dogoditi zbog izravnog gubitka 5mC u replikaciji zbog izostanka ili smanjenja DNA metiltransferazne aktivnosti. Alternativno, TET proteini mogu oksidirati 5-metilcitozin u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC) ili dalje u 5-formilcitozin (5fC) i 5-karboksilcitozin (5caC), koji svi mogu dovesti do pasivne demetilacije. Aktivno brisanje 5-metilcitozina (lijevo) može se dogoditi kroz deaminaciju bilo 5mC ili 5hmC do timina (T) ili 5-hidroksimetiluridina (5hmU) koji mogu biti supstrati ekscizijskom popravaku baza (BER). Daljnje pretvorbe 5hmC do 5fC i 5caC mogu također biti aktivno uklonjene ekscizijskim popravkom baza ili bi se 5caC mogao ukloniti izravnom reakcijom dekarboksilacije (centar) (Hackett i sur., 2012).
Skraćenice: E, embrionski dan, od eng. *embryonic day*; AID/APOBEC, od eng. *activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide*

Jedan od njih je aktivna demetilacija posredovana komponentama ekscizijskog popravka baza (BER, od eng. *base excision repair*). Naime, daljnjom deaminacijom 5-metilcitozina ili 5-hidroksimetilcitozina do timina (T) odnosno 5-hidroksimetiluridina (5hmU) sa

deaminazama iz obitelji AID/APOBEC, stvaraju se supstrati za ekscizijski popravak baza. Glikozilazom se izrezuju i dalje popravljaju u nemodificirani citozin. Deaminaza AID (od eng. *activation-induced cytidine deaminase*) se može detektirati jedino od 12.5. embrionalnog dana u spolnim prastanicama, a njen gubitak narušava demetilaciju DNA (Hackett i sur., 2012)..

Daljnja mogućnost je da 5hmC bude izravna meta za ekscizijski popravak baza i 5hmC-specifičnu glikozilazu, bez potrebe za deaminacijom ili daljnjom oksidacijom. 5fC i 5caC također mogu biti aktivno uklonjeni pomoću ekscizijskog popravka baza, dok bi se teoretski 5caC mogao i direkto ukloniti dekarboksilacijom sa još uvijek nepoznatim enzimom.

Preostaje još utvrditi važnost 5-formilcitozina i 5-karboksilcitozina u ključnim koracima reprogramiranja i njihov doprinos mehanizmima demetilacije.

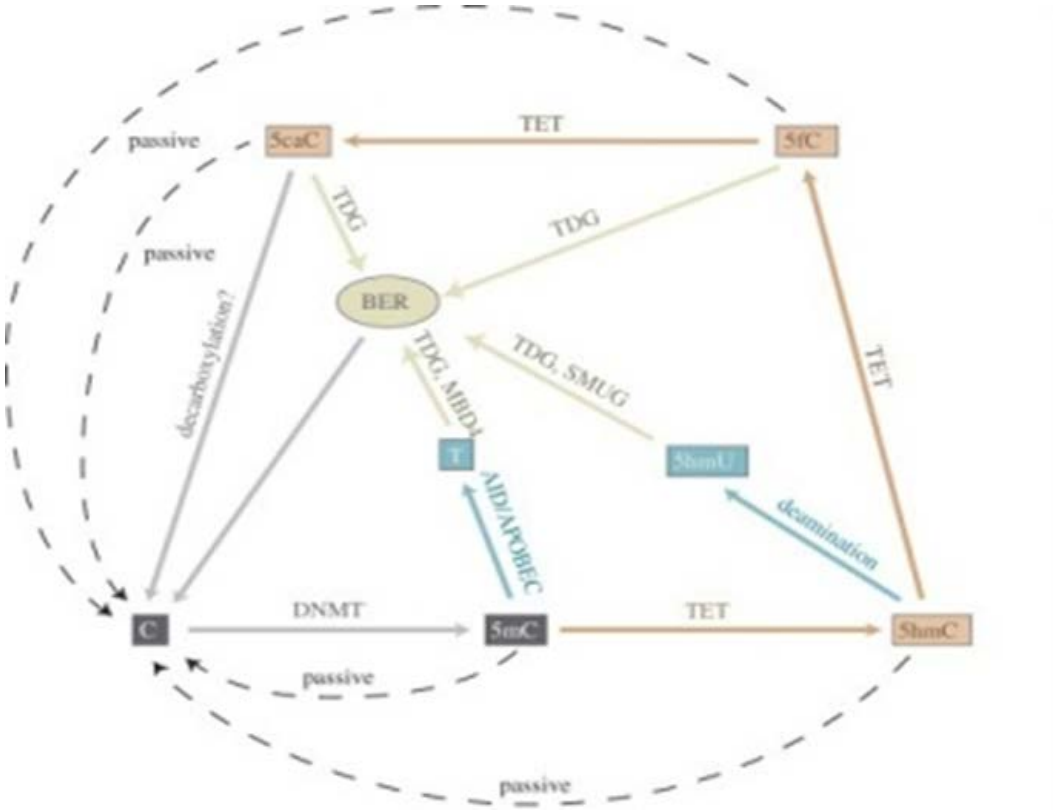
Također je moguće da alternativni mehanizmi neovisni o 5-hidroksimetilcitozinu doprinose ili upravljaju aktivnom demetilacijom u spolnim prastanicama. Kod *Arabidopsis thaliana* demetilacija se odvija direktnim izrezivanjem 5-metilcitozina specifičnim bifunkcionalnim DNA glikozilazama/ lijazama, DEMETER (DME) i ROS1 (od eng. *REPRESSOR OF SILENCING 1*), nakon čega slijedi ekscizijski popravak baza. Iako ne postoje ortolozi DME-ROS1 u sisavaca, niti je ijedna 5mC-specifična glikozilaza opisana, ostaje teoretska mogućnost da se 5-metilcitozin može direkto izrezati iz genoma spolnih prastanica (Hackett i sur., 2012).

Druga mogućnost je da se 5-metilcitozin deaminira direktno do timina (T), zatim izreže glikozilazom koja prepoznaje T-G krivo sparene parove baza, kao što su TDG (od eng. *thymine DNA glycosylase*) i MBD4 (od eng. *methyl-CpG-binding domain protein 4*) glikozilaze i zamijeni sa nemodificiranim citozinom ekscizijskim popravkom baza (Sl. 6).

Mehanizam temeljen na ekscizijskom popravku baza ima barem djelomičnu ulogu u aktivnoj demetilaciji DNA spolnih prastanica, iako trenutačno nije jasno koji proteinski kompleksi upravljaju procesom i koji točno supstrati mogu biti meta BER mašinerije.

Također je pokazano da je brisanje 5-metilcitozina povezano sa ekscizijskim popravkom nukleotida (NER, od eng. *nucleotide excition repair*), što bi moglo pridonijeti demetilaciji

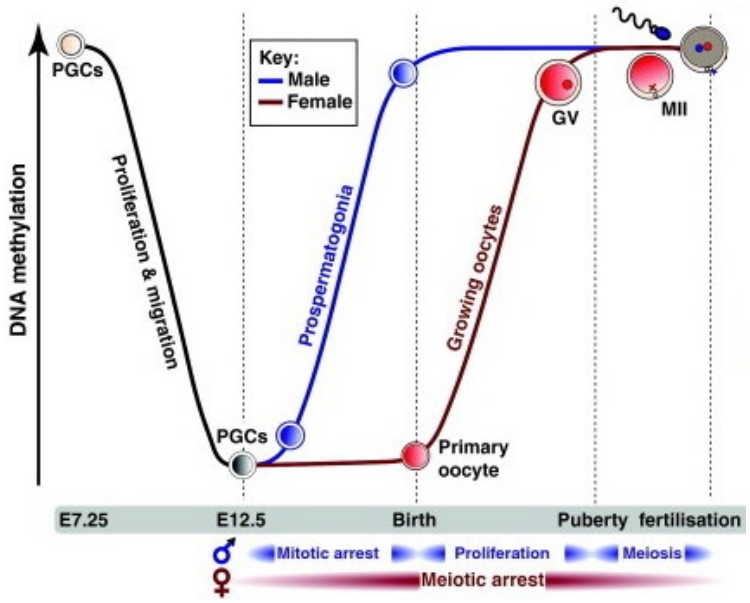
DNA za vrijeme migriranja spolnih prastanica (između približno 8.5. i 10.5. dana). Međutim, ostaje nejasno može li se ovaj mehanizam odvijati oko 11.5. dana zbog odsutnosti nekoliko ključnih komponenata ekscizijskog popravka nukleotida između 10.5. i 12.5. dana (Hackett i sur., 2012).



Slika 6. Putevi brisanja obrazaca metilacije u primordijalnim zametnim stanicama. Citozin (C) se metilira na C-5 poziciji sa DNA metiltransferazom (DNMT) da bi nastao 5-metilcitozin (5mC). 5mC može biti izgubljen pasivno za vrijeme replikacije DNA, ili aktivno enzimskom aktivnošću. 5mC može biti deaminiran do timina (T) sa AID/APOBEC deaminazama, ili oksidiran do 5-hidroksimetilcitozina (5hmC) sa enzimima iz TET obitelji. 5hmC može biti deaminiran do 5-hidroksimetiluracila (5hmU), ili dalje oksidiran TET aktivnošću do 5-formilcitozina (5fC) i 5-karboksilcitozina (5caC). T, 5hmU, 5fC i 5caC se mogu izrezati glikozilazama poput timin DNA glikozilaze (TDG), jednolančane-selektivne monofunkcionalne uracil DNA glikozilaze 1 (SMUG1) i MBD4, i tako inicirati ekscizijski popravak baza, što će rezultirati njihovom zamjenom sa nemodificiranim C (Seisenberg i sur., 2012).

2.2 Spolno-specifična remetilacija zametnih stanica

Demetilacijska dinamika u muških i ženskih spolnih prastanica je gotovo identična; međutim, uspostavljanje spolno-specifičnih obrazaca metilacije događa se u različito vrijeme i u različitim staničnim okolinama u muškaraca i žena. U ženskim zametnim stanicama, razina metilacije DNA ostaje niska do 16.5. dana. Nasuprot tome, u isto vrijeme, muške zametne stanice su već postigle 50% globalne metilacije DNA, jer je remetilacija započela već 14.5. dana u prospermatogonijama (Sl.7).



Slika 7. *De novo* metilacija zametnih stanica (Smallwood i Kelsey, 2011).
Skraćenice: PGCs, primordijalne zametne stanice, od eng. *primordial germ cells*; GV, germinalna vezikula, od eng. *germinal vesicle*; MII, mejoza II, od eng. *meiosis II*.

Obrasci metilacije u muškim zametnim stanicama su potpuno uspostavljeni pri rođenju, a zatim se održavaju kroz mnogo ciklusa mitotičkih dioba prije nego stanice uđu u mejozu. Kod žena, remetilacija zametnih stanica započinje rođenjem u rastućim oocitama i ne uspostavlja se u potpunosti sve dok stanice ne postanu zrele gamete (Sl. 7) (Smith i Meisser, 2013).

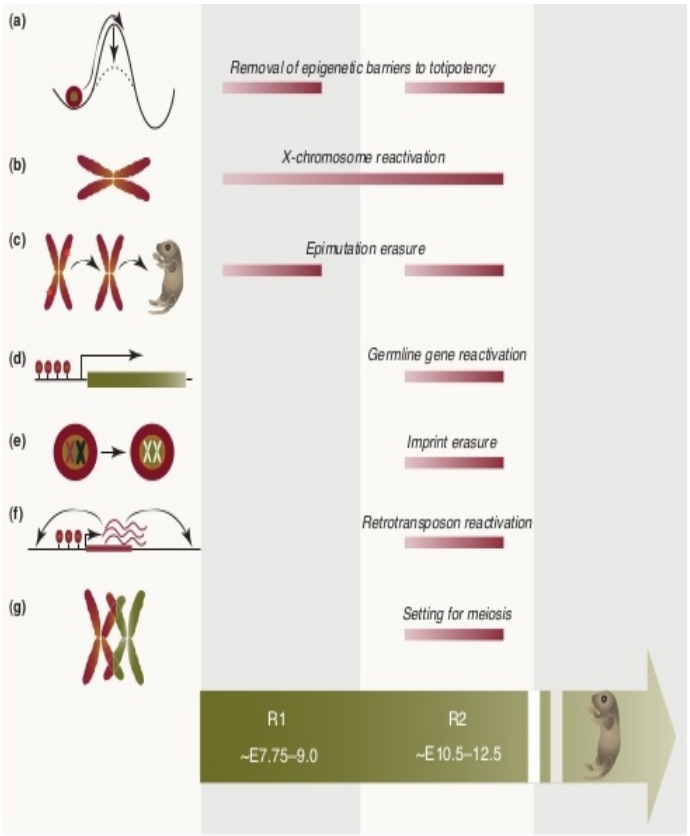
Oocite i spermiji zadržavaju velike razlike u svojim metilacijskim statusima; spermiji su jako metilirani, približno 85% CpG metilacije, dok su oocite umjereno metilirane sa globalnom metilacijom oko 30%.

Unatoč različitom razvoju i remetilacijskoj dinamici, protein DNMT3L (od eng. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3-like*) i metiltransferaza DNMT3A (od eng. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A*) su esencijalni za *de novo* metilaciju u oba spola. DNMT3L protein nema metiltransferaznu aktivnost, ali je jako eksprimiran u zametnim stanicama i može tvoriti kompleks sa DNMT3A metiltransferazom. Kada su geni koji kodiraju te proteine 'izbačeni' iz spolnih stanica miša, utvrđeno je da su proteini DNMT3L i DNMT3A potrebni za uspostavu majčinih utisaka u rastućim oocitama. U tim studijama, embriji nastali iz mutantnih oocita pokazivali su gubitak metilacije DNA na majčinim alelima koji su inače metilirani i bialelnu ekspresiju. Kasnije je potvrđeno da mutantne oocite doista nisu imale metiliranu DNA na regijama različite metiliranosti (DMRs, od eng. *differentially methylated regions*), a to su regije koje su metilirane na samo jednom od dva roditeljska kromosoma (Li i Sasaki, 2011).

Spolne razlike u *de novo* metilaciji vjerojatno uključuju molekularne komponente koje su jedinstvene za svaki spol, ali točan mehanizam ostaje nepoznat (Smith i Meisser, 2013).

3. POTENCIJALNE ULOGE EPIGENETIČKOG REPROGRAMIRANJA U SPOLNIM PRASTANICAMA

Temeljna uloga epigenetičkog reprogramiranja u spolnim prastanicama je suprimirati naslijeđene somatske epigenomske barijere i uspostaviti epigenetski obrazac koji će dovesti do razvitka gameta sposobnih stvoriti totipotentnu zigotu u sljedećoj generaciji (Sl. 8).



Slika 8. Potencijalne uloge epigenetičkog reprogramiranja u spolnim prastanicama i kronologija događaja.
a) Događaji epigenetičkog reprogramiranja za vrijeme migracije spolnih prastanica (R1) i poslije migracije (R2) nadilaze epigenetske modifikacije stečene od stanica epiblasta koje tvore zapreku postizanju totipotencije.
b) U ženskim stanicama reprogramiranje doprinosi reaktivaciji X kromosoma.
c) Brisanje epigenetskih biljega također spriječava nasljeđivanje epimutacija.
d) Globalna demetilacija DNA u fazi R2 izaziva aktivaciju stabilno utišanih (inaktivnih) gena potrebnih za razvoj zametnih stanica.
e) Temeljna uloga reprogramiranja je brisanje roditeljskih utisaka čime se omogućuje daljnje uspostavljanje spolno-specifičnih metilacijskih biljega za vijeme gametogeneze.
f) Brisanje metiliranog citozina (5mC) može dopustiti prolaznu ekspresiju retrotranspozona čija se transkripcija zatim reprimira malim RNA (sRNA, od eng. *small RNA*), čime se osigurava snažno utišavanje potencionalno štetnih genetičkih elemenata.
g) Reprogramiranje osposobljava spolne prastanice za ulazak u mejozu (Hackett i sur., 2012).

5. LITERATURA

Hackett A. *et al.* (2012) Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends Genet.* **28(4)**:164-74.

Hajkova P. *et al* (2002) Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev*. **117**: 15–23

Leitch H. *et al.* (2013) Epigenetics and development (Chapter 5: Primordial Germ-Cell Development and Epigenetic Reprogramming in Mammals), 149-187.

Li Y. and Sasaki H. (2011) Genomic imprinting in mammals: its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. *Cell res*. **21(3)**: 466–473

Seisenberg S. *et al.* (2012) Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barries. *Philos Trans R Soc B.* **368(1609)**: 20110330

Smallwood SA. and Kelsey G. (2011) De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet.* **28(1)**:33-42

Smith Z. and Meissner A. (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* **14(3)**:204-20

http://epigenie.com/

6. SAŽETAK

Epigenetski profil spolnih prastanica, koji je definiran modifikacijama DNA i kromatina, dinamično se mijenja za vrijeme njihovog razvoja. Dva puta u životnom ciklusu, metilacijski biljezi DNA se reprogramiraju na globalnoj razini i istodobno se obnavlja razvojni potencijal. Obrasci metilacije DNA su zatim ponovno uspostavljeni, u skladu sa različitim staničnim sudbinama. Ovo reprogramiranje metilacijskog obrasca DNA odvija se u zigoti nakon fertilizacije i u primordijalnim zametnim stanicama, koje su izravni preci spermija i oocita. U svakoj fazi reprogramiranja, jedinstveni set mehanizama regulira brisanje metilacije DNA i njezino ponovno uspostavljanje.

Još nema istraživanja o potpunoj ontogenezi spolnih stanica u čovjeka i jako malo podataka je zabilježeno u vezi s kromatinskim promjenama i demetilacijom DNA u spolnim prastanicama. Doista, nije ustanovljen konačan redoslijed zbivanja ovih događaja u čovjeka (Leitch i sur., 2013).

7. SUMMARY

The epigenetic profile of germ cells, which is defined by modifications of DNA and chromatin, changes dynamically during their development. At two points in the life cycle, DNA methylation marks are reprogrammed on a global scale, concomitant with restoration of developmental potency. DNA methylation patterns are subsequently re-established with the commitment towards a distinct cell fate. This reprogramming of DNA methylation takes place firstly on fertilization in the zygote, and secondly in primordial germ cells (PGCs), which are the direct progenitors of sperm or oocyte. In each reprogramming phase, a unique set of mechanisms regulates DNA methylation erasure and re-establishment.

No studies are yet available on the full ontogeny of germline epigenetic reprogramming in the human and very few observations have been reported with regard to chromatin changes and DNA demethylation in PGCs. Indeed, a definitive timeline of when these events occur in humans has not been established (Leitch i sur., 2013).