UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Mosaicismo e evolução do perfil epigenético durante a
gravidez

Karina Bezerra Salomão

Ribeirão Preto
2013

Karina Bezerra Salomão

Mosaicismo e evolução do perfil epigenético durante a gravidez

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER
MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA,
DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto/USP.

Salomão, Karina Bezerra.

Mosaicismo e evolução do perfil epigenético durante a gravidez.

112p. il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Genética.

Orientadora: Ramos, Ester Silveira

1. Epigenética. 2. *Imprinting* Genômico 3. Placenta 4. Inativação do Cromossomo X 5. Metilação do DNA 6. Mosaicismo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karina Bezerra Salomão

Mosaicismo e evolução do perfil epigenético durante a gravidez

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Genética

Aprovado em ____/____/____

Banca examinadora

Profa. Dra Ester Silveira Ramos

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

*Dedico a Deus por ter me concedido o dom da vida.
Dedico aos meus pais que à nossa família dedicaram suas vidas.
Dedico às minhas irmãs por terem dado alegria à minha vida.
Dedico ao meu amor por sempre estar do meu lado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proteger, iluminar minhas escolhas e fazer dos meus planos as suas decisões.

À Profª Dra. Ester Silveira Ramos por ter me recebido no Laboratório de Epigenética e Reprodução, me proporcionando a oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela disponibilidade constante em me orientar, pelos conselhos profissionais e pessoais.

À Profª Dra. Susana Marina Chuva de Sousa Lopes pela contribuição científica e envio de amostras para execução do trabalho.

Ao Profº Dr. Geraldo Duarte, aos médicos do Centro Obstétrico do HCFMRP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto), principalmente ao Dr. Conrado Milani Coutinho, pela ajuda na coleta de amostras.

À Profª Dra. Cláudia Paz pela análise estatística, contribuição científica e pelo incentivo.

Aos membros da banca examinadora que aceitaram avaliar e contribuir para a melhoria desse trabalho.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, ao Profº Dr. Espencer Soares e às secretárias Susie e Sílvia pela disponibilidade e atenção.

Ao profº Dr. Valter Augusto Della-Rosa que acreditou no meu potencial e proporcionou minha iniciação na carreira científica.

À Profª Dra. Lúcia Regina Martelli, pela convivência e incentivo.

Aos meus pais, Maria Elizabete e Mauro, que em seus exemplos de vida me ensinaram que o estudo e o trabalho são os melhores meios de alcançar nossos objetivos.

Às minhas irmãs, Luzia Carolina e Kathleen, pela amizade, pelo carinho e que mesmo distantes se fizeram presentes em todos os momentos.

Ao meu namorado Isaque, pelo amor, pela dedicação, por todo cuidado e por se empenhar em não permitir que eu desistisse de meus sonhos.

Aos pais do meu namorado, Iracema e Josué, por serem minha família em Ribeirão Preto, me ajudando em todas as dificuldades.

Aos meus avós paternos, Irene e Moisés (*in memoriam*), por ensinarem que honestidade e força de vontade são essenciais na vida pessoal e na vida profissional.

Aos meus avós maternos, Virginia (*in memoriam*) e José (*in memoriam*), por me amarem e que ficariam orgulhosos por mais essa conquista de nossa família.

Às amigas integrantes do quarteto “Ari” Mari (Mariana Pedrosa), Lari (Larissa Guimarães) e Sari (Sarah Blima – tivemos que adaptar o nome dela para aceitá-la no grupo), pela amizade sincera, por todas as dificuldades e por todos os momentos felizes que compartilhamos.

À amiga Dani (Danielle Tolomeotti) por nunca me deixar esquecer meus verdadeiros objetivos, mesmo que o protocolo seja muito difícil de ser padronizado.

Aos amigos da turma de Biologia/UEM 2006-2010: Aline Cristine, Mariana Umada, Talitha Mayumi, Laíse Hegeto, Christiane Ayo, Marine Zuliani, Ana Caroline, Jean Henrique, Maria Carolina, Rafael Martinelli, Marco Aurélio, Kliszilla Ávila, Carol Pera, por me incentivarem a prestar a seleção de mestrado na USP.

Aos amigos do laboratório de Micromanipulação de Embriões: Rafaella Lemes, Vivian Cipriano, Anderson Mioranza, Reginaldo Vila, Fernanda Elias, Adriana Renzi.

Aos amigos do laboratório de Citogenética Molecular: Alexandra Galvão, Ciro Pereira, Juliana Dourado, Viviane Santana, Camila Martinelli e Silvio Avelino.

Aos amigos que fazem e fizeram parte do laboratório de Epigenética e Reprodução: Paula Felício, Matheus Eiras, Jaqueline Oliveira, Lisandra Caetano, Adriane Oliveira e Marli Galerani.

Ao amigo Murilo Racy Soares pela ajuda no laboratório, nas coletas de amostras, pelas caronas e pela amizade.

À amiga Héliida Magalhães pelo auxílio no laboratório, pelas caronas e pelo convívio.

À amiga Cristiana Libardi pela amizade, por sempre estar disponível para me aconselhar com as técnicas, com a teoria e com decisões pessoais.

Ao amigo Filipe Brum pelo auxílio com as técnicas, pelas sugestões para resolver problemas laboratoriais e pela ajuda para entender a teoria.

Às amigas Mara Aparecida e Flávia Gaona por sempre me receberam pela manhã com um sorriso, pela amizade e pelos almoços divertidos.

Aos funcionários do Bloco C: Luciano, Cristiano, Luís e Paulo pela convivência.

Ao apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento de Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo ao Ensino Pesquisa e Assistência do HCFMRP (FAEPA), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Quando os ventos de mudança sopram, umas pessoas levantam barreiras,
outras constroem moinhos de vento”.
(Érico Veríssimo)

RESUMO

SALOMÃO, K.B. **Mosaicismo e evolução do perfil epigenético durante a gravidez.** 2013. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O *imprinting* genômico, processo regulado epigeneticamente segundo o qual os genes se expressam de acordo com sua origem parental (paterna ou materna), está envolvido no desenvolvimento placentário. Na região cromossômica 11p15.5 encontram-se vários genes importantes para o desenvolvimento fetal e da placenta, os quais são regulados por duas principais regiões controladoras de *imprinting* (ICR1 e 2) onde se encontram as regiões diferencialmente metiladas H19DMR e KvDMR1, respectivamente. O *imprinting* genômico e a inativação aleatória do cromossomo X são processos epigenéticos presentes em mamíferos placentários. O presente trabalho teve como objetivo principal verificar a presença de mosaicismo do perfil epigenético entre tecidos extraembrionários de estágios precoces da gravidez (primeiro trimestre), e em vilosidade coriônica de placentas a termo (terceiro trimestre). Foram coletadas amostras de 10 gestações de primeiro trimestre (vilosidade coriônica, âmion, membrana de cordão umbilical e tecido embrionário) e 14 de terceiro trimestre (vilosidade coriônica), das quais 10 foram consideradas como controles e quatro utilizadas para estudo de mosaicismo restrito à vilosidade coriônica (coleta de amostras de todos os cotilédones). Após extração do DNA, foi utilizado o Método de Digestão Enzimática Sensível à Metilação Associada à PCR em Tempo Real para o estudo do padrão de metilação da KvDMR1 e da H19DMR em diferentes tecidos do primeiro trimestre gestacional e em tecido placentário do terceiro trimestre. O padrão de inativação do cromossomo X foi avaliado em todos os cotilédones de duas placentas a termo, de fetos do sexo feminino, por meio do ensaio do receptor de andrógeno humano (HUMARA assay), utilizando eletroforese capilar, e com acréscimo de um novo marcador de inativação do cromossomo X (ICX1). Na análise estatística foram utilizados o teste *t* não pareado, teste de *Turkey* e teste *t* pareado. A média de metilação da KvDMR1 das amostras de vilosidade coriônica do primeiro trimestre gestacional foi estatisticamente diferente da média de metilação do terceiro trimestre. Enquanto que a metilação da H19DMR não apresentou diferença estatística entre amostras de vilosidade coriônica do primeiro e do terceiro trimestre gestacionais. Com relação ao mosaicismo, a KvDMR1 não apresentou variação com relação ao tamanho ou a posição dos cotilédones, enquanto que a H19DMR apresentou diferença estatisticamente significativa na média de metilação com relação ao tamanho dos cotilédones e ao posicionamento nos quadrantes; em consequência da hipometilação em cotilédones pertencentes a uma das placentas estudadas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na média de metilação da KvDMR1 e da H19DMR entre diferentes tecidos das amostras do primeiro trimestre gestacional. No entanto, a comparação entre tecidos pareados de um mesmo indivíduo mostrou que a metilação não é correspondente entre os tecidos. Os dados obtidos mostram que o *imprinting* genômico provavelmente é um processo dinâmico, que evolui ao longo da gestação, estando relacionado a formação e ao amadurecimento da placenta. No presente estudo foi possível verificar que cotilédones de uma mesma placenta apresentam diferentes padrões de inativação do cromossomo X. Diferenças que podem ser explicadas pela expansão clonal das células trofoblásticas progenitoras com o cromossomo X paterno ou o cromossomo X materno inativo. Devido à variabilidade epigenética, exames em tecidos placentários devem considerar as diferenças intra-placentárias e as diferenças entre tecidos embrionários e extraembrionários.

Palavras-chave: Epigenética; *Imprinting* genômico; Placenta; Inativação do cromossomo X; Metilação do DNA; Mosaicismo.

ABSTRACT

SALOMÃO, K.B. **Mosaicism and evolution of epigenetic profile during pregnancy.** 112p. Dissertation (Master's degree) - University of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Genomic imprinting, a mechanism of allele-specific expression depending on parental origin, is an epigenetic process that regulates the expression of many genes involved in placental development. Several important genes for fetal and placental growth are located on the human chromosome region 11p15.5, which are regulated by two imprinting control regions (ICR1 e 2), which have the differentially methylated regions H19DMR and KvDMR1, respectively. Genomic imprinting and random inactivation of X chromosome are two epigenetic processes present in placental mammals. The present study aimed to verify the presence of epigenetic mosaicism between extra-embryonic and embryonic tissues from early stages of pregnancy (first trimester), and in chorionic villi of term placentas (third trimester). Samples were collected from 10 pregnancies in the first trimester (chorionic villous, amnion, umbilical cord membrane, and embryonic tissue) and 14 from third trimester (chorionic villus sampling), of which 10 were considered as controls and four used to study mosaicism restricted to chorionic villi (sampling of all cotyledons). After DNA extraction, we used real time PCR associated to enzymatic restriction with a methylation sensitive enzyme to study the methylation pattern of KvDMR1 and H19DMR in different tissues from first trimester and placental third trimester tissue. The pattern of X chromosome inactivation was evaluated in all cotyledons from two term placentas of female fetuses, using the human androgen receptor (HUMARA) assay, capillary electrophoresis, and adding a new X chromosome inactivation (ICX1) marker. Unpaired and paired t and Turkey tests were used in statistical analysis. The average methylation of KvDMR1 of chorionic villi samples in first trimester was statistically different from average methylation of the third trimester. While the methylation of H19DMR showed no statistically significant difference between chorionic villi samples in the first and third trimester of pregnancy. In relation to the mosaicism, the KvDMR1 methylation did not vary in respect to the size or position of the cotyledons, while H19DMR showed statistically significant difference in average methylation relative to the size of the cotyledons, to the position in quadrants, due to the hypomethylation in cotyledons from one studied placenta. There were no statistically significant differences in the mean methylation KvDMR1 and H19DMR among different tissues from the first trimester of pregnancy, however, the comparison between paired tissues from the same individual showed that the methylation is different between tissues. The data from this study showed that genomic imprinting is probably a dynamic process and evolved across human pregnancy. This process is probable connected to placenta formation and maturation. We observed different patterns of X chromosome inactivation in cotyledons from the same placenta. This difference could be explained by clonal expansion of a limited number of trophoblastic progenitor cells with either an inactive maternal or paternal X chromosome. Due to the epigenetic variability, placental tissue examinations must consider the differences intra-placental and differences between embryonic and extra-embryonic tissues.

Keywords: Epigenetics; Genomic Imprinting; Placenta; X Chromosome Inactivation; Methylation of DNA; Mosaicism.

ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
% Sup	Porcentagem de metilação do alelo superior
% Inf	Porcentagem de metilação do alelo inferior
°C	Grau Celsius
5-mC	5-metilcitosina
AdoMet	Composto S-Adenosil-Metionina
AR	<i>Receptor Androgen Gene</i> (Gene do receptor de andrógeno)
CDKN1C	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i> (Inibidor de quinase dependente de ciclina)
CH ₃	Radical metil
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
CONEP	Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
CpG	Dinucleotídeo Citosina-fosfato-Guanina
CPM	<i>Confined Placental Mosaicism</i> (Mosaicismo confinado à placenta)
Ct	Ciclo <i>threshold</i> – número do ciclo no qual o nível de fluorescência emitido pela amostra amplificada atingiu o nível arbitrário
CTB	Citotrofoblasto
CTCF	Fator de ligação CCCTC
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i> (Fator de Crescimento do Tecido Conectivo)
DESM-RT	Método de Digestão Enzimática Sensível à Metilação Associada à PCR em Tempo Real (do inglês, Real-time PCR approach associated to enzymatic restriction with a methylation-sensitive enzyme)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMR	<i>Differentially Methylated Region</i> (Região Diferencialmente Metilada)
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i> (enzima DNA metiltransferase)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
FC	Fator de Correção
g	Grama
H19	Gene supressor tumoral H19
H19DMR	<i>H19 differential methylated region</i> (região diferencialmente metilada do

	<i>H19 – ICR1)</i>
H3K27me3	Tri-methylation of lysine 27 on histone H3 (Trimetilação da lisina 27 na histona H3)
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCl	Ácido Clorídrico
HUMARA	Human Androgen Receptor (Receptor de Andrógeno Humano)
ICR	<i>Imprinting control region</i> (Região Controladora de <i>Imprinting</i>)
ICSI	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i> (Injeção intracitoplasmática de espermatozoide)
ICX	Inativação do Cromossomo X
IG	Idade Gestacional
<i>IGF2</i>	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i> (Fator de Crescimento Semelhante a Insulina)
IQ	Intervalo interquartil
KCl	Cloreto de Potássio
Kb	Kilobase
<i>KCNQ1</i>	<i>Potassium channel, voltage-gated, kqt-like subfamily, member 1</i>
<i>KCNQ1OT1</i>	<i>KCNQ1-overlapping transcript 1</i>
Kv	Quilovoltz
<i>KvLQT1</i>	<i>Potassium Voltage-Gated Channel</i>
Ld	Marcador (Ladder) de pares de bases (no gel)
<i>LIT1</i>	<i>Long intronic transcript 1</i> (Transcrito Anti-Sense do Gene <i>KvLQT1</i>)
LOI	<i>Genomic Loss of Imprinting</i> (Perda genômica de <i>imprinting</i>)
LUMC	<i>Leiden University Medical Center</i>
M	Molar
MCI	Massa Celular Interna
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
Ms-SnuPE	<i>Methylation-sensitive single nucleotide primer extension</i>
MS-PCR	PCR Específica para Metilação (do inglês, <i>Methylation Specific PCR</i>)
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ncRNAs	RNAs não codificadores
ND	Amostra não digerida

ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico
p	Braço curto do cromossomo
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCR2	<i>Polycomb Repressive Complex 2</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
Plc	Placenta
<i>PHLDA2</i>	<i>Pleckstrin homology-like domain, family a, member 2</i>
pmol	Picomol
q	Braço longo do cromossomo
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RPM	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RN	Recém-nascido
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SBW	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SNP	<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
SRS	Síndrome de Silver-Russel
STB	Sinciciotrofoblasto
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFD	Trofoctoderme
Tris	Hidroximetil Aminometano
tRNA	RNA transportador
TSS	Transcription Start Site
USP	Universidade de São Paulo
UTR	<i>Untranslated Region</i> (Região não-traduzida)
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Endotelial)

Vascular)

XIC	<i>X Inactivation Center</i> (Centro de Inativação do Cromossomo X)
XIST	<i>X-inactive specific transcript</i> (Transcrito específico do X-inativo)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo do <i>imprinting</i> genômico.....	26
Figura 2.	Genes que sofrem <i>imprinting</i> genômico na região cromossômica 11p15.5.....	28
Figura 3.	Inativação do cromossomo X em camundongos.....	31
Figura 4.	Esquema resumindo as três fases (aposição, adesão estável e invasão) da implantação do blastocisto no endométrio.....	33
Figura 5.	Representação esquemática da invasão trofoblástica intersticial e endovascular na gravidez humana após 6 semanas (A) e após 20 semanas (B) de gestação.....	35
Figura 6.	(A) Aspecto geral da Plc 1, proveniente de gestação a termo, de feto masculino com 39 semanas e 3 dias, apresentando 12 cotilédones. (B) Divisão da placenta em quadrantes de acordo com a inserção do cordão umbilical. (C) Divisão dos cotilédones em periféricos (sem contato com a inserção do cordão umbilical) e centrais. (D) Vilosidade coriônica obtida após dissecação de um fragmento de cotilédone coletado (Aumento de 20x).....	44
Figura 7.	Curva de amplificação por PCR em tempo real da região KvDMR1 para a amostra Plc 1, cotilédone 1.....	50
Figura 8.	Curva de amplificação por PCR em tempo real da região H19DMR para a amostra Plc 4, cotilédone 4.....	56
Figura 9.	Ensaio de HUMARA, Eletroferograma para o fragmento do gene AR da amostra Plc 2, cotilédone 1.....	62
Figura 10.	Eletroferograma para o novo marcador ICX1 da Plc2, cotilédone 1.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados gerais das pacientes brasileiras, doadoras de amostras de placenta de terceiro trimestre, com coleta de diferentes cotilédones.....	42
Tabela 2.	Dados gerais das pacientes brasileiras, doadoras de amostras de placenta do grupo controle do terceiro trimestre gestacional.....	42
Tabela 3.	Quantificação da metilação da KvDMR1, obtida pela técnica DESM-RT em amostras de tecido embrionário, cordão umbilical, vilosidade coriônica e âmnion referentes ao grupo do primeiro trimestre gestacional.....	51
Tabela 4.	Quantificação da metilação da KvDMR1, obtida pelo método DESM-RT em amostras de vilosidade coriônica do terceiro trimestre gestacional em diferentes cotilédones.....	52
Tabela 5.	Quantificação da metilação da KvDMR1, obtida pelo método DESM-RT, em amostras controle de vilosidade coriônica do terceiro trimestre gestacional.....	55
Tabela 6.	Quantificação da metilação da H19DMR, obtida pela técnica DESM-RT em amostras de tecido embrionário, cordão umbilical, vilosidade coriônica e âmnion referentes ao primeiro trimestre gestacional.....	57
Tabela 7.	Quantificação da metilação da H19DMR, obtida pelo método DESM-RT em amostras de vilosidade coriônica do terceiro trimestre gestacional em diferentes cotilédones placentários.....	58
Tabela 8.	Quantificação da metilação da H19DMR, obtida pelo método DESM-RT, em amostras controle de vilosidade coriônica do terceiro trimestre gestacional.....	61
Tabela 9.	Porcentagem de metilação dos alelos do marcador ICX1 e do gene <i>AR</i> em vilosidade coriônica de terceiro trimestre gestacional.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Representação gráfica dos perfis de metilação da KvDMR1 dos tecidos pareados de primeiro trimestre (embrião, cordão umbilical, vilosidade coriônica e âmnion) para as amostras E1, E2, E3, E4, E7, E10, E12, E13, E15 e E23.....	51
Gráfico 2.	Representação esquemática da variação do perfil de metilação da KvDMR1 entre cotilédones periféricos e centrais em placentas de terceiro trimestre gestacional (Plc 1, Plc 2, Plc 3 e Plc 4).....	53
Gráfico 3.	Representação gráfica da variação da metilação intraplacentária da KvDMR1 das amostras Plc1, Plc 2, Plc 3 e Plc 4. As caixas representam o intervalo interquartil (IQ) para todos os cotilédones dentro de cada placenta. As linhas verticais representam os últimos dados dentro de +- 1,5 vezes o IQ e as barras horizontais indicam as medianas.....	54
Gráfico 4.	Representação gráfica dos perfis de metilação da H19DMR dos tecidos pareados de primeiro trimestre (embrião, cordão umbilical, vilosidade coriônica e âmnion) para as amostras E1, E2, E3, E4, E7, E10, E12, E13, E15 e E23.....	57
Gráfico 5.	Representação gráfica da variação do perfil de metilação da H19DMR entre cotilédones periféricos e centrais em placentas de terceiro trimestre gestacional (Plc 1, Plc 2, Plc 3 e Plc 4).....	59
Gráfico 6.	Representação gráfica da variação da metilação intraplacentária da H19DMR das amostras Plc1, Plc 2, Plc 3 e Plc 4. As caixas representam o intervalo interquartil (IQ) para todos os cotilédones dentro de cada placenta. As linhas verticais representam os últimos dados dentro de +- 1,5 vezes o IQ e as barras horizontais indicam as medianas.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Epigenética	23
1.2 <i>Imprinting</i> (marcação) Genômico	24
1.3. Inativação do Cromossomo X	29
1.4 A Placenta Humana	32
1.5 Epigenética e a Placenta	36
2. OBJETIVOS	39
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Aspectos Éticos do Projeto	41
3.2. Casuística	41
3.3. Tecido Placentário e Embrionário	43
3.3.1. Mapeamento dos cotilédones	43
3.4. Extração de DNA	45
3.5. Análise do Padrão de Metilação da KvDMR1 e da H19DMR	45
3.6. Análise do Padrão de Inativação do Cromossomo X	46
3.7. Análise Estatística	48
4. RESULTADOS	50
4.1. Análise do Padrão de Metilação da KvDMR1 em amostras de primeiro e terceiro trimestre gestacionais.	50
4.2. Análise do Padrão de Metilação da H19DMR em amostras de primeiro e terceiro trimestres gestacionais.	56
4.3. Análise do Padrão de Inativação do Cromossomo X em amostras de terceiro trimestre gestacional.	62
5. DISCUSSÃO	66
5.1. Padrão de metilação da KvDMR1 e da H19DMR em tecidos embrionários e extraembrionários.	66
5.2 Padrão de inativação do cromossomo X em tecido placentário.	73

6.	CONCLUSÃO	78
7.	REFERÊNCIAS	80
8.	APÊNDICES.....	93
9.	ANEXOS.....	112

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epigenética

O termo epigenética foi utilizado pela primeira vez por Conrad Waddington, em 1942. Segundo esse pesquisador, o curso do desenvolvimento é determinado pela interação dos genes entre si e com o ambiente. Holliday aplicou o termo “epigenética”, em 1987, para situações em que mudanças na metilação do DNA resultavam em alterações na função gênica. Em 1996, Arthur Riggs e colaboradores definiram epigenética como o estudo das mudanças na função gênica herdáveis mitótica e/ou meioticamente que não poderiam ser explicadas por mudanças na estrutura primária da molécula de DNA (HAIG, 2004; BIRD, 2007).

Um conceito muito utilizado atualmente foi elaborado por Bird, em 2007, o qual definiu os eventos epigenéticos como adaptações estruturais de regiões cromossômicas de modo a registrar, sinalizar ou perpetuar estados alterados de atividade. Essa definição inclui marcas cromossômicas, modificações transitórias associadas com reparo do DNA ou fases do ciclo celular e mudanças estáveis mantidas através de gerações de multiplicação celular.

A informação epigenética fornece uma forma de memória necessária para a manutenção da função genômica, incluindo a expressão gênica diferencial de uma dada linhagem celular e a propagação de características arquitetônicas essenciais como telômeros e centrômeros, requeridas para a viabilidade celular e o *status* de proliferação. Uma vez estabelecidas as marcas epigenéticas, a herança epigenética é o principal meio para garantir sua transmissão da célula-mãe para a célula-filha e, potencialmente, de geração para geração. A modulação da cromatina garante níveis particulares de expressão gênica, sendo fundamental para a transmissão da herança epigenética. As modificações epigenéticas incluem, além da metilação do DNA, as modificações de histonas, proteínas de cromatina não-histônicas que se ligam diretamente ao DNA, ou aos modificadores de histonas, e RNAs não codificadores (PROBST; DUNLEAVY; ALMOUZNI, 2009).

A cromatina é um complexo multimolecular formado pelo DNA genômico compactado no núcleo, associado com proteínas. A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, que consiste de um cerne formado por um octâmero de histonas (duas cópias de cada: H2A, H2B, H3 e H4) envolvido por cerca de 146 pares de base de DNA (LUGGER et al., 1997). As caudas aminotermiais das histonas se sobressaem em relação ao DNA e ficam expostas na superfície do nucleossomo, estando sujeitas às modificações químicas, tais como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação, catalizadas por diversas enzimas. O conceito do código de histonas foi proposto devido à influência exercida por estas

proteínas na função do DNA, como efeito do seu posicionamento ou das modificações N-terminais que permitem ou não o acesso de fatores de transcrição aos sítios ligadores, conferindo um programa particular de expressão gênica (MARGUERON; TROJEN; REINBERG, 2005; NIGHTTINGALE; O'NEIL; TURNER, 2006; STRAHL; ALLIS, 2000).

O mecanismo epigenético baseado em RNAs não-codificadores (ncRNAs) desempenha um papel significativo na regulação da expressão gênica, na dinâmica cromossômica e em fenômenos que têm impacto na diferenciação celular normal e no desenvolvimento do organismo, o que inclui processos como a compensação de dose dos cromossomos sexuais (inativação do cromossomo X) e o *imprinting* (marcação) genômico (BERNSTEIN; ALLIS, 2005).

A metilação de dinucleotídeos CG (ou CpGs) no genoma de mamíferos é até o momento a modificação epigenética mais estudada, sendo um mecanismo importante na regulação da atividade gênica, na estrutura da cromatina e na estabilidade genômica (BIRD; WOLFFE, 1999). No genoma humano, mais de 30 milhões de pares de base são CpGs e esses sítios são plataformas-alvo para a metilação, sendo que aproximadamente 60-90% das sequências CpGs no genoma está metilada. O carbono da posição 5' da citosina no dinucleotídeo 5'-CpG-3' é usualmente modificado por um grupo metil, formando o agrupamento 5-metilcitosina, e o mesmo acontece com o resíduo de citosina complementar 3'-GpC-5', que também é simetricamente metilado. As regiões ricas em CpGs são denominadas ilhas CpGs que, normalmente, são encontradas na região promotora ou no sítio de início da transcrição, e a expressão gênica é geralmente reprimida quando essas regiões se tornam hipermetiladas (NAKAO, 2001; OHKI et al., 2001).

As DNAs metiltransferases (DNMTs) são enzimas-chave no processo de metilação do DNA, pois realizam a transferência do grupo metil para o carbono da posição 5' da citosina, utilizando o composto S-adenosil-metionina (AdoMet) como fonte doadora de grupo metil (HERMANN; GOWHER; JELTSCH, 2004). As DNMTs de mamíferos são classificadas em dois grupos: DNMTs *de novo* (DNMT3A e DNMT3B), expressas principalmente nas células germinativas e embrionárias; e DNMTs de manutenção (DNMT1) que garantem a herdabilidade do epigenoma durante a divisão celular (BESTOR, 2000; XU et al., 2010).

1.2 *Imprinting* (marcação) Genômico

Em células diplóides de mamíferos, os genes autossômicos geralmente apresentam expressão dos alelos maternos e paternos de maneira equivalente. Entretanto, em mamíferos placentários, existe um conjunto de genes em que apenas um alelo de um par é expresso de acordo com a origem parental, devido a um processo epigenético denominado

imprinting (marcação) genômico. Alguns desses genes apresentam expressão apenas do alelo paterno, enquanto em outros somente o alelo materno é expresso (REIK; WALTER, 2001; SURANI, 1998).

Estudos realizados em camundongos para produzir embriões com apenas um conjunto cromossômico parental (embrião uniparental), ou seja, embriões ginogenéticos, possuindo apenas material genético materno, e androgenéticos, possuindo somente material genético paterno, demonstraram que o genoma diplóide derivado de apenas um dos parentais é incapaz de garantir a embriogênese completa e a formação de tecidos extraembrionários normais; e que o *imprinting* do genoma seria essencial para o desenvolvimento completo do indivíduo (MACGRATH; SOLTER, 1984; SURANI; BARTON; NORRIS, 1984).

O *imprinting* genômico é observado predominantemente em mamíferos placentários e evoluiu de maneira independente em plantas angiospermas, nas quais o endosperma apresenta uma função relacionada à função placentária (SCOTT; SPIELMAN, 2006). Foram identificados aproximadamente 80 genes no genoma humano que apresentam essa marcação (GENEIMPRINTING, 2012). As funções dos genes que sofrem *imprinting* estão relacionadas principalmente ao crescimento fetal e ao desenvolvimento (REIK; WALTER, 2001).

Os mecanismos que controlam o *imprinting* ainda não estão completamente esclarecidos, entretanto, a metilação diferencial do DNA entre os alelos herdados paternal ou maternalmente parece ser um importante fator e provavelmente um dos principais controladores para essa marcação (REIK; WALTER, 2001). Por outro lado, na manutenção do *imprinting* genômico tem sido demonstrado um maior envolvimento dos mecanismos de metilação do DNA, modificação de histonas e baseados em ncRNAs (WAGSCHAL; FEIL, 2006).

Os genes que sofrem *imprinting* apresentam como características sequências ricas em ilhas CpGs. Os genes marcados, em sua maioria, se encontram fisicamente ligados formando *clusters*, nos quais estão presentes genes expressos maternal e paternalmente. Pelo menos um gene dentro do *cluster* é transcrito na forma de um ncRNA que regula o *imprinting* nas regiões adjacentes. Os *clusters* têm a expressão regulada por regiões controladoras de *imprinting* (ICRs, do inglês *Imprinting Control Regions*). As ICRs apresentam regiões diferencialmente metiladas (DMRs, do inglês *Differentially Methylated Regions*) que estão sujeitas à metilação do DNA em apenas um dos alelos do loco, estabelecida na linhagem germinativa, de maneira parental-específica (REIK; WALTER, 2001; WEAVER; SUSIARJO; BARTOLOMEI, 2009).

As DMRs podem ser classificadas em germinativas e somáticas. As DMRs da linhagem germinativa são locos que exibem diferenças em seus estados de metilação entre

o espermatozóide e o óvulo, e são mantidas pós-fertilização. Enquanto, em DMRs somáticas, a metilação do DNA é de origem parental-específica e é estabelecida após a fertilização (WOODFINE; HUDDLESTON; MURREL, 2011).

O *imprinting* é estabelecido durante o desenvolvimento da linhagem germinativa. As marcas epigenéticas de metilação do DNA são mantidas na linhagem somática durante o desenvolvimento do organismo, enquanto que na linhagem germinativa, a marcação de *imprinting* está apagada durante a migração das células germinativas para a crista gonadal, e uma metilação *de novo* reestabelece as marcas de *imprinting* sexo-específicas durante a diferenciação das células germinativas em oócitos ou espermatozóide (Figura 1) (REIK; WALTER, 2001).

Figura 1. Ciclo do *imprinting* genômico. Remoção, estabelecimento e manutenção das marcas de metilação em centros de *imprinting* durante o desenvolvimento embrionário e das células germinativas. As regiões controladoras 1 (ICR1) e 2 (ICR2) são mostradas como exemplo. A cor cinza indica o alelo metilado e a branca, o alelo não-metilado. Cromossomos parentais são marcados de acordo com o sexo em azul (masculino) e vermelho (feminino). A leitura (interpretação transcricional do *imprinting* primário) no desenvolvimento embrionário é indicada por setas (adaptado de REIK; WALTER, 2001; ISHIDA; MOORE, 2012).

Em humanos, no braço curto do cromossomo 11 (região 11p15.5), está mapeado um importante grupo de genes regulados por *imprinting* genômico. Muitos autores sugerem que o *imprinting* dessa região é regulado por duas ICRs, sendo uma telomérica (ICR1) onde

estão mapeados, entre outros, os genes Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 2 (*IGF2*, do inglês *insulin-like growth factor 2*) e o supressor tumoral *H19*, e uma centromérica (ICR2), onde estão os genes Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina (*CDKN1C*, do inglês *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*, ou *p57kip2*), Canal de Potássio Voltagem-Dependente (*KvLQT1*, do inglês *Potassium Voltage-Gated Channel*) e o Transcrito Anti-Sense do gene *KvLQT1* (*LIT1*, do inglês *Long intronic transcript 1*, ou *KvLQT1AS*), dentre outros (Figura 2) (MAHER; REIK, 2000).

A ICR1 é metilada no alelo paterno e é regulada por uma DMR mapeada 2kb acima (*upstream*) do gene *H19*, a H19DMR. Com a ausência de metilação no alelo materno é possível o acesso de *enhancers* à extremidade 3' do gene *H19*, e é permitida a ligação de uma proteína denominada Fator de Ligação CCCTC (CTCF) à ICR1. A proteína CTCF age como um insulador, bloqueando o acesso dos *enhancers* à extremidade 3' do gene *IGF2*. No alelo materno, o gene *H19* é expresso e o gene *IGF2* é silenciado. A metilação no alelo paterno bloqueia a ligação da proteína CTCF à ICR1, inibindo a função do insulador e permitindo o acesso dos *enhancers* à extremidade 3' do gene *IGF2*, resultando em sua expressão e no silenciamento do *H19* (Figura 2) (BEATTY et al., 2006).

Em contraste, o outro domínio de *imprinting* (ICR2) da região 11p15.5 é um longo agrupamento gênico regulado pela KvDMR1, maternalmente metilada e situada no íntron 10 do gene *KCNQ1*. Essa ICR também compreende o promotor do gene *KCNQ1OT1* (ou *LIT1*) que se sobrepõe à sequência do gene *KCNQ1*, mas sendo transcrito no sentido *antisense* a esse outro gene (BEATTY et al., 2006). O gene *KCNQ1OT1* é transcrito em um ncRNA e a expressão desse gene silenciaria em *cis* os genes que estão localizados na região centrômerica no cromossomo paterno (MANCINI-DINARDI et al., 2006). No alelo materno, a ICR2 está metilada, consequentemente, o *KCNQ1OT1* não é transcrito e os genes próximos são expressos (Figura 2) (CHIESA et al., 2011).

Figura 2. Genes que sofrem *imprinting* genômico na região cromossômica 11p15.5. A metilação (CH3) da H19DMR silencia *H19* e ativa *IGF2*. A metilação da KvDMR1 silencia *KCNQ1OT* e ativa *CDKN1C* e *KvLQT1* (Modificado de WEKSBURG; SHUMAN; SMITH, 2005).

O gene *KCNQ1*, também conhecido como *KvLQT1*, codifica um canal de potássio e apenas o alelo materno se expressa (LEE et al., 1999). Alterações na expressão desse gene foram descritas em doenças cardíacas (NEYROUD et al., 1999) e seu envolvimento em alterações de crescimento ainda não é conhecido. Ao lado do *KCNQ1*, muitos outros genes do domínio apresentam silenciamento paterno, sendo um deles o *CDKN1C* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor*), também chamado de *P57kip2*. Este gene codifica um inibidor de quinase dependente de ciclina, regulador negativo da proliferação celular e do crescimento, que também pode atuar como supressor tumoral. Outro gene silenciado paternalmente nesse domínio é o *PHLDA2*, importante para o crescimento placentário (DELAVAL; WAGSCHAL; FEIL, 2006).

Alterações na região 11p15.5 resultam nas síndromes de Silver-Russel (SSR) e de Beckwith–Wiedemann (SBW). A SSR apresenta como características principais o retardo do crescimento intrauterino e pós-natal, aparente macrocefalia, face triangular e assimetria corporal (GASTON et al., 2001). A SBW é caracterizada por macrossomia, macroglossia, alterações da parede abdominal e predisposição a neoplasias (WEKSBURG; SHUMAN; BECKWITH, 2005). Já se sabe que mutações e epimutações envolvendo as ICRs 1 e 2 estão associadas às duas síndromes. (HORIKE et al., 2000; FROST; MOORE, 2010).

Mais de 50% dos portadores de SBW mostram perda da metilação da região KvDMR1, que está normalmente acompanhada pela expressão bialélica do transcrito *KCNQ1OT1*. Este transcrito regula muitos genes que se expressam maternalmente em

grupos, como por exemplo, o gene *CDKN1C* (WESBERG; SHUMAN; SMITH, 2005). Defeitos na expressão do gene *CDKN1C* podem acarretar proliferação anormal do trofoblasto, frequentemente associada com pré-eclâmpsia (MCCOWAN; BECROFT, 1994).

1.3. Inativação do Cromossomo X

Em animais nos quais a determinação sexual é baseada em mecanismos cromossômicos, os cromossomos sexuais se diferenciam entre si. Em mamíferos, o cromossomo Y é específico do sexo masculino, apresenta um tamanho pequeno e poucos genes. Em contraste com o cromossomo X, que contém uma maior quantidade de genes, apresenta-se em duas cópias nas fêmeas e uma nos machos, resultando na necessidade de compensação de dose da expressão dos genes presentes no cromossomo X em machos (XY) e fêmeas (XX). Os processos que os animais utilizam para a compensação de dose têm sido extensivamente estudados em três diferentes grupos de organismos: *Drosophila melanogaster*, nematóides *Caenorhabditis elegans* e mamíferos, incluindo marsupiais (PARK; KURODA, 2001; REIK; LEWIS, 2005).

Genes presentes no único cromossomo X em machos XY da *D. melanogaster* têm a expressão aumentada para alcançar níveis semelhantes às fêmeas XX (AKHTAR, 2003). Em nematóides (*C. elegans*), a expressão de ambos os cromossomos X é diminuída para 50% quando o genótipo é XX (MEYER, 2000). Em fêmeas de mamíferos, ocorre a inativação do cromossomo X, processo no qual apenas um dos cromossomos X é transcricionalmente ativo; o outro se torna inativo em consequência do silenciamento parcial de seus genes. (REIK; LEWIS, 2005).

A inativação do cromossomo X por *imprinting* é um mecanismo primário em marsupiais e euterianos, enquanto que a inativação aleatória do cromossomo X surgiu mais tarde em células somáticas de euterianos (REIK; LEWIS, 2005).

O processo de inativação do cromossomo X foi descrito por Mary Lyon (1961) em função de duas evidências: (1) o fenótipo normal em camundongos fêmeas X0; (2) o fenótipo em mosaico em fêmeas de camundongos, heterozigotas para genes ligados ao X, como aqueles relacionados à cor da pelagem. A partir da proposição de Lyon, células pigmentadas descendentes de células em que o alelo mutante para o gene de coloração foi inativado darão origem às regiões da pelagem de coloração normal; enquanto aquelas em que o cromossomo X portador do alelo normal foi inativado darão origem às regiões da pelagem de coloração mutante, resultando em um mosaico na cor da pelagem. Em gatos, a presença de duas colorações de pelagem diferentes (preto e laranja, sobre um fundo

branco) no mesmo indivíduo ocorre apenas em fêmeas, devido ao fato das colorações preta e laranja serem expressas a partir de dois alelos diferentes do mesmo gene ligado ao X.

O início da inativação do cromossomo X (ICX) envolve as etapas de contagem e escolha, seguidas pela etapa de estabelecimento do estado inativo. Na etapa de contagem, o número de cromossomos X na célula é contado com relação à ploidia celular, porque apenas um cromossomo X é funcional por célula diplóide adulta. Na etapa de escolha, a inativação é aleatória, mas pode ocorrer uma seleção preferencial do cromossomo X a ser inativado (AVNER; HEARD, 2001).

No estágio pré-implantacional do desenvolvimento de camundongos fêmeas (Figura 3), o cromossomo X paterno é sempre inativo, uma forma de *imprinting* do cromossomo X inativo (HUYNH; LEE, 2003). No desenvolvimento da massa celular interna, que dará origem ao embrião, o cromossomo X paterno se torna ativo, mas permanece inativo nos tecidos extraembrionários (MARK et al., 2004). A implantação embrionária é seguida por uma onda de inativação aleatória do cromossomo X, inativando tanto o cromossomo X de origem materna (X_m), como o de origem paterna (X_p) (AUGUI; NORA; HEARD; 2011).

A cascata de eventos para inativação do X em humanos apresenta diferenças no período inicial, sendo mais tardio do que em camundongos, nos elementos regulatórios e com relação à forma de inativação do cromossomo X, que em geral ocorre de maneira aleatória, mas pode acontecer de forma preferencial. O processo de ICX ocorre principalmente devido ao mecanismo de metilação diferencial do DNA (BERG et al., 2011; OKAMOTO et al.; 2011).

O cromossomo X apresenta uma região de aproximadamente três megabases denominada centro de inativação do cromossomo X (XIC), fundamental para o início da inativação aleatória. Em humanos, o XIC apresenta o gene *XIST* que é transcrito em um ncRNA, que apresenta o comprimento de 17Kb, cuja a expressão é aumentada no futuro X inativo (BROWN et al., 1991; WUTZ, 2011). Em camundongos, o cromossomo X ativo é caracterizado pela expressão de um gene denominado *Tsix*, que codifica um transcrito (também ncRNA) *anti-sense* ao *Xist*. No entanto, em humanos ainda não foi comprovada a ação de *TSIX* na regulação do *XIST* (LEE et al., 1999) (MIGEON et al., 2002).

Figura 3. Inativação do cromossomo X em camundongos. Retângulos vermelhos indicam o cromossomo X de origem materna (M), retângulos azuis indicam o cromossomo X de origem paterna (P) e retângulos brancos indicam cromossomos X em células germinativas primordiais, nas quais as marcas epigenéticas foram completamente apagadas. Os cromossomos X ativo e inativo são indicados por Xa e Xi, respectivamente. Os cromossomos X no zigoto são ambos potencialmente ativos (a). No estágio pré-implantacional é estabelecida a inativação do cromossomo X paterno (b), padrão mantido na placenta e em outros tecidos extraembrionários (c), mas apagado nos tecidos embrionários (d). A inativação aleatória do cromossomo X é estabelecida nas células embrionárias (e) e mantida na vida adulta, exceto na linhagem germinativa (f) onde os cromossomos X são reprogramados (g) (Modificado de REIK; LEWIS, 2005).

O RNA *Xist* acumula-se em *cis* no X inativo, resultando no recrutamento do Complexo Repressivo *Polycomb 2* (PCR2), que catalisa a trimetilação da lisina 27 na histona H3 (H3K27me3), uma marca associada com o remodelamento da cromatina para um estado condensado, transcricionalmente inativo. Eventos subsequentes envolvidos na manutenção da inativação incluem a incorporação de histonas variantes como MacroH2A e metilação de promotores de genes ligados ao X (LEE et al., 1999; CHANG et al., 2006).

Vários trabalhos demonstraram que a metilação do DNA no X inativo apresenta um importante papel na manutenção da inativação. O X ativo e o inativo apresentam níveis de metilação globais semelhantes (BERNARDINO et al., 1996). O genoma humano apresenta

1,2 milhões de ilhas CpGs, dentre essas, 5% localiza-se no cromossomo X, sendo que 50% dessas ilhas está associada com promotores, enquanto o restante está igualmente distribuído dentro de corpos gênicos e entre os genes ao longo do cromossomo X (KAROLCHIK et al., 2008). As ilhas CpGs apresentam a tendência de estarem metiladas no cromossomo X inativo e não metiladas no cromossomo X ativo (HELLMAN; CHESS, 2007). Ilhas CpGs que escaparam da inativação se apresentam não metiladas no X inativo e no X ativo (WEBER et al., 2007). A maioria das ilhas CpGs intergênicas apresentam aumento na metilação no X inativo em uma extensão menor do que a observada em regiões promotoras. O aumento na metilação no X ativo tende a ocorrer fora de regiões promotoras (SHARP et al., 2011).

A ilha CpG do gene do receptor de andrógenos (*AR*) mapeado no cromossomo X é metilada no X inativo e hipometilada no X ativo (ALLEN et al., 1992). Os alelos do gene *AR* nos cromossomos X paterno e materno podem ser distinguidos pela presença de uma repetição CAG altamente polimórfica no éxon 1 (> 1000 bp *downstream* do promotor do gene *AR* e do sítio de início da transcrição), utilizando-se, por exemplo, a amplificação da região com a reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica associada à digestão com enzima de restrição sensível à metilação, torna possível a distinção entre o alelo metilado e o não metilado (GOTO et al., 1997).

1.4 A Placenta Humana

A placenta é de grande importância para o desenvolvimento intrauterino e crescimento fetal, desde os estágios iniciais até o final da gravidez (ROSSANT; CROSS, 2001). Sua função está relacionada com o transporte de nutrientes e gases, o metabolismo, a proteção e a regulação hormonal. A placenta humana é um órgão viloso hemocorial, permitindo o fornecimento de nutrientes para o embrião em desenvolvimento (GUDE et al., 2004).

A placenta, assim como parte das membranas fetais, se origina do trofoblasto, estabelecido no primeiro evento de diferenciação celular, e realiza a conexão do embrião ao útero. Após a formação do trofoblasto, o blastocisto consiste da MCI circundada por uma camada de células trofoblásticas mononucleadas. A MCI dá origem ao embrião, ao cordão umbilical e ao mesênquima placentário. O trofoblasto redireciona o sistema endócrino materno para as mudanças hormonais necessárias à continuação da gestação, expressa proteínas e interage com o sistema imune materno para evitar a rejeição (CROSS; WERB; FISHER, 1994; APLIN, 2000). O blastocisto humano, aproximadamente quatro dias após a ovulação, entra no útero e eclode antes da implantação, perdendo a zona pelúcida, um

envoltório rígido de matriz extracelular que impede a interação das células do embrião com o útero (BURTON; JAUNIAUX; CHARNOCK-JONES, 2007).

A implantação consiste em uma interação entre as células trofoblásticas e o endométrio. Em mamíferos, há um curto período de tempo durante cada ciclo reprodutivo no qual o endométrio é receptivo para a implantação do blastocisto. Essa fase é denominada “janela de implantação” e é presumida entre os dias 20-24 do ciclo menstrual (PSYCHOROYS, 1994). Os hormônios progesterona e 17β -estradiol são secretados ciclicamente para regular fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão que alteram a superfície endometrial e abrem a “janela de implantação”. Outras substâncias, como a fibronectina, fecham a janela dias depois (BLACKBURN, 2003).

Figura 4. Esquema resumindo as três fases (aposição, adesão estável e invasão) da implantação do blastocisto no endométrio. TFD = trofoectoderma; MCI = massa celular interna; M = macrófagos; NK = células *natural killer* uterinas; vs = vasos sanguíneos [Modificado de Salomonsen (2009)].

Em humanos a implantação envolve três fases (Figura 4): (1) Aposição – ligação inicial do blastocisto ao endométrio, proporcionada pela molécula L-selectina; (2) Adesão – desenvolvimento de uma ligação estável através das células trofoblásticas adjacentes à MCI

presente no pólo embrionário do blastocisto; integrinas apresentam papel importante na adesão, migração e invasão do trofoectoderma através do endométrio; (3) Invasão – o blastocisto se insere entre as células epiteliais luminiais. O blastocisto humano se incorpora entre as células estromais do endométrio entre 6 e 7 dias após a fertilização (JAMES; CARTER; CHAMLEY, 2012).

Na implantação do blastocisto, ocorrem mudanças vasculares e celulares no endométrio que definem a reação decidual. A decidualização do estroma endometrial ocorre como parte do ciclo menstrual normal, sendo este termo aplicado quando células estromais uterinas se transformam em células deciduais, mudanças que se tornam mais extensivas durante a gravidez. As células acumulam glicogênio e lipídios no citoplasma causando seu aumento de tamanho. A principal função sugerida à reação decidual é restringir a invasão do trofoblasto e controlar sua migração; já as células trofoblásticas móveis e invasivas se tornam células placentárias gigantes (LOKE; KING, 1995).

A invasão trofoblástica fisicamente ancora o feto ao organismo materno e cria vasos que carregam o sangue das vilosidades flutuantes até a interface materno-fetal. Imediatamente após a ligação à superfície endometrial, os citotrofoblastos, células epiteliais especializadas que originam a placenta humana, seguem duas vias de diferenciação. Na primeira, os citotrofoblastos se separam da membrana basal, se fundem e formam o sinciciotrofoblasto multinucleado que cobre as vilosidades coriônicas, e apresentam como funções primárias a produção e o transporte de hormônios. Na segunda via, os citotrofoblastos, que são componentes das vilosidades de ancoragem, também se destacam da membrana basal, mas permanecem como células mononucleadas que se agregam para formar colunas e se aderem ao útero; subsequentemente invadem a decídua, o miométrio e as arteríolas que nutrem essa área (BASS et al., 1994; WINN et al., 2009).

Os citotrofoblastos que permanecem como células mononucleadas (CTBs) se diferenciam em duas populações identificadas na placenta como citotrofoblastos intersticial e endovascular. O trofoblasto intersticial compreende as células que invadem o interstício uterino (parede do útero), e possuem a característica de se fundirem em células gigantes multinucleadas (Figura 5A), enquanto o trofoblasto endovascular é composto por células que infiltram na parede e no lúmen arterial (Figura 5B) (KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003; PIJNENBORG, 1990). Com a invasão endovascular, o sangue materno flui para o espaço intervilloso. Em gravidez normal, os citotrofoblastos invadem mais profundamente as artérias do que as veias (ZHOU et al., 1998).

As CTBs endovasculares expressam marcadores de células endoteliais, incluindo fatores angiogênicos e seus receptores e substituem o revestimento endotelial das artérias por um pseudo-endotélio. Consequentemente, a resistência das artérias uterinas diminui e o

fluxo sanguíneo intervilloso aumenta suficientemente para permitir o crescimento fetal durante a segunda metade da gravidez (ZHOU et al., 1998; DAMSKY; FISHER, 1998).

Figura 5. Representação esquemática da invasão trofoblástica intersticial e endovascular na gravidez humana após 6 semanas (A) e após 20 semanas (B) de gestação. Os tecidos fetais estão representados em azul e os tecidos maternos estão representados em vermelho (Fonte: KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003).

A placenta humana madura (a termo) é um órgão circular discóide com um diâmetro de aproximadamente 22 cm, com espessura central média de 2,5 cm, e um peso médio de 470 g, características que variam entre placentas. A superfície fetal da placenta é representada pela placa coriônica, onde se dá a inserção do cordão umbilical. As artérias coriônicas derivam das duas artérias umbilicais, se ramificam num padrão centrífugo e fornecem nutrientes às árvores vilosas, enquanto as veias coriônicas originam a única veia umbilical (HUPPERTZ, 2008).

A superfície materna da placenta é representada pela placa basal, que emerge entre a placenta e a parede uterina durante o parto. A placa basal é composta pelo trofoblasto extraviloso e as células maternas da decidua uterina, sendo subdividida em 10-40 lobos, regiões elevadas delimitadas por fendas profundas, que mostram correspondência com a posição das árvores vilosas (HUPPERTZ, 2008). O espaço intervilloso se localiza entre a placa coriônica e a placa basal, contendo os cotilédones, principais unidades funcionais da placenta. A maioria das trocas materno-fetais ocorrem nas regiões terminais das vilosidades coriônicas (GUDE et al., 2004).

1.5 Epigenética e a Placenta

O *imprinting* em genes autossômicos e a inativação do cromossomo X são processos epigenéticos presentes em mamíferos placentários. A expressão de ncRNAs, as modificações de histonas e a metilação do DNA são marcas epigenéticas presentes nesses dois processos, o que sugere que esses sistemas co-evoluíram em resposta à pressão seletiva exercida pela placenta em genes relacionados ao crescimento e à aquisição de recursos maternos pelo feto (REIK; LEWIS, 2005).

A correlação entre o *imprinting* genômico e a placenta resultou em hipóteses para explicar a pressão evolutiva que resultou no aparecimento do *imprinting*. A hipótese do conflito parental proposta por Moore e Haig (1991) é a mais aceita, e postula que o genoma paterno maximiza a extração dos recursos maternos durante o desenvolvimento intrauterino em benefício de sua prole, enquanto o genoma materno limita o fornecimento de nutrientes para uma prole individual e distribui os recursos de maneira igualitária entre as proles em potencial (PIEDRAHITA, 2011).

A placenta apresenta alta expressão de genes que sofrem *imprinting*, os quais são importantes na determinação do fenótipo placentário, porque regulam o crescimento celular, afetam o transporte transplacentário e as respostas ao ambiente, controlando a aquisição dos nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento do feto. (FOWDEN et al., 2008; FROST; MOORE, 2010).

O *imprinting* genômico na placenta é um processo dinâmico, que apresenta um padrão variável durante a gravidez. A expressão bialélica por meio da perda de *imprinting* é comum em placentas humanas coletadas no primeiro em relação ao terceiro trimestre de gestação. No entanto, são ainda poucos os trabalhos que descrevem os perfis epigenéticos normais nas placentas, em especial em períodos precoces do desenvolvimento (GUO et al., 2008; SAZHENOVA; LEBEDEV, 2008; POZHARNY et al., 2010). Guo e colaboradores (2008) demonstraram que a metilação diferencial é mantida na H19DMR e na KvDMR1 em placentas normais e identificaram alteração de metilação na H19DMR, com a expressão bialélica do gene *H19* (pela perda de *imprinting*), em uma placenta pequena para a idade gestacional.

Kalousek (1994) apresenta um problema em relação a estudos com placentas humanas: a ocorrência de mosaicismos cromossômicos, que consiste tanto em presença de linhagens celulares diferentes da placenta em relação ao embrião, bem como dentro da própria placenta.

Há evidências de expressão de alguns genes em níveis diferentes em regiões distintas da placenta. Enquanto que dois trabalhos citam a preocupação com a ocorrência de mosaicismo na placenta em relação ao *imprinting* genômico. McMinin e colaboradores

(2006) e Diplas e colaboradores (2009) estudaram três regiões de quatro placentas, e quatro regiões de três placentas, respectivamente, não encontrando alterações significativas entre elas. No entanto, esses estudos focaram em genes e regiões diferentes das do presente estudo.

Estudos em tecidos placentários humanos mostraram um padrão variado de inativação do cromossomo X. Alguns trabalhos descreveram expressão preferencial do X materno, similar ao que ocorre no camundongo (ROPERS et al., 1978; HARRISON, 1989; GOTO, WRIGHT, MONK, 1997; UEHARA et al.; 2000). Entretanto, outros estudos relataram uma inativação aleatória do cromossomo X ou preferencial moderada (LOOIJENGA et al., 1999; ZENG, YANKOWITZ, 2003; MOREIRA DE MELLO et al., 2010; OLIVEIRA, 2010; PEÑAHERRERA et al., 2012).

A análise de um único gene pode criar um viés em direção a determinado resultado. Se isso é verdade, a análise de um padrão de inativação do X aleatória pode ser melhor representada pela análise de mais genes ao longo no cromossomo X (MOREIRA DE MELLO et al., 2010).

A placenta apresenta alto grau de heterogeneidade sítio-a-sítio, a análise de um único sítio da placenta não representa a placenta como um todo (YUEN; ROBINSON, 2011). O padrão de metilação das DMRs e o padrão de inativação do cromossomo X seriam melhor evidenciados na análise de fragmentos de todos os cotilédones placentários.

Há poucas informações na literatura sobre o perfil epigenético durante a gravidez, principalmente para estágios precoces do desenvolvimento devido às dificuldades técnicas de obtenção desse material. Por outro lado, há uma lacuna em relação ao conhecimento sobre a presença de mosaicismo em relação ao perfil epigenético placentário. Esse dado é muito importante, uma vez que há heterogeneidade em relação à coleta de amostras de placenta na literatura e da possibilidade de resultados não representativos, caso ocorra o mosaicismo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Geral:

Verificar a presença de mosaicismo do perfil epigenético das regiões controladoras de *imprinting* ICR1 e ICR2 de 11p15.5 entre tecidos extraembrionários de estágios precoces da gravidez (primeiro trimestre), e em vilosidade coriônica de placentas a termo (terceiro trimestre); e o padrão de inativação do cromossomo X em diferentes regiões de placentas de terceiro trimestre gestacional.

Específicos:

1. Verificar se existem diferenças no padrão de metilação das regiões diferencialmente metiladas KvDMR1 (ICR2) e da H19DMR (ICR1) entre diferentes tecidos (embrionários e extraembrionários) provenientes do primeiro trimestre gestacional;
2. Analisar se há presença de mosaismo em relação ao padrão de metilação da KvDMR1 (ICR2) e da H19DMR (ICR1) entre diferentes cotilédones de placentas provenientes do terceiro trimestre gestacional (a termo);
3. Comparar o padrão de metilação placentário da KvDMR1 e da H19DMR do primeiro trimestre gestacional com o padrão de metilação de placentas a termo;
4. Investigar se há presença de mosaicismo com relação ao padrão de inativação do cromossomo X em diferentes cotilédones de duas placentas de terceiro trimestre gestacional (a termo).

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos do Projeto

O presente trabalho é parte integrante do Projeto “Estudo da influência da região 11p15.5 na Pré-eclâmpsia” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (HCFMRP-USP) e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa CONEP (CAAE-0091.0.004.000-04) (Anexo A).

Os DNAs extraídos de amostras de placenta e tecido embrionário de primeiro trimestre de gestação foram enviados pelo Laboratório da Profa. Dra. Susana Chuva de Sousa Lopes, do Departamento de Anatomia e Embriologia do Centro Médico da Universidade de Leiden-Holanda (Processo: P08.087 “Onderzoek Humaan Foetaal Weefsel LUMC”, versie 2, 20 juni 2008).

3.2. Casuística

As pacientes brasileiras foram recrutadas no terceiro trimestre de gestação durante sua internação na Enfermaria ou no Centro Obstétrico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (HCFMRP-USP), mediante apresentação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de Pesquisa (TCLE) (Apêndice A). Informações sobre os antecedentes pessoais, obstétricos e dados sobre os membros das famílias das pacientes foram obtidas por meio de um questionário (Apêndice B), enquanto informações mais detalhadas sobre o quadro clínico gestacional da paciente foram obtidas junto aos prontuários médicos revisados após o parto com o auxílio do Dr. Conrado Milani Coutinho, médico obstetra membro da Equipe Médica do Centro Obstétrico do HCFMR-USP.

Foram selecionadas mulheres sadias, sendo considerados critérios de inclusão a gravidez de feto único e ausência de hipertensão e/ou proteinúria ($\geq 300\text{mg}$ em urina de 24 horas). Foram coletadas 14 placentas, sendo que quatro placentas foram utilizadas para o estudo de mosaicismos, das quais foram coletadas amostras dos diferentes cotilédones (Tabela 1) e 10 placentas, de gestações a termo e com fetos com peso adequado à idade gestacional, foram utilizadas como controle para comparação com placentas de primeiro trimestre (Tabela 2).

As pacientes holandesas foram recrutadas durante a realização de interrupção de gravidez no primeiro (todas abaixo de 12 semanas de gestação) ocasião que em doaram material para pesquisa. Devido ao sigilo médico, não foi disponibilizada nenhuma

informação sobre a gravidez, antecedentes pessoais, familiares ou obstétricos. Todos os embriões eram do sexo feminino, devido aos estudos do LUMC sobre inativação do cromossomo X.

As amostras do grupo controle do terceiro trimestre gestacional e amostras do grupo do primeiro trimestre gestacional foram coletadas de uma região padronizada (próximo da inserção do cordão umbilical).

Tabela 1. Dados gerais das pacientes brasileiras, doadoras de amostras de placenta de terceiro trimestre, com coleta de diferentes cotilédones.

Amostra	DNA	Ano	IG	Peso RN	Sexo RN	Cotilédones (n)
Plc 1	1641	1975	39s 3d	3500g	m	12
Plc 2	1646	1974	38s 5d	3675g	f	11
Plc 3	1653	1991	41s 3d	3770g	m	10
Plc 4	1654	1982	34s 3d	2160g	f	12

(Plc) Placenta. (DNA) Registro do laboratório. (Ano) Ano de nascimento da paciente. (IG) Idade gestacional em semanas e dias. (RN) recém nascido. (m) masculino. (f) feminino (n) número de cotilédones.

Tabela 2. Dados gerais das pacientes brasileiras, doadoras de amostras de placenta do grupo controle do terceiro trimestre gestacional.

Amostra	IG	Peso RN	Sexo RN
Plc 5	40s 4d	3450g	m
Plc 6	40s 3d	3360g	m
Plc 7	41s 3d	3720g	m
Plc 8	38s 4d	2980g	f
Plc 9	40s 4d	3865g	f
Plc 10	40s 4d	2870g	m
Plc 11	40s 4d	3180g	f
Plc 12	39s 6d	3190g	m
Plc 13	39s 6d	3400g	m
Plc 14	40s 4 d	3220g	f

(Plc) Placenta (IG) Idade gestacional em semanas e dias. (RN) recém nascido. (m) masculino. (f) feminino.

3.3. Tecido Placentário e Embrionário

Foram coletadas um total de 54 fragmentos de tecidos, sendo 10 de vilosidade coriônica, 10 de tecido embrionário, 10 de âmnion e 10 de membrana do cordão umbilical, todas amostras pareadas referentes a gestações do primeiro trimestre gestacional, e amostras de vilosidade coriônica de 14 placentas do terceiro trimestre gestacional.

As alíquotas de DNA previamente extraído e com concentração de 100ng/μL das amostras de primeiro trimestre gestacional foram enviadas pela equipe holandesa.

As amostras de placenta das pacientes brasileiras (terceiro trimestre) foram obtidas imediatamente após o parto. Em quatro amostras (Plc 1 a 4), foram realizados o mapeamento e a identificação dos cotilédones placentários, constituindo de 10 a 12 diferentes regiões da mesma placenta (Figura 6A). Em seguida foram excisados fragmentos de aproximadamente 2cm³ de cada região com auxílio de bisturi estéril, próximos à face fetal, embora o acesso tenha sido realizado através da face materna da placenta. Os fragmentos obtidos foram vigorosamente lavados com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e dissecados em lupa para assegurar a permanência apenas das vilosidades coriônicas (Figura 6C). Este material foi colocado em microtubos cônicos estéreis contendo PBS (tampão fosfato alcalino, do inglês *phosphate buffered saline*) 1X e armazenados a -80°C até o momento da extração de DNA.

3.3.1. Mapeamento dos cotilédones

O mapeamento e identificação dos cotilédones das placentas de terceiro trimestre foram realizados com o auxílio do Dr. Conrado Milani Coutinho. Os cotilédones foram classificados conforme sua disposição espacial nas placentas em quadrantes (Figura 6B), ou em periféricos e centrais (Figura 6C), considerando a localização do cordão umbilical como ponto central; e também segundo o seu tamanho, sendo considerados cotilédones pequenos aqueles que apresentaram diâmetro inferior à 20% em relação ao diâmetro da placenta.

Figura 6. (A) Aspecto geral da Plc 1, proveniente de gestação a termo, de feto do sexo masculino com 39 semanas e 3 dias, apresentando 12 cotilédones. (B) Divisão da placenta em quadrantes de acordo com a inserção do cordão umbilical. (C) Divisão dos cotilédones em periféricos (sem contato com a inserção do cordão umbilical) e centrais. (D) Vilosidade coriônica obtida após dissecação de um fragmento de cotilédone coletado (Aumento de 20x).

3.4. Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico de vilosidade coriônica foi realizada uma modificação no protocolo de extração e precipitação de DNA em NaCl (OLERUP; ZETTERQUIST, 1992) utilizado em nosso laboratório. As amostras de vilosidade coriônica foram lavadas por três vezes em NaCl 0,9% e centrifugadas a 14.000 RPM por 20 segundos e duas vezes em tampão de lise celular [Sacarose 0,32M; Tris HCl (pH 7,5) 12mM; MgCl₂ 5,0M; Triton X 1,0%] a 13.000 RPM por 20 segundos.

A seguir, as amostras foram incubadas a 55°C por 16 horas com 80µL de tampão de proteinase K (5X) [NaCl 0,375M; EDTA (pH8,0) 0,12M], 7,0µL de proteinase K (20ng/mL), 10µL de SDS 20% e 283,3µL de água destilada. A precipitação em etanol ocorreu em 1,0mL de etanol à 20°C, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos à 13.000 RPM a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* restante desidratado. O *pellet* foi ressuspensionado em 50µL de água deionizada.

3.5. Análise do Padrão de Metilação da KvDMR1 e da H19DMR

Para a análise molecular do padrão de metilação da KvDMR1 e da H19DMR em amostras de tecido embrionário e âmnion do primeiro trimestre gestacional, e em diferentes cotilédones das amostras das Plc 1 a 4 foi utilizada a metodologia de Digestão Enzimática Sensível à Metilação Associada à PCR em Tempo Real (DESM-RT) descrita previamente em Gomes et al. (2007).

A quantificação da metilação da KvDMR1 e da H19DMR em amostras de vilosidade coriônica e cordão umbilical de primeiro trimestre gestacional foi realizada inicialmente por Leite (2012), enquanto que as 10 amostras de terceiro trimestre do grupo controle (Plc 5-14) foram selecionadas a partir da análise inicial de Coelho (2010).

O método de digestão enzimática sensível à metilação associada à reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) em Tempo Real consiste de uma digestão do DNA, previamente à PCR, por meio da enzima de restrição sensível à metilação HpaII, a qual reconhece e cliva o sítio polimórfico CCGG, mas não atua quando a citosina interna encontra-se metilada (Cm5CCGG). Dessa forma, a clivagem ocorre somente no alelo não-metilado, impedindo sua amplificação por PCR. Nos pacientes em que a metilação da KvDMR1 for monoalélica, a enzima HpaII irá clivar uma das fitas (não-metilada) impedindo a amplificação desse fragmento e nos casos de metilação bialélica não vai clivar nenhuma das fitas de DNA, permanecendo então, os dois alelos.

A digestão com a enzima HpaI foi realizada utilizando-se 0,2 µg de DNA em condição e concentração de tampão segundo recomendação do fabricante (Invitrogen) [20mM de Tris-HCL (pH 7,4), 10 mM MgCl₂] a 37° C por 15 horas. A quantificação do DNA metilado foi obtida pelo sistema de detecção de sequência StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) , em um volume total de reação de 10µL contendo SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) e 3 pmol de cada *primer*. Para o estudo da KvDMR1 foram utilizados os *primers sense*: 5' GTGCCTCTCAGCGTGGTCC 3'; *antisense* 5'AACCACGATGACTGACGCAC 3' (GOMES et al., 2007) e para o estudo da H19DMR os *primers* UPH19II: 5'-CAATGAGGTGTCCCAGTTCCA-3' e H19 Real T-2: 5'-CTATGAGTGTCTATTCCCA-3' (COELHO, 2010).

A análise quantitativa da metilação foi obtida pela comparação da quantidade amplificada do DNA não digerido com HpaI e do DNA digerido com HpaI. Ambas as amostras foram amplificadas por PCR em Tempo Real e o ciclo no qual o nível de fluorescência emitido pelas amostras amplificadas atingiu o nível de fluorescência arbitrário Ct (*cycle threshold*) foi obtido para cada amostra pelo software StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems). Cada amostra foi analisada em triplicata, estipulando-se o desvio padrão máximo de 0,3, e o valor médio do Ct foi obtido para comparação entre a amostra metilada e a não metilada (GOMES et al., 2007).

Para obter os valores percentuais de metilação de DNA nestas regiões foi realizada a comparação entre o DNA não digerido com o DNA digerido com a enzima HpaI. Para esse cálculo, foi utilizado o valor de Ct de cada amostra amplificada. Assim, a porcentagem de DNA metilado foi obtida pela fórmula $(1/2)^{d-nd}$, sendo “d” corresponde à média do Ct do DNA digerido e “nd” à média do DNA não digerido.

3.6. Análise do Padrão de Inativação do Cromossomo X

Como o estudo de inativação do cromossomo X para as amostras de primeiro trimestre foram conduzidos por outros alunos na Holanda, esta análise foi aplicada apenas no estudo de mosaicismo, em placentas de terceiro trimestre.

A análise do padrão de inativação do cromossomo X foi realizada por meio do ensaio do receptor de androgênio humano (HUMARA assay, do inglês *human androgen receptor*) com o acréscimo de um novo marcador de inativação do cromossomo X. O gene *AR* está mapeado em Xq12 sendo sua posição física 66765076-66765319. Para o ensaio de HUMARA, foi utilizada uma região de repetição de trinucleotídeos (CAG), com *amplicon* variando aproximadamente de 262-286 pb. O novo marcador de inativação do cromossomo X (denominado neste trabalho de ICX1) é parte integrante de um gene localizado em

Xp11.3, sendo a sua posição física a 46695746-46696127. Foi utilizada uma região de repetição de tetranucleotídeos, para ser empregada em reação em duplex com o ensaio do HUMARA, sendo o tamanho do seu *amplicon* de 350-391 pb. Uma melhor especificação do ICX1 e a sequência de *primers* desse marcador não foram explicitadas neste trabalho porque os mesmos foram desenvolvidos pelo então aluno do laboratório, Filipe Brum Machado, em estudo colaborativo com a Universidade do Norte Fluminense, mas o dados ainda não foram publicados.

O ensaio de *HUMARA* é baseado na metilação do gene *AR*, que possui uma repetição CAG com 87% de heterozigose. A ilha CpG do gene *AR* está metilada no cromossomo X inativo e hipometilada no cromossomo X ativo. Essa região de repetição CAG possui dois sítios de restrição para a enzima sensível à metilação HpaII. Quando o cromossomo X está inativo, os sítios da HpaII estão metilados e resistem à digestão, podendo ser amplificados pela PCR. Quando o cromossomo X está ativo, os sítios da HpaII não estão metilados e são susceptíveis à digestão com HpaII. Em consequência, não haverá amplificação pela PCR. (ALLEN et al., 1992; ARAÚJO; RAMOS, 2008).

Os DNAs das amostras de placentas a termo provenientes de fetos do sexo feminino (Plc 2 e 4) foram submetidos à digestão com a enzima sensível à metilação HpaII, realizada utilizando-se 0,4 µg de DNA em condição e concentração de tampão [20mM de Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂] a 37° C por 3 horas, segundo recomendação do fabricante (*Invitrogen*). Foi incluído um controle constituído por material não digerido, expondo as amostras às mesmas condições (37° C por 3 horas) e concentração de tampão [20mM de Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂]. As amostras digeridas e não digeridas foram então submetidas à PCR com os *primers* para a sequência do gene *AR* (HUMARAF: 6FAMGTGCGCGAAATCCAAA e HUMARAR: 5'-CCAGGACCAGGTAGCCTGTG-3'), e *primers* para o marcador de inativação do cromossomo X 1 (ICX1), sendo um dos *primers* para o marcador ICX1 também marcado com fluoróforo, como para a sequência do gene *AR*.

A mistura de reação constituiu-se de KCl 50 mM; MgCl₂ 0,5 mM; Tris HCl (pH 8,4) 10 mM; dNTP (0,1 mM de cada nucleotídeo); *primers* 10 pmol (de cada); Taq DNA Polimerase 1U; produto da digestão ou material não digerido 0,3 µg, sendo as reações realizadas em equipamento termociclador programável T-100 (BioRad). Os fragmentos foram amplificados em 30 ciclos de 95°C por 60 segundos, 59°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, e extensão final a 60°C por 60 segundos.

Os produtos de PCR (0,7 µL) foram misturados com 0,2 µL de controle interno (500LIZ *Genescan*; *Applied Biosystems*) e 9,1 µL de formamida deionizada, e foram injetados no analisador ABI-3130 (*Applied Biosystem*) equipado com quatro capilares *array* de 50 cm usando POP7 como polímero. As amostras foram injetadas por 20 s a 1,5 kV e

rodadas em um tempo total de 1200s a 15 kV. Os dados foram analisados com o software *GeneMarker (SoftGenetics)*.

O cálculo da metilação de cada alelo foi realizado por meio da comparação das áreas dos picos apresentados nos gráficos obtidos na corrida de eletroforese capilar, utilizando um fator de correção (FC) a partir da área dos alelos na amostra do material não digerido. As taxas de inativação do cromossomo X foram relatadas a partir da porcentagem de metilação do alelo superior (maior em termos de pares de bases) (% Sup), e foi calculado por meio da fórmula descrita a seguir, onde A e A' representam o alelo superior das amostras digeridas e não digeridas respectivamente, e a e a' representam o alelo inferior (menor em termos de pares de bases), respectivamente.

$$\% \text{ Sup} = 1 - \left(\frac{(A/A + a) / (A'/A' + a')}{\frac{(A/A + a)}{(A'/A' + a')} + \frac{(a/A + a)}{(a'/A' + a')}} \right)$$

Uma % Sup de 50% indicava inativação aleatória dos alelos, uma % Sup de 100% indicava que o alelo superior sempre está expresso, e uma % Sup de 0% demonstrava o oposto. Na literatura, a inativação é considerada preferencial em diferentes limiares, por exemplo, quando a % Sup é maior que 70, 75 ou 80% (nos casos em que o alelo superior é predominante) e igual ou menor que 30, 25 ou 20% quando o alelo inferior é o predominante (BUSQUE et al., 2009; AMOS-LANDGRAF et al., 2006). No entanto, quando a % Sup é maior que 90% a inativação é sempre considerada extremamente preferencial, com provável repercussão clínica.

3.7. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*) empregando-se o teste de Turkey (Apêndice B) para análise de variação de metilação entre os cotilédones de placentas a termo; o teste *t* pareado (Apêndice C) para comparação entre as médias de metilação de tecidos pareados de primeiro trimestre gestacional; e o teste *t* não pareado (Apêndice D) para comparação entre amostras de vilosidade coriônica de primeiro e terceiro trimestre gestacional. Considerou-se $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Os dados quantitativos foram expressos como média $\pm$ 2 desvios padrões (DP). O Teste de Tukey também foi utilizado para comparação do padrão de inativação do cromossomo X entre os cotilédones de placentas a termo (Apêndice E).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise do Padrão de Metilação da KvDMR1 em amostras de primeiro e terceiro trimestre gestacionais.

O padrão de metilação da KvDMR1 em amostras de vilosidade coriônica, tecido embrionário, âmnion e cordão umbilical de primeiro trimestre gestacional e em amostras de vilosidade coriônica de terceiro trimestre gestacional foi avaliado pela técnica DESM-RT. Na figura 7 está representada a curva de amplificação da amostra do cotilédone 1 da Plc 1.

Figura 7. Curva de amplificação por PCR em tempo real da região KvDMR1 para a amostra Plc 1, cotilédone 1. (ΔRn) magnitude do sinal gerado por uma condição específica de PCR. (Ciclo) número de ciclos de amplificação. (t) *threshold*, nível de fluorescência arbitrário. (ND) amostra não digerida. (HpaII) amostra digerida com a enzima HpaII. (MspI) amostra digerida com a enzima MspI.

Os valores da quantificação da metilação da KvDMR1 obtidos para amostras de primeiro trimestre estão representados na tabela 3. O gráfico 1 mostra a variação da metilação de diferentes tecidos de cada paciente. Para as pacientes E2 e E10 efetuou-se o pareamento entre tecido embrionário, cordão umbilical, vilosidade coriônica e âmnion. Para as amostras E1, E3, E4, E7 e E12 foi possível realizar o pareamento entre embrião, vilosidade coriônica e cordão umbilical.

A análise estatística foi realizada pelo teste *t* pareado para comparar os grupos embrião e cordão umbilical ($p = 0,74$), embrião e vilosidade coriônica ($p = 0,91$) e embrião e

âmnion ($p = 0,69$), não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas na média de metilação da KvDMR1 entre os diferentes tecidos

Tabela 3 – Quantificação da metilação da KvDMR1, obtida pela técnica DESM-RT em amostras de tecido embrionário, cordão umbilical, vilosidade coriônica e âmnion referentes ao grupo do primeiro trimestre gestacional.

Amostra	Metilação A	Metilação CU	Metilação VC	Metilação B
E1	0,51	0,50	0,59	-
E2	0,12	0,80	0,52	0,23
E3	0,72	0,32	0,41	-
E4	0,39	0,48	0,55	-
E7	0,99	0,40	0,54	-
E10	0,26	-	0,58	0,30
E12	0,56	0,17	0,40	-
E13	0,48	0,70	0,34	0,14
E15	-	1,21	0,20	0,18
E23	-	0,58	0,59	0,23

(A) tecido embrionário; (CU) cordão umbilical; (VC) vilosidade coriônica; (B) âmnion.

Gráfico 1. Representação gráfica dos perfis de metilação da KvDMR1 dos tecidos pareados de primeiro trimestre (embrião, cordão umbilical, vilosidade coriônica e âmnion) para as amostras E1, E2, E3, E4, E7, E10, E12, E13, E15 e E23.

Os valores de quantificação de metilação da KvDMR1 obtidos para amostras de terceiro trimestre gestacional, Plc 1 a 4, em diferentes cotilédones estão dispostos na tabela 4. O gráfico 2 apresenta a comparação dos perfis de metilação entre cotilédones centrais e periféricos e o gráfico 3 representa a variação intraplacentária da metilação da KvDMR1.

Tabela 4 – Quantificação da metilação da KvDMR1, obtida pelo método DESM-RT em amostras de vilosidade coriônica do terceiro trimestre gestacional em diferentes cotilédones.

Amostra	Cotilédone	Quadrante	Posição	Tamanho	Metilação
Plc 1	C1	1	Periférico	Grande	0,28
	C2	1	Central	Pequeno	0,34
	C3	2	Central	Grande	0,38
	C4	2	Periférico	Pequeno	0,40
	C5	2	Periférico	Grande	0,47
	C6	3	Periférico	Grande	0,42
	C7	3	Periférico	Pequeno	0,46
	C8	3	Central	Pequeno	0,40
	C9	4	Periférico	Grande	0,40
	C10	4	Periférico	Pequeno	0,42
	C11	4	Central	Pequeno	0,18
Plc 2	C12	1	Periférico	Pequeno	0,36
	C1	1	Periférico	Pequeno	0,33
	C2	1	Periférico	Pequeno	0,44
	C3	2	Periférico	Grande	0,38
	C4	2	Periférico	Pequeno	0,36
	C5	1	Central	Pequeno	0,40
	C6	2	Central	Grande	0,37
	C7	3	Central	Pequeno	0,33
	C8	3	Periférico	Pequeno	0,38
	C9	4	Periférico	Pequeno	0,34
	C10	4	Central	Grande	0,40
	C11	4	Periférico	Grande	0,39

Tabela 4 - continuação

Plc 3	C1	1	Periférico	Pequeno	0,28
	C2	2	Periférico	Pequeno	0,22
	C3	3	Central	Grande	0,40
	C4	4	Periférico	Grande	0,38
	C5	2	Periférico	Pequeno	0,40
	C6	2	Central	Grande	0,40
	C7	3	Periférico	Grande	0,24
	C8	3	Periférico	Pequeno	0,33
	C9	4	Central	Grande	0,42
	C10	4	Periférico	Grande	0,32
Plc 4	C1	1	Periférico	Grande	0,40
	C2	2	Periférico	Pequeno	0,37
	C3	2	Periférico	Grande	0,32
	C4	2	Periférico	Pequeno	0,39
	C5	3	Central	Grande	0,38
	C6	3	Periférico	Grande	0,25
	C7	3	Central	Grande	0,26
	C8	3	Periférico	Grande	0,32
	C9	4	Periférico	Grande	0,40
	C10	1	Periférico	Pequeno	0,29
	C11	1	Central	Pequeno	0,33
	C12	4	Periférico	Pequeno	0,44

Gráfico 2. Representação esquemática da variação do perfil de metilação da KvDMR1 entre cotilédones periféricos e centrais em placentas de terceiro trimestre gestacional (Plc 1, Plc 2, Plc 3 e Plc 4).

Os cotilédones foram classificados de acordo com a posição do cordão umbilical em quadrantes, ou em periféricos e centrais; e de acordo com o tamanho em grandes ou pequenos. Para análise estatística foi utilizado o teste de Tukey. No modelo dos quadrantes foi obtido $p=0,14$; no modelo de posição foi obtido $p=0,66$; e no modelo do tamanho o valor de p obtido foi de $0,28$. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa de metilação na KvDMR1 entre os grupos estabelecidos nos modelos.

Gráfico 3. Representação gráfica da variação da metilação intraplacentária da KvDMR1 das amostras Plc 1, Plc 2, Plc 3 e Plc 4. As caixas representam o intervalo interquartil (IQ) para todos os cotilédones dentro de cada placenta. As linhas verticais representam os últimos dados dentro de $\pm 1,5$ vezes o IQ e as barras horizontais indicam as medianas.

A tabela 5 apresenta os valores de metilação da KvDMR1 de amostras controle de terceiro trimestre gestacional obtidos pela técnica DESM-RT, utilizados para comparação com amostras de primeiro trimestre gestacional.

As amostras de vilosidade coriônica do terceiro trimestre gestacional apresentaram uma média dos níveis de metilação de $0,42 \pm 0,024$, enquanto que a média dos níveis de metilação do primeiro trimestre gestacional foi de $0,50 \pm 0,026$. A análise estatística utilizada para comparar os dois grupos foi o teste t não pareado, que apresentou $p=0,0489$, demonstrando diferença estatisticamente significativa de metilação da KvDMR1 entre as amostras de vilosidade coriônica de primeiro e terceiro trimestres gestacionais.

Tabela 5. Quantificação da metilação da KvDMR1, obtida pelo método DESM-RT, em amostras controle de vilosidade coriônica do terceiro trimestre gestacional.

Amostra	Metilação
Plc 5	0,39
Plc 6	0,47
Plc 7	0,34
Plc 8	0,45
Plc 9	0,45
Plc 10	0,48
Plc 11	0,44
Plc 12	0,38
Plc 13	0,52
Plc 14	0,34

4.2. Análise do Padrão de Metilação da H19DMR em amostras de primeiro e terceiro trimestres gestacionais.

Por meio da técnica DESM-RT foi realizada a quantificação da metilação da H19DMR em vilosidade coriônica, cordão umbilical, âmnion e tecido embrionário de primeiro trimestre gestacional e em amostra de vilosidade coriônica de terceiro trimestre gestacional, a figura 8 apresenta o gráfico de amplificação da H19DMR para a amostra Plc 4, cotilédone 4.

Figura 8. Curva de amplificação da PCR em tempo real da região H19DMR para a amostra Plc 4, cotilédone 4. (ΔRn) magnitude do sinal gerado por uma condição específica de PCR. (Ciclo) número de ciclos de amplificação. (t) *threshold*, nível de fluorescência arbitrário. (ND) amostra não digerida. (Hpall) amostra digerida com a enzima Hpall. (MspI) amostra digerida com a enzima MspI.

Os valores da quantificação da metilação da H19DMR obtidos para amostras de primeiro trimestre estão apresentados na tabela 6. O gráfico 4 mostra a variação da metilação em diferentes tecidos de amostras de primeiro trimestre gestacional. Para a amostra E13 efetuou-se o pareamento entre tecido embrionário, cordão umbilical e vilosidade coriônica. Para as amostras E1, E3, E4 e E7 foi possível realizar o pareamento entre embrião, vilosidade coriônica e cordão umbilical.

A análise estatística foi realizada pelo teste t pareado para comparar os grupos embrião e cordão umbilical ($p= 0,37$), embrião e vilosidade coriônica ($p= 0,63$), e não demonstrou diferenças significativas na média de metilação da H19DMR entre os tecidos analisados.

Tabela 6 – Quantificação da metilação da H19DMR, obtida pela técnica DESM-RT em amostras de tecido embrionário, cordão umbilical, vilosidade coriônica e âmnion referentes ao primeiro trimestre gestacional.

Amostra	Metilação A	Metilação CU	Metilação VC	Metilação A
E1	0,49	0,43	0,37	-
E2	-	0,38	0,33	0,13
E3	0,14	0,13	0,31	-
E4	0,27	0,5	0,35	-
E7	0,68	0,18	0,4	-
E10	0,39	-	1,01	-
E12	-	0,11	0,46	0,53
E13	0,41	0,12	0,33	0,19
E15	-	0,5	0,09	0,04
E23	-	0,52	0,72	0,31

(A) tecido embrionário; (CU) cordão umbilical; (VC) vilosidade coriônica; (B) âmnion.

Gráfico 4. Representação gráfica dos perfis de metilação da H19DMR dos tecidos pareados de primeiro trimestre (embrião, cordão umbilical, vilosidade coriônica e âmnion) para as amostras E1, E2, E3, E4, E7, E10, E12, E13, E15 e E23.

Os valores de quantificação de metilação da H19DMR obtidos para amostras de terceiro trimestre gestacional, Plc 1, Plc 2, Plc 3 e Plc 4, em diferentes cotilédones estão representados na tabela 7. O gráfico 5 apresenta a variação da metilação entre cotilédones periféricos e centrais. O gráfico 6 representa a variação da metilação intraplacentária.

Tabela 7 – Quantificação da metilação da H19DMR, obtida pelo método DESM-RT em amostras de vilosidade coriônica do terceiro trimestre gestacional em diferentes cotilédones placentários.

Amostra	Cotilédone	Quadrante	Posição	Tamanho	Metilação
Plc 1	C1	1	Periférico	Grande	0,39
	C2	1	Central	Pequeno	0,41
	C3	2	Central	Grande	0,46
	C4	2	Periférico	Pequeno	0,33
	C5	2	Periférico	Grande	0,43
	C6	3	Periférico	Grande	0,26
	C7	3	Periférico	Pequeno	0,36
	C8	3	Central	Pequeno	0,45
	C9	4	Periférico	Grande	0,35
	C10	4	Periférico	Pequeno	0,42
	C11	4	Central	Pequeno	0,40
	C12	1	Periférico	Pequeno	0,43
Plc 2	C1	1	Periférico	Pequeno	0,52
	C2	1	Periférico	Pequeno	0,49
	C3	2	Periférico	Grande	0,61
	C4	2	Periférico	Pequeno	0,47
	C5	1	Central	Pequeno	0,37
	C6	2	Central	Grande	0,40
	C7	3	Central	Pequeno	0,25
	C8	3	Periférico	Pequeno	0,46
	C9	4	Periférico	Pequeno	0,36
	C10	4	Central	Grande	0,34
	C11	4	Periférico	Grande	0,26
Plc 3	C1	1	Periférico	Pequeno	0,37
	C2	2	Periférico	Pequeno	0,31
	C3	3	Central	Grande	0,34
	C4	4	Periférico	Grande	0,60
	C5	2	Periférico	Pequeno	0,31
	C6	2	Central	Grande	0,54
	C7	3	Periférico	Grande	0,04
	C8	3	Periférico	Pequeno	0,33
	C9	4	Central	Grande	0,52
	C10	4	Periférico	Grande	0,32

Tabela 7 - continuação

Plc 4	C1	1	Periférico	Grande	0,38
	C2	2	Periférico	Pequeno	0,44
	C3	2	Periférico	Grande	0,48
	C4	2	Periférico	Pequeno	0,13
	C5	3	Central	Grande	0,22
	C6	3	Periférico	Grande	0,16
	C7	3	Central	Grande	0,15
	C8	3	Periférico	Grande	0,18
	C9	4	Periférico	Grande	0,38
	C10	1	Periférico	Pequeno	0,26
	C11	1	Central	Pequeno	0,34
	C12	4	Periférico	Pequeno	0,50

Gráfico 5. Representação gráfica da variação do perfil de metilação da H19DMR entre cotilédones periféricos e centrais em placentas de terceiro trimestre gestacional (Plc 1, Plc 2, Plc 3 e Plc 4).

Os cotilédones foram classificados de acordo com a posição do cordão umbilical em quadrantes, ou em periféricos e centrais; e de acordo com o tamanho em grandes ou pequenos. Para análise estatística foi utilizado o teste de Tukey, sendo obtido no modelo dos quadrantes valor de $p = 0,0129$, demonstrando a diferença de metilação significativa entre o quadrante 3, que apresentou média de metilação igual a $0,27 \pm 0,031$, e os demais quadrantes (o quadrante 1 apresentou média de metilação de $0,39 \pm 0,034$, o quadrante 2 apresentou média de metilação de $0,40 \pm 0,031$ e o quadrante 4 apresentou média de

metilação de $0,39 \pm 0,032$). Essa diferença foi obtida devido a uma amostra (Plc 4), a qual mostrou valores muito baixos de metilação no quadrante 3.

No modelo de posição foi obtido o valor de $p= 0,94$, não havendo diferença de metilação entre cotilédones periféricos e centrais. No modelo do tamanho o valor de p obtido foi de $0,063$, indicando uma tendência para diferença de metilação entre cotilédones grandes (média de metilação $0,41 \pm 0,023$) e pequenos (média de metilação $0,35 \pm 0,021$).

Gráfico 6. Representação gráfica da variação da metilação intraplacentária da H19DMR das amostras Plc 1, Plc 2, Plc 3 e Plc 4. As caixas representam o intervalo interquartil (IQ) para todos os cotilédones dentro de cada placenta. As linhas verticais representam os últimos dados dentro de $\pm 1,5$ vezes o IQ e as barras horizontais indicam as medianas.

A tabela 8 apresenta os valores de metilação da H19DMR de amostras controle de terceiro trimestre gestacional obtidos pela técnica DESM-RT. Foi utilizado o teste t não pareado para comparar as amostras de vilosidade coriônica de primeiro e terceiro trimestre, que apresentou $p= 0,68$; demonstrando que não houve diferença significativa de metilação da H19DMR entre os grupos estudados.

Tabela 8. Quantificação da metilação da H19DMR, obtida pelo método DESM-RT, em amostras controle de vilosidade coriônica do terceiro trimestre gestacional.

Amostra	Metilação
Plc 5	0,26
Plc 6	0,26
Plc 7	0,42
Plc 8	0,44
Plc 9	0,32
Plc 10	0,40
Plc 11	0,29
Plc 12	0,49
Plc 13	0,23
Plc 14	0,38

4.3. Análise do Padrão de Inativação do Cromossomo X em amostras de terceiro trimestre gestacional.

O padrão de inativação do cromossomo X nas amostras Plc 2 e Plc 4 foi verificado por meio do ensaio de HUMARA e de um novo marcador de inativação do cromossomo X (ICX1), ainda não descrito na literatura. As figuras 9 e 10 representam o perfil de eletroferograma, visualizado por meio da ferramenta *GeneMarker (SoftGenetics)* para a amostra Plc 2, cotilédone 1 dos marcadores *AR* e ICX1, respectivamente. A tabela 9 representa a porcentagem de metilação de cada alelo dos marcadores de inativação do cromossomo X para as amostras Plc 2 e Plc 4, em diferentes cotilédones.

Figura 9 – Ensaio de HUMARA. Eletroferograma para o fragmento do gene *AR* da amostra Plc 2, cotilédone 1. (Eixo x) altura dos picos; (eixo y) tamanho dos fragmentos. (A) amostra não digerida. (B) amostra digerida com enzima *HpaII*.

Figura 10 – Eletroferograma para o novo marcador ICX1 da Plc2, cotilédone 1. (Eixo x) altura dos picos; (eixo y) tamanho dos fragmentos. (A) amostra não digerida. (B) amostra digerida com enzima *HpaII*.

Tabela 9 – Porcentagem de metilação dos alelos do marcador ICX1 e do gene *AR* em vilosidade coriônica de terceiro trimestre gestacional.

Amostra	Cotilédone	Quadrante	Posição	Tamanho	% Sup. ICX1	% Inf. ICX1	% Sup. AR	% Inf. AR
Plc 2	C1	1	Periférico	Pequeno	10,93	87,07	30,76	69,13
	C2	1	Periférico	Pequeno	20,25	79,75	31,75	68,25
	C3	2	Periférico	Grande	20,17	79,83	29,32	70,68
	C4	2	Periférico	Pequeno	18,09	81,91	14,29	85,71
	C5	1	Central	Pequeno	42,57	57,43	51,24	48,76
	C6	2	Central	Grande	10,37	89,63	8,18	91,82
	C7	3	Central	Pequeno	19,20	80,80	32,90	67,10
	C8	3	Periférico	Pequeno	35,06	64,94	14,40	85,60
	C9	4	Periférico	Pequeno	33,25	66,75	14,67	85,33
	C10	4	Central	Grande	24,97	75,03	16,67	83,33
	C11	4	Periférico	Grande	37,68	62,32	70,29	29,71
Plc 4	C1	1	Periférico	Grande	36,18	63,82	38,64	61,36
	C2	2	Periférico	Pequeno	31,22	68,78	43,52	56,48
	C3	2	Periférico	Grande	61,69	38,31	91,85	08,15
	C4	2	Periférico	Pequeno	59,57	40,43	70,43	29,57
	C5	3	Central	Grande	46,87	53,13	43,30	56,70
	C6	3	Periférico	Grande	41,72	58,28	87,66	12,34
	C7	3	Central	Grande	19,38	80,62	56,90	43,10
	C8	3	Periférico	Grande	61,42	38,58	83,37	16,63
	C9	4	Periférico	Grande	57,15	42,86	99,22	0,78
	C10	1	Periférico	Pequeno	59,59	40,41	86,08	13,92
	C11	1	Central	Pequeno	55,97	44,03	77,95	22,05
	C12	4	Periférico	Pequeno	42,19	57,81	51,25	48,75

(% Sup) porcentagem de metilação do alelo superior (maior); (% Inf) porcentagem de metilação do alelo inferior (menor); em negrito estão destacados os alelos que indicaram inativação não aleatória do cromossomo X.

Os cotilédones foram classificados de acordo com a posição do cordão umbilical em quadrantes, ou em periféricos e centrais; e de acordo com o tamanho em grandes ou pequenos. Para análise estatística foi utilizado o teste de Tukey. Para alelo superior do gene *AR*, no modelo de posição foi obtido $p=0,44$; e no modelo do tamanho o valor de p obtido foi de 0,83. Para o alelo superior do marcador ICX1, no modelo da posição $p=0,41$; e no modelo do tamanho o p obtido foi de 0,71. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa de metilação do alelo superior do *AR* e do alelo superior do marcador ICX1 entre os grupos estabelecidos nos modelos.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Padrão de metilação da KvDMR1 e da H19DMR em tecidos embrionários e extraembrionários.

A placenta apresenta expressão de notável quantidade de genes que sofrem *imprinting* em relação a outros órgãos dos mamíferos. Esses genes são frequentemente regulados pela metilação do DNA. Em humanos, síndromes relacionadas ao *imprinting* genômico estão frequentemente associadas com o crescimento pré-natal anormal, como as SSR e SBW, o que demonstra a importância do *imprinting* na regulação do crescimento embrionário/fetal e na transferência de nutrientes da mãe para o feto (FROST; MOORE, 2010).

A SBW está envolvida com alterações em genes que sofrem *imprinting* na região 11p15.5. Alterações na metilação da H19DMR estão presentes em 2-7% dos casos de SBW; enquanto que a perda da metilação da KvDMR1 está presente em 50% dos casos (WEKSBERG; SHUMAN; SMITH, 2005).

Evidências mostraram um padrão de metilação anormal da KvDMR1 em indivíduos clinicamente normais que foram concebidos por reprodução assistida (GOMES et al., 2009). Gomes et al. (2007) demonstraram diferenças no padrão de metilação da KvDMR1 entre células de origem embrionária e extraembrionária, concluindo que em testes genéticos pré-natais, a vilosidade coriônica pode apresentar padrão de metilação diferente do feto.

No presente estudo, foi realizada a quantificação da metilação da KvDMR1 em amostras de diferentes tecidos (tecido embrionário, cordão umbilical, vilosidade coriônica e âmnion) do primeiro trimestre gestacional por meio da técnica DESM-RT, tendo sido obtida uma média de metilação de $50 \pm 2,6$ % para amostras de vilosidade coriônica. As médias de metilação dos tecidos pareados foram comparadas dentro dos grupos embrião e cordão umbilical ($p = 0,74$), embrião e vilosidade coriônica ($p = 0,91$) e embrião e âmnion ($p = 0,69$), e não foram demonstradas diferenças estatisticamente significativas nas médias de metilação entre os diferentes tecidos.

O metiloma do DNA placentário do primeiro trimestre gestacional é altamente organizado e globalmente associado com a transcrição. Foram descritas DMRs tecido-específicas através da comparação da metilação global de amostras de vilosidade coriônica do primeiro trimestre gestacional ($n=12$, idade gestacional entre 11 e 13 semanas, cariótipo normal) com amostras de sangue materno pareadas. As DMRs tecido específicas tendem a se agrupar em diferentes localizações cromossômicas e apresentam funções biológicas tecido-específicas (CHU et al., 2011).

Os dados do trabalho de Peñaherrera et al. (2012) demonstram que âmnion e c6rion possuem origem comum no desenvolvimento, a partir da massa celular interna, enquanto que o trofoblasto 6 derivado da trofoectoderma. Nesse estudo foi realizada a compara76o da m6dia de inativa76o do cromossomo X em diferentes tecidos extraembrion6rios a termo (âmnion, c6rion, trofoblasto e mes6quima), com o objetivo de verificar se tecidos derivados do mesmo *pool* de c6lulas exibem o mesmo padr6o de inativa76o do X, como ser6 visto no item de discuss6o sobre inativa76o do cromossomo X. Houve uma modesta correla76o no padr6o de inativa76o do X entre âmnion e c6rion, e entre trofoblasto e mes6nquima, mas n6o houve correla76o entre os outros tecidos.

Avila et al. (2010) compararam o n6vel de metila76o do DNA entre âmnion, c6rion, trofoblasto e mes6nquima em 14 amostras placent6rias independentes pertencentes ao terceiro trimestre gestacional, e o n6vel de metila76o dos genes *CASP8*, *PTPN6*, *APC*, *KISS1* e *LINE1* foi diferente entre os tecidos extraembrion6rios.

A compara76o entre tecidos pareados, realizada no presente estudo, demonstrou que a quantifica76o da metila76o da KvDMR1 n6o 6 correspondente entre tecidos diferentes provenientes da mesma gesta76o (gr6fico 1). Relatos de caso na literatura descreveram a discrep6ncia entre tecidos embrion6rios e extraembrion6rios em an6lises citogen6ticas (CHEN et al., 2004). Discrep6ncias fetoplacent6rias e fetoamni6ticas foram constatadas em um relato de caso de mosaicismo de tetrassomia 12p por meio de an6lises realizadas por PCR quantitativa fluorescente e an6lise de polimorfismo com marcadores para o cromossomo 12p e 12q (CHEN et al., 2010).

Em gesta76es vi6vies, anormalidades cromoss6micas s6o mais comumente identificadas no contexto de mosaicismo (YUEN; ROBINSON, 2011). O mosaicismo cromoss6mico 6 definido como a presen76a de uma ou mais linhagens celulares diferentes em um mesmo indiv6duo (GOSDEN; KALOUSEK; HARRISON, 1995). Quando o mosaicismo cromoss6mico espec6fico afeta apenas a placenta 6 caracterizado o fen6meno denominado Mosaicismo Confinado 6 Placenta (CPM, do ingl6s *confined placental mosaicism*) (KALOUSEK; DILL, 1983). A distribu76o de c6lulas anormais pode variar entre os s6tios dentro de uma mesma placenta (HENDERSON et al., 1996). Estudos com vilosidades cori6nicas de idade gestacional entre 10-12 semanas demonstraram que o CPM est6 presente em 1-2% das gesta76es vi6veis (TESHIMA et al., 1992). Evid6ncias mostraram que o CPM est6 relacionado 6 restri76o do crescimento intrauterino e 6 morte fetal intra6tero (LESTOU; KALOUSEK, 1998).

O CPM 6 classificado em tr6s tipos de acordo com a linhagem celular que exibe o cari6tipo anormal. O tipo I 6 quando o mosaicismo placent6rio 6 confinado ao citotrofoblasto, o tipo II 6 quando o CPM 6 confinado ao estroma cori6nico e o tipo III ocorre em ambas as linhagens celulares. O CPM 6 caracterizado como mit6tico quando o feto 6 dipl6ide e 6

considerado meiótico quando o zigoto é cromossomicamente anormal, ou em situações em que o CPM está relacionado a um feto diplóide não mosaico com trissomia confinada às duas linhagens celulares placentárias (CPM tipo III), o último está associado a um conceito originalmente trissômico (KALOUSEK; VEKEMANS, 1996).

A placenta apresenta alto grau de variabilidade intraplacentária e heterogeneidade intra-sítios. Experimentos com placentas que apresentavam mosaicismo de trissomias cromossômicas demonstraram que uma única amostragem não representa a placenta como um todo, mas são necessárias várias biópsias para detectar o nível de trissomia. A mesma abordagem deve ser utilizada em avaliações de variação epigenética, o estudo de vários sítios dentro de uma mesma placenta fornece a capacidade de distinção entre mudanças normais e anormais (HENDERSON et al., 1996; YUEN; ROBINSON, 2011). No presente estudo foi realizada a coleta de fragmentos de todos os cotilédones (variando de 10-12 cotilédones) em quatro placentas a termo para verificar a presença de variabilidade com relação à metilação da KvDMR1, com o uso da técnica DESM-RT.

Os cotilédones foram classificados em três modelos. A referência para o primeiro modelo (modelo dos quadrantes) foi a posição do cordão umbilical, no entanto os quadrantes não são correspondentes entre as placentas. A posição do cordão umbilical também foi referência para o segundo modelo (modelo da posição). Neste modelo os cotilédones foram classificados em periféricos e centrais, sendo que os centrais são aqueles que se localizam próximos à inserção do cordão umbilical, em contato direto com o mesmo. O terceiro modelo é o modelo do tamanho, em que os cotilédones foram classificados em grandes ou pequenos, sendo considerados cotilédones pequenos aqueles que apresentavam diâmetro menor do que 20% em relação ao diâmetro do disco placentário.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na quantidade de metilação na KvDMR1 entre os grupos estabelecidos nos modelos. No modelo dos quadrantes foi obtido $p = 0,14$; no modelo de posição foi obtido $p = 0,66$ e no modelo do tamanho o valor de p obtido foi de $0,28$. Demonstrando que não há variabilidade da metilação dessas regiões na amostra estudada.

Avila et al. (2010) não encontraram variabilidade de metilação significativa nos níveis de metilação de elementos LINE1 e em CpGs dentro de regiões promotoras dos genes *KISS1*, *PTPN6*, *CASP8*, por meio da quantificação da metilação por pirosequenciamento de três sítios e quatro profundidades diferentes em placentas a termo ($n=4$). Apenas o *APC* apresentou variabilidade de metilação entre sítios diferentes. A metilação desses mesmos genes foi avaliada por Peñaherrera et al. (2012) que demonstraram significativa correlação do nível de metilação de *APC* e LINE1 intra-sítios placentários.

A avaliação da expressão de genes (*CDH1*, *CDH11*, *ID2*, *PLCA2* e *KISS1*) relacionados à diferenciação do trofoblasto, migração e com expressão em diferentes tipos

de células do trofoblasto foi realizada em três sítios e quatro profundidades de cinco placentas a termo, e demonstrou que a expressão gênica apresenta alto grau de variabilidade intra-placentária. A expressão do gene *KISS1* foi significativamente diferente entre sítios periféricos e centrais (AVILA et al., 2010).

A expressão dos genes que expressam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), o fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF, do inglês *connective tissue growth factor*), as proteínas do citoesqueleto laminina A3 e α -tubulina e a proteína sinalizadora Rad, que estão relacionados à hipóxia em amostras de vilosidade placentária depende do sítio amostrado no disco placentário. Esses genes apresentam baixa expressão na região central e na placa basal, e expressão aumentada na região periférica e na placa coriônica (WYATT et al., 2005). A análise de expressão por *microarray* em um conjunto de 303 genes, em 72 sítios dentro de 19 placentas demonstrou que a expressão gênica varia com a profundidade placentária (SOOD et al., 2006).

Os processos epigenéticos proporcionam à placenta uma plasticidade única na expressão gênica, a qual é necessária para a habilidade placentária de moderar as consequências de adversidades genéticas e condições ambientais. Estudos com a variabilidade intraplacentária de anormalidades cromossômicas demonstraram que a placenta é desigual em termos de origem celular. Células clonais derivadas de uma célula progenitora comum no blastocisto tendem a se localizar próximas umas das outras (YUEN; ROBINSON, 2011).

A média de metilação da KvDMR1 para placentas normais a termo (controles) no presente trabalho foi de $42 \pm 2,4\%$, demonstrando um perfil de metilação diferencial para essa região. Guo et al. (2008) realizaram a análise do perfil de metilação da KvDMR1 em 20 amostras de placentas a termo normais, por meio da técnica de *Southern blot* associada à digestão com enzima sensível à metilação, obtendo para a região uma média de metilação de $48 \pm 7\%$. Woodfine, Huddleston e Murrel (2006) quantificaram a metilação da KvDMR1 por pirosequenciamento e encontraram uma média de metilação de 42,25%, enquanto que Bourque et al. (2010) também analisaram a metilação da ICR2 por pirosequenciamento, de sete sítios CpG e encontraram uma média de metilação de $65,4 \pm 3,4\%$.

No presente trabalho, foi comparada a metilação do DNA em vilosidade coriônica do primeiro e do terceiro trimestre. Para essa análise, foram utilizadas amostras coletadas de uma região padronizada (próxima da face fetal e da inserção do cordão umbilical) para os dois grupos. As amostras de vilosidade coriônica do terceiro trimestre gestacional apresentaram uma média dos níveis de metilação da KvDMR1 estatisticamente diferente ($p=0,0489$) da média de metilação do primeiro trimestre gestacional, que foi de $50 \pm 2,6\%$. No

entanto, Monk et al. (2006) não encontraram diferenças de metilação e expressão entre o primeiro e o terceiro trimestre gestacionais no padrão de metilação dentro do domínio *KCNQ1*, avaliado por meio de *Southern blotting* e sequenciamento de produtos de PCR modificados por bisulfito de sódio; e na expressão utilizando RT-PCR em amostras de placentas a termo e placentas e tecidos fetais provenientes do primeiro trimestre gestacional. Foram demonstradas a expressão bialélica dos genes *NAPIL4*, *CD81*, *PHEMEX* e *ASCL2*; e a expressão monoalélica dos genes *PHLDA2*, *SLC22A18*, *SLC22A15* e *CDKN1C*.

Novakovic et al. (2011) evidenciaram que ocorrem mudanças programadas na metilação de promotores gênicos ao decorrer da gestação e demonstraram aumento da variabilidade da metilação com o progresso da gestação por meio da análise da metilação do DNA em escala genômica em amostras placentárias de primeiro (n=18), segundo (n=10) e terceiro (n=14) trimestres gestacionais. Os autores relataram um aumento significativo de metilação entre o segundo e o terceiro trimestres gestacionais, no entanto, não houve diferença significativa de metilação entre o primeiro e o terceiro trimestres gestacionais. As mudanças nos níveis de metilação de acordo com a idade gestacional provavelmente estão associadas às mudanças na composição celular e influências ambientais cumulativas.

No presente trabalho, a metilação da H19DMR em amostras de vilosidade coriônica do primeiro trimestre gestacional foi quantificada por meio da técnica DESM-RT e a média encontrada foi de $37 \pm 4\%$. Tabano et al. (2010) quantificaram a metilação da ICR1 em duas amostras de vilosidade coriônica provenientes de abortos espontâneos (cariótipo normal) e encontraram uma média de metilação de 41,5%. Buckberry et al. (2012) analisaram a metilação em duas regiões *upstream* ao sítio de início da transcrição do gene *H19* em 13 amostras de placentas de primeiro trimestre gestacional e encontraram uma média de metilação de $54,8 \pm 6,9\%$ na região 1 e de $30,9 \pm 3,9\%$ na região 2.

A quantificação da metilação da H19DMR em amostras de tecido embrionário, cordão umbilical e âmnion de primeiro trimestre gestacional foi realizada por meio da técnica DESM-RT, com o objetivo de parear as médias de metilação dos grupos embrião e cordão umbilical ($p= 0,37$), embrião e vilosidade coriônica ($p= 0,63$), e não houve diferença estatística na média de metilação entre os grupos. No entanto, a comparação entre tecidos pareados realizada no presente estudo (gráfico 4) demonstrou que a quantificação da metilação da H19DMR não é correspondente entre os tecidos embrionários e extraembrionários em uma mesma gestação, assim como ocorreu para KvDMR1.

Bourque et al. (2010) compararam a média de metilação da ICR1 de amostras a termo de âmnion ($35,8 \pm 2,9\%$) (n=5) e amostras de vilosidade coriônica ($36,7 \pm 3,0\%$) (n=22), e não encontraram diferença estatística. Observaram também que a metilação da ICR1 é mantida normal no âmnion mesmo quando a vilosidade coriônica se encontra hipometilada. Tabano et al. (2010) não encontraram diferença estatística entre a média de

metilação da ICR1 de tecido embrionário de primeiro trimestre gestacional (43,6%) e a média de metilação do cordão umbilical a termo (46%). Os níveis de metilação do cordão umbilical a termo foram semelhantes aos níveis da placenta a termo (46,1%).

Com o objetivo de verificar a presença de mosaicismo com relação ao *imprinting* genômico, no presente estudo, foram coletados fragmentos de todos os cotilédones de quatro placentas a termo. A quantificação para H19DMR dos cotilédones foi realizada por meio da técnica DESM-RT. Para a análise estatística foi realizada a classificação dos cotilédones nos três modelos utilizados para a KvDMR1. No modelo dos quadrantes foi possível verificar que a diferença na média de metilação foi significativamente ($p= 0,0129$) menor para o quadrante 3 que para os demais quadrantes. O quadrante 3 apresentou média de metilação de $27 \pm 3,1\%$, enquanto que o quadrante 1 apresentou média de metilação $39 \pm 3,4\%$, o quadrante 2 apresentou média de metilação $40 \pm 3,1\%$ e o quadrante 4 apresentou média de metilação $39 \pm 3,2\%$. A hipometilação do quadrante 3 pode ser explicada pela porcentagem de metilação nos cotilédones 4, 5, 6, 7, 8, e 10 da amostra Plc 4, que apresentaram hipometilação em relação à placenta como um todo.

Não foi constatada diferença estatística significativa entre as médias dos cotilédones periféricos e dos cotilédones centrais ($p= 0,94$). No modelo do tamanho a média de metilação dos cotilédones grandes foi de $41\% \pm 2,3\%$ e a média de metilação para os cotilédones pequenos foi de $35\% \pm 2,1\%$, havendo uma tendência para diferença estatisticamente significativa de metilação entre cotilédones grandes e pequenos, com o valor de p obtido igual a 0,063. Não há relato na literatura sobre a correlação entre metilação e tamanho do cotilédones. No gráfico 6 é possível observar a variação da metilação da H19DMR intraplacentária maior nas amostras Plc 3 e, principalmente, na Plc 4, que apresentou maior quantidade de cotilédones com hipometilação.

Os resultados obtidos no presente estudo, demonstraram a variação intraplacentária e interplacentária da metilação da H19DMR em placentas a termo, variabilidade também encontrada por Bourque et al. (2010), que realizaram a análise de metilação da ICR1 em dois sítios de amostragem dentro de 22 placentas a termo. Peñaherrera et al. (2012) analisaram a metilação da ICR1 de quatro a nove sítios do lado fetal da placenta ($n=4$), sendo que pelo menos um sítio estava localizado próximo à inserção do cordão umbilical e um sítio estava próximo à periferia do disco placentário, os outros sítios estavam localizados entre o cordão e a periferia. A metilação da ICR1 não apresentou correlação intra-sítios em nenhuma das quatro placentas analisadas.

No presente trabalho, a H19DMR apresentou perfil de metilação diferencial, com uma média de porcentagem de metilação de $35 \pm 4\%$ para placentas normais a termo (controles), obtida por meio da técnica DESM-RT, condizente com a média de metilação encontrada por Bourque et al. (2010) para H19DMR de 36,7% ($n=22$) por meio da técnica de

extensão com *primer* de nucleotídeo único sensível à metilação (Ms-SnuPE, do inglês *methylation-sensitive single nucleotide primer extension*). O perfil de metilação diferencial também foi encontrado em um estudo realizado por meio da técnica de *Southern Blot* associada à digestão com enzima sensível à metilação, realizado por Guo et al. (2008), para o qual a média de metilação para H19DMR de placentas normais a termo foi de $47,7 \pm 7\%$.

A média de metilação da H19DMR em amostras de vilosidade coriônica de primeiro trimestre não diferiu estatisticamente da média de metilação de amostras de terceiro trimestre ($35 \pm 4\%$), no presente estudo. Tabano et al. (2010) utilizaram experimentos de pirosequenciamento com o objetivo de comparar o padrão metilação da ICR1 no primeiro e no terceiro trimestre gestacional, em amostras de vilosidade coriônica de primeiro trimestre provenientes de abortos voluntários (cariótipo normal) e encontraram uma média de metilação (41,5%) estatisticamente igual à média de metilação de placentas a termo (46,1%).

Buckberry et al. (2012) quantificaram a metilação do DNA por meio de pirosequenciamento associado à modificação por bissulfito de sódio em duas regiões *upstream* ao sítio de início da transcrição do gene *H19* (região 1 e 2), que correspondem a regiões diferencialmente metiladas, e em uma terceira região (região 3) localizada no sítio de início da transcrição (TSS, do inglês *transcription start site*) do gene *H19*. A região 1 não apresentou diferença significativa nos níveis médios de metilação entre amostras de placenta do primeiro trimestre gestacional ($54,8 \pm 6,9\%$) e placentas a termo ($53,5 \pm 7,2\%$). A região 2 apresentou uma média de metilação maior no primeiro trimestre (30,9 ± 3,9%) em relação ao terceiro trimestre gestacional ($28,9 \pm 5,3\%$), mas essa diferença não foi correlacionada com a expressão alelo-específica do gene *H19*. A região 3, que corresponde ao TSS do gene *H19*, apresentou uma média de metilação maior ($16,1 \pm 3,1\%$) em placentas de primeiro trimestre que em placentas a termo ($15,5 \pm 3,5\%$).

A expressão alelo-específica para o gene *H19* (alelo reprimido), quantificada utilizando pirosequenciamento, foi significativamente mais alta em placentas de primeiro trimestre gestacional do que em placentas a termo. Não foram encontradas diferenças na expressão alelo-específica do gene *IGF2* (alelo reprimido) entre o primeiro e o terceiro trimestre gestacionais. Esses resultados indicam que a expressão do *IGF2* é finamente regulada e estável através da gestação (BUCKBERRY et al., 2012).

A perda de *imprinting* (LOI, do inglês *genomic loss of imprinting*) é o ganho de expressão de um alelo silenciado em um gene que normalmente expressa apenas uma cópia parental. A LOI tem sido associada com doenças do neurodesenvolvimento e anormalidades reprodutivas. Os mecanismos de *imprinting* são variados e a metilação do DNA representa apenas um deles. A LOI é um fenômeno comum em placentas humanas provenientes de gestações normais (LAMBERTINI et al., 2008).

A análise do gene *H19* de 24 amostras em um grupo de 87 placentas (27,59%) com idade gestacional entre 5 e 9 semanas de gestação exibiram expressão bialélica do gene, enquanto que todas as amostras de placentas com idade gestacional superior a 10 semanas apresentaram expressão monoalélica do *H19*, demonstrando a LOI em tecido placentário. (YU et al., 2009).

Pozharny et al. (2010) também encontraram uma significativa LOI em placentas de primeiro trimestre gestacional com relação à placentas de terceiro trimestre gestacional, em 14 genes que sofrem *imprinting* na placenta. Dentre os genes estudados estão os genes *H19* e *IGF2*. O gene *H19* demonstrou um nível de 6,92% de LOI menor no primeiro trimestre com relação ao terceiro. Por outro lado o gene *IGF2* apresentou um nível de LOI 4,95% maior em placentas do primeiro trimestre com relação à placentas a termo. No entanto, 11 dos 14 genes não apresentaram diferenças na expressão gênica entre o primeiro e o terceiro trimestre, sugerindo que não há uma correlação entre LOI e expressão gênica. A dissociação entre expressão gênica e metilação do DNA pode ser explicada pela influência de mecanismos como modificação de histonas e RNA não-codificadores na expressão.

Os estudos de Pozharny et al. (2010) e Yu et al. (2009) evidenciaram que o *imprinting* genômico é um processo que evolui ao longo da gestação, estando relacionado à formação e amadurecimento da placenta e à manutenção da gestação normal.

A placenta humana é heterogênea com relação à metilação do DNA e a expressão gênica. A variabilidade ocorre entre períodos gestacionais diferentes e entre sítios diferentes de uma mesma placenta. Tecidos embrionários e extraembrionários provenientes de uma mesma gestação apresentam padrão diferente de metilação, fator que deve ser considerado no diagnóstico a partir de amostras de vilosidade coriônica.

5.2 Padrão de inativação do cromossomo X em tecido placentário.

A inativação do cromossomo X equaliza a expressão de genes ligados ao X entre machos e fêmeas. A inativação ocorre de forma aleatória em células somáticas de mamíferos placentários. O cromossomo X materno ou paterno é inativado numa célula progenitora o estado reprimido é mantido na progênie celular e a transmissão do estado ativo ou inativo ocorre por meio de divisões mitóticas. Alguns genes ligados ao cromossomo X escapam da inativação em humanos e são expressos em ambos os cromossomos. O processo de inativação aleatória do cromossomo X dá origem a mosaicos celulares em fêmeas. A inativação preferencial do cromossomo X pode ocorrer, por exemplo, em casos em que existem mutações relacionadas à doenças em genes ligados ao cromossomo X, com a seleção de células que apresentam o cromossomo X ativo com o gene não mutado e

que, conseqüentemente, exibem vantagens proliferativas (CARREL; WILLARD, 2005; MIGEON, 2007).

A inativação preferencial do X está associada com a sobrevivência seletiva de fêmeas com doenças dominantes ligadas ao X que são letais em machos ou que apresentam fenótipo variado em fêmeas (VAN DER VEYVER, 2001). Pegoraro et al. (1997) descreveram a inativação preferencial do cromossomo X em uma jovem com distrofia muscular e sua mãe, e identificaram a herança materna de inativação preferencial. A inativação não-aleatória foi associada com abortos espontâneos recorrentes (SANGHA et al., 1999). Schanen e Francke (1998) encontraram padrão não-aleatório de inativação do cromossomo X em uma família com recorrência de síndrome de Rett.

Estudos recentes demonstraram que a inativação do cromossomo X em placentas a termo é aleatória (MOREIRA DE MELLO et al., 2010; OLIVEIRA, 2010). No presente estudo, foi realizada a avaliação do padrão de inativação do cromossomo X de diferentes sítios placentários foi efetuada por meio do ensaio HUMARA com acréscimo de um novo marcador de inativação do cromossomo X (ICX1). Foram analisados fragmentos de todos os cotilédones (11 e 12) de duas placentas (Plc 2 e Plc 4, respectivamente). A inativação do cromossomo X foi considerada não-aleatória quando o alelo superior (com maior comprimento) apresentou porcentagem de metilação acima de 70% ou menor que 30%, sendo considerada inativação preferencial extrema, valores acima de 90% ou menor que 10%.

Na amostra Plc 2, que apresentou 11 cotilédones, o ensaio de HUMARA possibilitou verificar a inativação aleatória do cromossomo X em quatro cotilédones (1, 2, 5 e 7). A porcentagem de metilação do alelo superior (com maior comprimento) do gene *AR* variou de 8,18 a 70,29%, mostrando uma tendência para inativação não-aleatória nos cotilédones 3, 4, 6, 8, 9, 10 e 11. Um maior número de cotilédones apresentou inativação não-aleatória do X. Com relação ao marcador ICX1, quatro cotilédones (5, 8, 9 e 11) apresentaram inativação aleatória. A variação de metilação do alelo superior do marcador ICX1 foi de 10,37 a 42,57%. Os cotilédones 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 10 apresentaram uma tendência para inativação não-aleatória. Houve divergência entre a porcentagem de metilação do alelo superior do gene *AR* e a porcentagem de metilação do alelo superior do marcador ICX1 nos cotilédones 1, 2, 7, 8, 9 e 11.

A amostra Plc 4 apresentou 12 cotilédones, o ensaio de HUMARA mostrou inativação aleatória do cromossomo X em cinco cotilédones (1, 2, 5, 7 e 12). A porcentagem de metilação do alelo superior do gene *AR* variou entre 99,22 e 38,64%. Os cotilédones 3, 4, 6, 8, 9, 10 e 11 exibiram uma tendência de inativação não-aleatória. A maioria dos cotilédones apresentaram inativação não-aleatória do X. A porcentagem de metilação do marcador ICX1 indicou inativação aleatória do X em 11 cotilédones, e tendência para

inativação não-aleatória em um cotilédone. A variação de metilação do alelo superior do marcador ICX1 foi de 19,38 a 61,69%. A porcentagem de metilação do alelo superior do gene *AR* e do alelo superior do marcador ICX1 se diferenciaram nos cotilédones C3, C4, C6, C7, C8, C9, C10 e C11.

Os dados obtidos mostraram variabilidade na porcentagem de metilação entre o alelo superior do gene *AR* e o alelo superior do marcador ICX1, e mostraram heterogeneidade no padrão de inativação do cromossomo X entre diferentes cotilédones de uma mesma placenta. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Looijenga et al. (1999), que utilizaram a metilação do gene *AR* para estabelecer o padrão de inativação do X em células trofoblásticas. Foram coletados fragmentos de todos os cotilédones (numerados de 1 a 9) de duas placentas a termo. O padrão de inativação do cromossomo X variou entre os cotilédones de uma mesma placenta, que apresentaram inativação aleatória, inativação preferencial do alelo materno e inativação preferencial do alelo paterno. As diferenças no padrão de inativação do X entre sítios de uma placenta podem ser explicadas pela expansão clonal das células trofoblásticas progenitoras com o cromossomo X paterno ou materno inativo.

A análise estatística realizada no presente trabalho mostrou que a variação no padrão de inativação do cromossomo X dentro da placenta não possui relação com o tamanho (grande e pequeno) ou a posição (periférico e central) dos cotilédones. Looijenga et al. (1999) também verificaram que a inativação do X dos cotilédones parece ser independente da localização, apesar de indícios de agrupamentos estarem presentes.

Moreira de Mello et al. (2010) avaliaram a expressão de 22 genes ligados ao X, incluindo o *XIST*, por meio de 27 SNPs, encontraram um padrão variável de inativação do cromossomo X em 21 amostras de placenta a termo e concluíram que a inativação do X na placenta humana é aleatória. Com o objetivo de demonstrar que fragmentos diferentes de uma única placenta podem apresentar padrões diferentes de inativação do X realizaram a análise de três fragmento não-adjacentes de uma mesma placenta, em três placentas adicionais, por meio da expressão de genes ligados ao X e demonstraram que a placenta é dividida em regiões de células que podem apresentar o cromossomo X paterno inativo ou o cromossomo X materno inativo. No entanto, foram analisados apenas três cotilédones em cada placenta e o ensaio utilizado no trabalho de Moreira de Mello et al. (2010) foi pouco informativo para vários SNPs.

Peñaherrera et al. (2012) avaliaram o padrão de inativação do cromossomo X de três a sete sítios e em quatro profundidades diferentes de quatro placentas a termo, utilizando quantificação da metilação do gene *AR* por meio de pirosequenciamento e mostraram concordância dos valores de inativação preferencial do cromossomo X entre profundidades diferentes retiradas do mesmo sítio, em contraste com a variação sítio-a-sítio observada em

diferentes amostragens ao longo da superfície placentária. A placenta é composta por “árvores” de vilosidade coriônica ou “árvores vilosas” que crescem a partir da placa coriônica (lado fetal da placenta). A amostragem vertical (por profundidade) apresenta uma maior similaridade no nível de inativação preferencial do X porque favorece a obtenção de células derivadas da mesma árvore ou conjunto de árvores vilosas, demonstrando que a divisão celular ocorre de maneira clonal por profundidade.

O ensaio de HUMARA foi utilizado por Zeng e Yankowitz (2003) para avaliar o padrão de inativação do cromossomo X em citotrofoblastos humanos normais e tecidos fetais. Em 55 amostras informativas de citotrofoblastos, 18 apresentaram inativação preferencial do cromossomo X e 37 amostras mostraram inativação aleatória do X. Enquanto que em 24 amostras informativas de tecido embrionário, apenas duas apresentaram inativação preferencial. Os autores concluíram que a inativação preferencial do cromossomo X é mais frequente em citotrofoblastos do que em tecidos embrionário.

Goto et al. (1997) utilizaram o ensaio de HUMARA para estudar o padrão de inativação de linhagens trofoblásticas e mesodérmicas de duas placentas com 10-12 semanas de gestação e encontraram que em células trofoblásticas o alelo paterno é preferencialmente inativo, em contraste, nas células mesodérmicas, os alelos paternos e maternos são hipometilados. Esses resultados sugerem que a inativação do cromossomo X é preferencial em cultura de células trofoblásticas no início do desenvolvimento placentário, no entanto, esse trabalho não é conclusivo para estabelecer o padrão de inativação do X na placenta porque foi estudado apenas um sítio em cada amostra (n=2), e os experimentos foram realizados com cultura celular, sofrendo assim os efeitos da seleção de células.

Cotton et al. (2009) avaliaram três regiões (promotor, intragênica, e intergência) de genes ligados ao X, em dois sítios diferentes de cada placenta (n=12), mostraram que a placenta apresenta redução na metilação no cromossomo X inativo quando comparada com amostras de sangue e demonstraram a presença de uma variação maior na metilação entre amostras de placentas e entre sítios da mesma placenta do que em amostras de sangue.

O presente estudo e trabalhos anteriores demonstraram que sítios amostrados de uma mesma placenta apresentam diferenças com relação à inativação do cromossomo X. Exames em tecidos placentário para avaliar alterações associadas com doenças devem considerar as diferenças genéticas e epigenéticas presentes entre os sítios amostrados de uma mesma placenta.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na média de metilação da KvDMR1 e da H19DMR entre diferentes tecidos (embrionários e extraembrionários) proveniente do primeiro trimestre gestacional. No entanto, a comparação entre tecidos pareados de uma mesma gestação mostrou que a quantificação da metilação da KvDMR1 e da H19DMR não é correspondente entre tecidos diferentes.
- Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa de metilação na KvDMR1 entre os grupos nos quais os cotilédones foram classificados.
- A média de metilação da H19DMR foi estatisticamente diferente entre cotilédones grandes e pequenos e entre os quadrantes; mas não apresentou diferença estatística entre cotilédones periféricos e centrais.
- Foi encontrada diferença estatisticamente significativa de metilação da KvDMR1 entre as amostras de vilosidade coriônica de primeiro e terceiro trimestre gestacionais.
- Não houve diferença significativa de metilação da H19DMR entre amostras de vilosidade coriônica de primeiro e terceiro trimestre gestacionais.
- Foi verificada variabilidade na porcentagem de metilação entre o alelo superior do gene *AR* e o alelo superior do marcador ICX1, e heterogeneidade no padrão de inativação do cromossomo X entre diferentes cotilédones de uma mesma placenta, indicando mosaicismo placentário com relação à inativação do X.
- A variação no padrão de inativação do cromossomo X entre cotilédones de uma mesma placenta não está relacionada ao tamanho ou a localização dos mesmos.
- Portanto, foi constatado mosaicismo do perfil epigenético em relação a diferentes tecidos de gestações de primeiro trimestre e em diferentes cotilédones de placentas do terceiro trimestre.
- O diagnóstico pré-natal de doenças epigenéticas deve considerar a heterogeneidade epigenética placentária que ocorre entre períodos gestacionais diferentes, entre sítios diferentes de uma mesma placenta e a variação de metilação entre tecidos embrionários e extraembrionários provenientes de uma mesma gestação.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, A. Dosage compensation: an intertwined world of RNA and chromatin remodeling. **Current Opinion in Genetics and Development**. v. 13. p. 161-169. 2003.

ALLEN, R.C.; ZOGHBI, H.Y.; MOSELEY, A.B.; ROSENBLATT, H.M.; BELMONT, J.M. Methylation of HpaII and HhaI near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. **American Journal of Human Genetics**. v. 51, p. 1229-1239. 1992.

AMOS-LANDGRAF, J.M.; COTTLE, A.; PLENGE, R.M.; FRIEZ, M.; SCHWARTZ, C.E.; LONGSHORE, J.; WILLARD, H.F. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. **The American Journal of Human Genetics**. v. 79, p. 493-499. 2006.

AUGUI, S.; NORA, E.P.; HEARD, E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. **Nature Review Genetics**. v. 12. p. 429-442. 2011.

APLIN, J.D. The biological basis of human implantation. **Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**. v. 14, p. 757-764. 2000.

ARAÚJO, A.; RAMOS, E.S. Cryptic mosaicism involving a second chromosome X in patients with Turner syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 41, p. 368-372. 2008.

AVNER, P.; HEARD, E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. **Nature Reviews**. v. 2, p. 59-67. 2001.

AVILA, L.; YUEN, R.K.; DIEGO-ALVAREZ, D.; PEÑARRERA, M.S.; JIANG, R.; ROBINSON, W.P. Evaluating DNA methylation and gene expression variability in the human term placenta. **Placenta**. v. 31, p. 1070-1077. 2010.

BASS, K.E.; MORRISH, D.; ROTH, I.; BHARDWAJ, D.; TAYLOR, R.; ZHOU, Y.; FISHER, S.J. Human Cytotrophoblast Invasion Is Up-regulated by Epidermal Growth Factor: Evidence That Paracrine Factors Modify This Process. **Developmental Biology**. v. 164, p. 550-561. 1994.

BEATTY, L.; WEKSBERG, R.; SADOWSKI, P.D. Detailed analysis of the methylation patterns of the KvDMR1 imprinting control region of human chromosome 11. **Genomics**. v. 87, p. 45-56. 2006.

BERG, I.M.V.; GALJAARD, R.J.; LAVEN, J.S.E.; VAN DOORNINCK. XCI in preimplantation mouse and human embryos: first there is remodeling...**Human Genetics**. v. 130, p. 203-215. 2011.

BERNARDINO, J.; LAMOLIATTE, E.; LOMBARD, M.; NIVELEAU, A.; MALFOY, B.; DUTRILLAUX, B.; BOURGEOIS, C.A. DNA methylation of the X chromosomes of the human female: an in situ semi-quantitative analysis. **Chromosoma**. v. 104, p. 528–535. 1996.

BERNSTEIN, E.; ALLIS, D. RNA meets chromatin. **Genes and Development**. v. 19, p. 1635-1655. 2005.

BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human Molecular Genetic**. v. 9, p. 2395–2402. 2000.

BIRD, A., AND WOLFFE, A.P. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. **Cell**. v.99, p. 451–454.1999.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**. V. 447, p. 396-398. 2007.

BLACKBURN, S.T. **Maternal, fetal and neonatal physiology: a clinical perspective**. 2 ed. St. Louis, USA: Saunders. 2003.

BOURQUE, D.K.; AVILA, L.; PEÑAHERRERA, M.; DADELSZEN, P.V.; ROBINSON, W.P. Decrease placental methylation at the H19/IGF2 imprinting control region is associated with normotensive intrauterine growth restriction but not preeclampsia. **Placenta**. v. 31, p. 197-202. 2010.

BROWN, C.J.; LAFRENIERE, R.G.; POWERS, V.E., SEBASTIO, G.; BALLABIO, A.; PETTIGREW, A.L.; LEDBETTER, D.H.; LEVY, E.; CRAIG, I.W.; WILLIARD, H.F. Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. **Nature**. v. 394, p. 325-329. 1991.

BUCKBERRY,S.; BIANCO-MIOTTO, T.; HIENDLEDER, S.; ROBERTS, C. Quantitative allele-specific expression and DNA methylation analysis of *H19*, *IGF2* e *IGF2R* in the human placenta across gestation reveals H19 imprinting plasticity. **Plos One**. v. 7, e51210. doi: e10.1371/journal.pone.0051210. 2012.

BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E.; CHARNOCK-JONES, D.S. (2007). Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. **Placenta**. v. 28, p. 64–69. 2007.

BUSQUE, L.; PAQUETE, Y.; PROVOST, S.; ROY, D.; LEVINE, R.; MOLLIKA, L.; GILLILAND. Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies. **Blood**. v. 113, p. 3472-3474. 2009.

CARREL, L.; WILLARD, H.F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. **Nature**. v. 343, p. 400-404. 2005.

CHANG, S.C.; TUCKER, T.; THOROGOOD, N.P.; BROWN, C.J. Mechanisms of X-chromosome inactivation. **Frontiers in Bioscience**. v. 11. p. 852-866. 2006.

CHEN, C.P.; LEE, C.C.; TOWN, D.D.; LEE, M.S.; WANG, W. Discrepancy between the fetus and extra-embryonic tissues in prenatally detected mosaic distal 5p deletion. **Genetic Counseling**. v. 15, p. 473-476. 2004.

CHEN, C.P.; LU, Y. N.; CHERN, S.R.; TSAI, F.J.; WU, P.C.; CHEN, H.E.C.; CHIANG, S.S.; WANG, W. Mosaic tetrasomy 12p with discrepancy between fetal and extraembryonic tissues: molecular analysis and possible mechanism of formation. **Taiwan Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 49, p. 235-138. 2010.

CHIESA, N.; CRESCENZO, A.; MISHRA, K.; PERONE, L.; CARELLA, M.; PALUMBO, O.; MUSSA, A.; SPARAGO, A.; CERRATO, F.; RUSSO, S.; LAPI, E.; CUBELLIS, M.V.; KANDURI, C.; SILENGO, M.C.; RICCIO, A.; FERRERO, G. B. The KCNQ1OT1 imprinting control region and non-coding RNA: new properties derived from the study of Beckwith–Wiedemann syndrome and Silver–Russell syndrome cases. **Human Molecular Genetics**. v. 21, p. 10-25. 2011.

CHU, T.; HANDLEY, D.; BUNCE, K.; SURTI, U.; HOGGE, W.A.; PETERS, D.G. Strutral and regulatory characterization of the placental epigenome at its maternal interface. **Plos One**. v. 6, p. e14723. doi.10.1371/journal.pone.0014723. 2011.

COELHO, K. **Padrão de Metilação da KvDMR e da H19DMR em Mulheres com Pré-eclâmsia**. Ribeirão Preto, 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2010.

COTTON, A.M.; AVILA, L.; PEÑAHERRERA, M.S.; AFFLECK, J.G.; ROBINSON, W.P.; BROWN, C.J. Inactive X chromosome-specific reduction in placental DNA methylation. **Human Molecular Genetics**. v. 18, p. 3544-3552. 2009.

CROSS, J.C.; WERB, Z.; FISHER, S.J. Implantation and the Placenta: Key Pieces of the Development Puzzle. **Science**. v. 266, p. 1508–1518. 1994.

DAMSKY, C.H.; FISHER, S. J. Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 10, p. 660-666. 1998.

DELAVAL K., WAGSCHAL A., FEIL R. Epigenetic deregulation of imprinting in congenital diseases of aberrant growth. **Bioessays**. v. 28, p. 453-459. 2006.
DIPLAS, A. I.; LAMBERTINI, L.; LEE, M.-JEAN; SPERLING, R. ; LEE, Y.L. ; WETMUR, J. ; CHEN, J. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. **Epigenetics**, p. 235-240, 2009.

FOWDEN, A.L.; FORHEAD, A.J.; COAN, P.M.; BURTON, G.J. The placenta and intrauterine programming. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 20, p. 439-450. 2008.

FROST, J.M.; MOORE, G.E. The importance of imprinting in the human placenta. **Plos Genetics**. v. 6, p. e1001015. 2006.

GASTON, V.; BOUC, Y.; SOUPRE, V.; BURGLIN, L.; DONADIOU, J.; ORO, H.; AUDRY, G.; VAZQUEZ, M.; GICQUEL, C. Analysis of the methylation status of the KCNQ1OT and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith Wiedemann syndrome. **European Journal of Human Genetics**. v.9, p. 409 -418. 2001.

GENE IMPRINTING. Disponível em: < <http://www.geneimprint.com>>. Acesso em: 07 nov. 2012.

GOMES, M.V.; GOMES, C.C.; PINTO Jr., W.; RAMOS, E.S. Methylation pattern at the KvDMR in a child with Beckwith-Wiedemann Syndrome conceived by ICSI. **American Journal of Medical Genetics**. Part A. v. 143, p. 625–629. 2007.

GOMES, M.V.; HUBER, J.; FERRIANI, R.A.; AMARAL-NETO, A.M.; RAMOS, E.S. Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies. **Molecular Human Reproduction**. v. 15, p. 471-477, 2009.

GOSDEN, C.; KALOUSEK, D.K.; HARRISON, K. Chromosomal mosaicism. In: REED, G.; CLAIREAUX, A.E. (Eds). **Diseases of the fetus and newborn**. 2nd ed. Londres: Chapman and Hall. p. 2240–2254. 1995.

GOTO, T.; WRIGHT, E.; MONK, M. Paternal X-chromosome inactivation in human trophoblastic cells. **Molecular Human Reproduction**. v. 3, p. 77-80. 1997.

GUDE, N.M.; ROBERTS, C.T.; KALIONIS, B.; KING, R.G. Growth and function of the human placenta. **Thrombosis Research**. v. 114, p. 397-407. 2004.

GUO, L.; CHOUFANI, S.; FERREIRA, J.; FERREIRA, J.; SMITH, A.; CHITAYAT, D.; SHUMAN, C.; UXA, R.; KEATING, S.; KINGDOM, J.; WEKSBERG, R. Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae. **Blood**. v. 320, p. 79-91, 2008.

HAIG, D. The (Dual) Origin of Epigenetics. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**. v. 69, p. 67-70. 2004.

HARRISON, K.B. X-chromosome inactivation in the human cytotrophoblast. **Cytogenetic Cell Genetics**. v. 52, p. 37-41. 1989.

HELLMAN, A.; CHESS, A. Gene body-specific methylation on the active X Chromosome. **Science**. v. 315, p. 1141–1143. 2007.

HENDERSON, K.G.; SHAW, T.E.; BARRET, I.J.; TELENUS, A.H.P.; WILSON, R.D.; KALOUSEK, D.K. Distribution of mosaicism in human placenta. **Human Genetics**. v. 97, p. 650-654. 1996.

HERMANN A, GOWHER H, JELTSCH A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cell and Molecular Life Sciences**. v. 61, p. 2571–2587. 2004.

HOLLIDAY, R. The inheritance of epigenetics defects. **Science**, v. 238, p. 163-170, 1987.

HORIKE, S.; MITSUYA, K.; MEGURO, M.; KOTOBUKI, N.; KASHIWAGI, A.; NOTSU, T.; MSCHULZ, T.; SHIRAYOSHI, Y.; OSHIMURA, M. Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Human Molecular Genetic**. v. 9, p. 2075-2083. 2000.

HUPPERTZ, B. The anatomy of the normal placenta. **Journal of Clinical Pathology**. v. 61, p. 1296-1302. 2008.

HUYNH, K.D., LEE, J.T. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. **Nature**. v. 426. p. 857-862. 2003.

ISHIDA, M.; MOORE, G. E. The role of imprinting genes in humans. **Molecular Aspects of Medicine**. 2012.

JAMES, J.L.; CARTER, A. M.; CHAMLEY, L.W. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? **Placenta**. v. 33, p. 327-334. 2012.

KALOUSEK, DK. Current topic: confined placental mosaicism and intrauterine fetal development. **Placenta**. v.15, p. 219-230. 1994.

KALOUSEK, D.K.; DILL, F.J. Chromosome mosaicism confined to the placenta in human conceptions. **Science**. v. 221, p.665–667. 1983.

KALOUSEK, D.K.; VEKEMANS, M. Confined placental mosaicism. **Journal of Medical Genetics**. v. 33, p. 529-533. 1996.

KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biology of Reproduction**. v. 69, p. 1-7. 2003.

KAROLCHIK, D.; KUHN, R.M.; BAERTSCH, R.; BARBER, G.P.; CLAWSON, H.; DIEKHANS, M.; GIARDINE, B.; HARTE, R.A.; HINRICHS, A.S.; HSU, F.; KOBER, K.M.; MILLER, W.; PEDERSEN, J.S.; POHL, A.; RANEY, B.J.; RHEAD, B.; ROSENBLOOM, K.R.; SMITH, K.E.; STANKE, M.; THAKKAPALLAYIL, A.; TRUMBOWER, H.; WANG, T.; ZWEIG, A.S.; HAUSSLER, D.; KENT, W.J. The UCSC genome browser database: 2008 update. **Nucleic Acids Research**. v. 36, p. D773-779. 2008.

LAMBERTINI, L.; DIPLAS, A. I.; LEE, M.J.; SPERLING, R.; CHEN, J.; WETMUR, J. A sensitive functional assay reveals frequent loss of genomic imprinting in human placenta. **Epigenetics**. v.3, p. 261-269. 2008.

LEE, J.T.; DAVIDOW, L.S.; WARSHAWSKY, D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. **Nature Genetics**. v. 21, p. 400-404. 1999

LEE, M.P.; DEBAUM, M.R.; MITSUYA, K.; GALONEK, H.L.; BRANDENBURG, S.; OSHIMURA, M.; FEINBERG, A.P. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KvLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**. v. 96, p. 5203-5208. 1999.

LEITE, S.B.P. **Influência da idade gestacional no perfil epigenético placentário**. Ribeirão Preto, 2012. 99f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2012.

LESTOU, V.S.; KALOUSEK, D.K. Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal edition**. v. 79, p. F223-F226. 1998.

LOOIJENGA, L.H.J.; GILLIS, A.J.M.; VERKERK, A.J.M.H.; PUTTEN, W.L.J.V.; OOSTERHUIS. Heterogeneous X inactivation in trophoblastic cells of human full-term female placentas. **American Journal of Human Genetics**. v. 64, p. 1445-1452. 1999.

LOKE, Y.W.; KING, A. Human Implantation. **Cell Biology and Immunology**. Cambridge: Cambridge University Press. 1995.

LUGER, K.; MADER, A.W.; RICHMOND, R.K.; SARGENT, D.F.; RICHMOND, T. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**. v. 398, p. 251-260. 1997.

LYON, M.F. Gene in action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). **Nature**. v. 190. P. 372-373. 1961.

MAHER, E.R.; REIK, W. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. **Journal of Clinical Investigation**. v. 105, p.247-252. 2000.

MARK, W.; NESTEROVA, T.B.; DE NAPOLES, M.; APPANAH, Y.; YAMANAKA, S.; OTTE, A.P.; BROCKDORFF, N. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. **Science**. v. 303, p. 666-669. 2004.

MANCINI-DINARDI, D.; STEELE, S.J.; LEVORSE, J. M.; INGRAM, R.S.; TILGHMAN, S.M. Elongation of *KCNQ1OT1* transcripts is required for genomic imprinting of neighboring genes. **Genes Dev**. v. 20, p. 1268-1282. 2006.

MARGUERON, R.; TROJER, P.; REIBERG, D. The key to development: interpreting the histone code? **Current Opinion in Genetics and Development**. v. 15, p. 163-176. 2006.

MEYER, B. J. Sex in the worm: counting and compensating X-chromosome dose. **Trends in Genetics**. v. 16. p. 247-253. 2000.

MCCOWAN, L.M.; BECROFT, D.M. Beckwith-Wiedemann syndrome, placental abnormalities, and gestational proteinuric hypertension. **Obstetrics and Gynecology**. v.83, p.813–817. 1994.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genome. **Cell**. v. 37, p. 179-183. 1984.

MCMINN, J.; WEI, M.; SCHUPF, N.; CUSMAI, J.; JOHNSON, E. B.; SMITH, A. C.; WEKSBERG, R.; THAKER, H. M.; TYCKO, B. Unbalanced Placental Expression of Imprinted Genes in Human Intrauterine Growth Restriction. **Placenta**, p. 540-549, 2006.

MIGEON, B.R. Why females are mosaics, X-chromosome inactivation, and sex differences in disease. **Gender Medicine**. v. 4, p. 97-105. 2007.

MIGEON, B.R.; LEE, C.H.; CHOWDHURY, A.K.; CARPENTER, H. Species differences in TSIX/Tsix reveal roles of these genes in X chromosome inactivation. **American Journal of Genetics**. v. 71, p. 286-293. 2002.

MONK, D.; ARNAUD, P.; APOSTOLIDOU, S.; HILLS, F.A.; STANIER, P.; FEIL, R.; MOORE, G.E. Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 103, p. 6623-6628. 2006.

MOORE, T.; HAIG, D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. **Trends in Genetics**. v. 2, p. 45-49. 1991.

MOREIRA DE MELLO, J.C.; ARAÚJO, E.S.; STABELLIN, R.; FRAGA, A. M.; SOUZA, J. E. S.; SUMITA, D.R.; CAMARGO, A. A.; PEREIRA, L.V. Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the x chromosome. **Plus One**. v. 5, p. e10947. 2010

NAKAO, M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene**. v. 278, p. 25-31, 2001.

NEYROUD, N.; RICHARD, P.; VIGNIER, N.; DONGER, C.; DENJOY, I.; DEMAY, L.; SHKOLNIKOYA, M.; PESCE, R.; CHEVALIER, P.; HAINQUE, B.; CAOUMEL, P.; SCHWART, K.; GUICHENEY, P. Genomic organization of the KCNQ1 K⁺ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long-QT syndrome. **Circulation Research**. v.84, p.290-297. 1999.

NIGHTINGALE, K.P.; O'NEILL, L.P.; TURNER, B.M. Histone modifications: signaling receptors and potencial elements of a heritable epigenetic code. **Current Opinion in Genetic and Development**. v. 16, p. 125-136. 2006.

NOVAKOVIC, B.; YUEN, R.K.; GORDON, L.; PEÑAHERRERA, M.S.; SHARKEY, A.; MOFFET, A.; CRAIG, J.M.; ROBINSON, W.P.; SAFFERY, R. Evidence for widespread changes in promotor methylation profile in human placenta in response to increasing gestational age and environmental/stochastic factors. v. 12. **BioMed Central Genomics**. 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/529>>. Acesso em 02 Janeiro 2013.

OHKI, I., SHIMOTAKE, N., FUJITA, N., JEE, J., IKEGAMI, T., NAKAO, M., SHIRAKAWA, M. Solution structure of the methyl-cpg binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. **Cell**. v. 105, p.487–497. 2001.

OKAMOTO, I.; PATRAT, C.; THEPOT, D.; PEYNOT, N.; FAUQUE, P.; DANIEL, N.; DIABANGOUAYA, P.; WOLF, J.P.; RENARD, J.P.; DURANTHON, V.; HEARD, E. Eutherian mammals use divers strategies to initiate X- chromosome inactivation during development. **Nature**. v. 472, p. 370-374. 2011.

OLERUP, O., ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSCP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**. v. 39, p.225-235. 1992.

OLIVEIRA, A.A. **Padrão de inativação do cromossomo X e expressão de microRNAs X específicos na pré-eclâmpsia**. 2005. 117f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

PARK, Y.; KURODA, M.I. Epigenetic Aspects of X-chromosome dosage compensation. **Science**. v. 293. p. 1083-1085. 2001.

PEGORARO, E., WHITAKER, J., MOWERY-RUSHTON, P., SURTI, U., LANASA, M., HOFFMAN, E. P. Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28. **American Journal of Human Genetics**. v. 61, p.160-170. 1997.

PEÑAHERRERA, M.S.; JIANG, R.; AVILA, L.; YUEN, R. K. C.; BROWN, C. J.; ROBINSON, W. P. Patterns of placental development evaluated by chromosome inactivation profiling provide a basis to evaluate the origin of epigenetic variation. **Human Reproduction**. v. 27, p. 1745-1753. 2012.

PIEDRAHITA, J. A. The role of imprinted genes in fetal growth abnormalities. **Birth Defects Research**. v. 91, p. 682-692. 2011.

PIJNENBORG, R. Trophoblast invasion and placentation in the human: morphological aspects. **Trophoblast Research**. v.4, p. 33–47. 1990.

POZHARNY, Y., LAMBERTINI, L., MA, Y., FERRARA, L., LITTON, C.G., DIPLAS, A., JACOBS, A.R., CHEN, J., STONE, J.L., WETMUR, J., LEE, M.-J., Genomic loss of imprinting in first-trimester human placenta. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 202, p. 391-398. 2010.

PROBST, A.V.; DUNLEAVY, E.; ALMOUZNI, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. **Nature Reviews Molecular and Cell Biology**, v. 10, p. 192-206, 2009.

PSYCHOYOS A The implantation window: Basic and clinical aspects. In **Perspectives in Assisted Reproduction** (Eds) MORI, T.; AONO, T; TOMINAGA, T.; HIROI, M. p. 57–63.1994.

REIK, W; LEWIS, A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. **Nature Reviews Genetics**. v. 6, p. 403-410. 2005.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic Imprinting: parental influence on the genome. **Nature Reviews Genetics**. v. 2, p. 21-32. 2001.

REIK, W; WALTER, J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. **Nature Genetics**. v.27, p.255-256. 2001.

RIGGS, A.D.; MARTIENNSSEN, R.A.; RUSSO, V.E.A. **Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1996.

ROPER, H.-H.; WOLFF, G.; HITZEROTH, H.W. Preferential X inactivation in human placenta membranes: is the parental X inactive in early embryonic development of female mammals? **Human Genetics**. v. 43, p. 265-273. 1978.

ROSSANT, J.; CROSS, J.C. Placental development: Lessons from mouse mutants. **Nature Review Genetics**. v. 2, p. 538-548. 2001.

SALAMONSEN, L.A.; NIE, G.; HANNAN, N.J.; DIMITRIADIS, E. Preparing fertile soil: the importance of endometrial receptivity. **Fertility and Development**, v. 21, p. 923-934. 2009.

SANGHA, K. K., STEPHENSON, M. D., BROWN, C. J., ROBINSON, W. P. Extremely skewed X-chromosome inactivation is increased in women with recurrent spontaneous abortion. **American Journal of Human Genetics**. v. 65, p. 913-917. 1999.

SAZHENOVA, E.A.; LEBEDEV, N.I. Epimutations of the KCNQ1OT1 imprinting center of chromosome 11 in early human embryoletality. **Russian Journal of Genetics**. v.44, p.1394-1399. 2008.

SCHANEN, C., FRANCKE, U. A severely affected male born into a Rett syndrome kindred supports X-linked inheritance and allows extension of the exclusion map. **American Journal of Human Genetics**. v. 63, p. 267-269. 1998

SCOTT, R.J.; SPIELMAN, M. Genomic imprinting in plant and mammals: how life history constrains convergence. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 113, p. 53-67. 2006.

SHARP, A.J.; STATHAKI, E.; MIGLIAVACCA, E.; BRAHMACHARY, M.; MONTGOMERY, S.B.; DUPRE, Y.; ANTONAKARIS, S.E. DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. **Genome Research**. v. 21, p. 1592-1600. 2011.

SOOD, R.; ZEHNDER, J.L.; DRUZIN, M.L.; BROWN, P.O. Gene expression patterns in human placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 103, p. 5478-5483. 2006.

STRAHL, B.D.; ALLIS, C.D. The language of covalent histone modifications. **Nature**. v. 403, p. 41-45. 2000.

SURANI, M.A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. **Cell**. v. 93, p. 309-312. 1998.

SURANI, M. A.; BARTON, S.C.; NORRIS, M.L. Development of reconstituted mouse eggs suggest imprinting of the genome during gametogenesis. **Nature**. v. 308, p. 548-550. 1984.

TABANO, S.; COLAPIETRO, P.; CETIN, I.; GRATI, F. R.; ZANNUTO, S.; MANDÒ, C.; ANTONAZZO, P.; PILERI, P.; ROSSELA, F.; LARIZZA, L.; SIRCHIA, S. M.; MIOZZO, M. Epigenetic modulation of the IGF2/H19 imprinted domain in human embryonic and extra-embryonic compartments and its possible role in fetal growth restriction. **Epigenetics**. v. 5; p. 313-324. 2010.

TESHIMA, L.E.; KALOUSEK, D.K.; VEKEMANS, M.J.J.; MARKOVIC, V.; COX, D.M.; DALLIARE, L.; GAGNE, LIN, C.C.; RAY, M.; SERGOVICH, F.R.; UCHIDA, I.A.; WANG, H; TOMKINS, D.J. Chromosome mosaicism in CVS and amniocentesis samples. **Prenatal Diagnosis**. v. 12, p. 443–446. 1992.

UEHARA, S.; TAMURA, M.; NATA, M.; JI, G.; YAEGASHI, N.; OKAMURA, K.; YAJIMA, A. X-chromosome inactivation in the human trophoblast of early pregnancy. **Journal of Human Genetics**. v. 119, p. 119-126. 2000.

VAN DEN VEYVER, I.B. Skewed X inactivation in X-linked disorders. **Seminal of Reproduction Medicine**. v.19, p. 183-191. 2001.

WADDINGTON, C.H. The epigenotype. **Endeavour**. v. 1, p. 18-20. 1942.

WAGSCHAL, A.; FEIL, R. Genomic imprinting in the placenta. **Cytogenetic and Genome Research**. v.113, p.90–98. 2006.

WEAVER, J.R.; SUSIARJO, M.; BARTOLOMEI, M. S. Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. **Mammalian Genome**. v. 20, p. 532-543. 2009.

WEBER, M.; HELLMANN, I.; STADLER, M.B.; RAMOS, L.; PAABO, S.; REBHAN, M.; SCHUBELER, D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. **Nature Genetics**. v. 39, p. 457– 466. 2007.

WEKSBERG, R.; SHUMAN, C.; SMITH, A.C. Beckwith-Wiedemann syndrome. **American Journal of Medical Genetic Part C (Semin Med Genet)**. v.137, p.12-23. 2005.

WINN, VD; GORMLEY, M.; PAQUET, A.C.; KJAER-SORENSEN, K.; KRAMER, A.; RUMER, K. K.; HAIMOV-KOCHMAN, R.; YEH, R.; OVERGAARD, M.T.; VARKI, A.; OXVIG, C.; FISHER, S. J. Severe preeclampsia-related changes in gene expression at the maternal-fetal interface include sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-6 and pappalysin-2. **Endocrinology**. v.150, p. 452–462. 2009.

WOODFINE, K.; HUDDLESTON, J.E.; MURRELL, A. Quantitative analysis of DNA methylation at all human imprinted regions reveals preservation of epigenetic stability in adult somatic tissue. **Epigenetics Chromatin**. 4:1. 2011.

WUTZ, A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. **Nature Reviews in Genetics**. v. 12, p. 542-553. 2011.

WYATT, S.M.; KRAUS, F.T.; ROH, C.R.; ELCHALAL, U.; NELSON, D.M.; SADOSKY, Y. The correlation between sample site and gene expression in the term human placenta. **Placenta**. v. 26, p. 372-379. 2005.

XU, F.; MAO, C.; DING, Y.; RUI, C.; WU, L.; SHI, A.; ZHANG, H.; XU, Z. Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. **Current Medical Chemistry**. v. 17, p. 4052-4072. 2010.

YU, L.; CHEN, M.; ZHAO, D.; YI, P.; LU, L.; HAN, J.; ZHENG, X.; ZHOU, Y.; LI, L. The *H19* gene imprinting in normal pregnancy and pre-eclampsia. **Placenta**. v. 30, p. 443-447. 2009.

YUEN, R.; ROBINSON, W. G. Review: a high capacity of the human placenta for genetic and epigenetic variation: implications for assessing pregnancy outcome. **Placenta**. v. 32, p. s136-s141. 2011.

ZENG, S.-M.; YANKOWITZ, J. X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. **Placenta**. v. 24, p. 270-275. 2003.

ZHOU, Y.; GENBACEV, O.; DAMSKY, C. H.; FISHER, S. J. Oxygen regulates human cytotrophoblast differentiation and invasion in normal pregnancy and in pre-eclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**. v.39, p. 197–213. 1998.

APÊNDICES

Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da Pesquisa

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRI
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA

1. NOME DA PESQUISA: "Estudo da influência da região 11p15.5 na pré-eclâmpsia"
2. PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Ester S. Ramos (CRM - 57.626)
3. PROMOTOR DA PESQUISA: Hospital das Clínicas da FMRP-USP
4. ESCLARECIMENTOS: Algumas mulheres após a 20ª semana de gravidez apresentam pressão alta e perda de proteínas na urina, o que é chamado de pré-eclâmpsia. Se a paciente não tiver os cuidados médicos necessários, o problema pode se agravar e prejudicar a saúde da mãe e do bebê. Uma das causas pode ser genética (ou de família) podendo repetir em parentes. Nesta pesquisa, através dos resultados de algumas perguntas sobre sua família e alguns exames, poderá ser dada depois uma melhor orientação para você e seus parentes. O estudo não trará nenhuma despesa para você. Você pode auxiliar neste trabalho através de um pouco de sangue e com um pouco de urina (colhidos como qualquer exame de rotina). Em casos especiais, também com um pedacinho da placenta depois que ela estiver fora do útero e não tiver mais contato com o nenê. Todo esse material será usado para estudar a sua constituição genética através do DNA (mas não será utilizado para outros fins sem um novo consentimento).

Ribeirão Preto, ____ de ____ de ____.

Ester Silveira Ramos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____ RG nº _____, abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições do Projeto de Pesquisa intitulado "ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA REGIÃO 11p15.5 NA PRÉ-ECLÂMPsia" que tem como pesquisadoras responsáveis a Sra. Francielle Marques Araujo e a Profa. Dra. Ester Silveira Ramos, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido.
 2. A liberdade de retirar o meu consentimento e de deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.
 3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade.
 4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.
 5. O compromisso de que serei devidamente acompanhado(a) e assistido(a) durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.
- Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de ____ de ____

Assinatura do paciente

Apêndice B: Questionário

DATA: __/__/__ I.G. : _____

Local do pré-natal: _____

Local do parto: _____

1) Identificação da paciente

1.1) Registro: _____

1.2) Nome: _____

1.3) Idade: _____ 1.4) Cor/Desc.: _____ 1.5) Estado civil: _____

1.6) Endereço: _____

1.7) Bairro/Cidade: _____ 1.8) Fone: _____

2) Patologias associadas:

2.1) Fuma: _____ Sim _____ Não, o quê: _____

Quantidade: _____ Traga: _____

3) Antecedentes obstétricos

3.1) GPA (C): _____ 3.2) IG: _____

3.3) Alterações fetais pregressas: _____

4) Gestação atual

4.1) Alterações no Ultra-som: _____

4.2) Alguma patologia durante a gestação ou perinatal: _____

5) Recém nascido

5.1) RN vivo: _____ 5.2) Tipo de parto: _____

5.3) Indicação: _____ 5.4) Apgar: _____

5.5) Peso: _____ 5.6) Estatura: _____ 5.7) Temp.(° C): _____

5.8) Peso da placenta: _____ 5.9) Data Nasc: _____

6) Método Anticoncepcional: _____7) Mesmo parceiro: _____8) Proteinúria: _____ PA: _____

Heredograma

APÊNDICE C: Perfil de metilação da KvDMR1 e da H19DMR nos modelos com quadrantes, com posição e com tamanhos dos cotilédones.

```

/*****
*   POSICAO 1=PERIFÉRICO 2=CENTRAL   *
*                                     *
*   TAMANHO 1=GRANDE 2=PEQUENO      *
*****/

```

ANALISE DA METILAÇÃO DO KvDMR1
MODELO COM QUADRANTE

The GLM Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
PLACA	4	1641 1646 1653 1654
QUADRANTE	4	1 2 3 4

Number of Observations Read	44
Number of Observations Used	44

Dependent Variable: Metil_KvDMR1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	0.03831490	0.00638582	2.15	0.0705
Error	37	0.10987374	0.00296956		
Corrected Total	43	0.14818864			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Metil_KvDMR1 Mean
0.258555	14.99513	0.054494	0.363409

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	3	0.02345793	0.00781931	2.63	0.0642NS
QUADRANTE	3	0.01723520	0.00574507	1.93	0.1409NS

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

	Metil_KvDMR1	Standard
QUADRANTE	LSMEAN	Error
1	0.33917241	0.01748909
2	0.37166667	0.01573097
3	0.34948636	0.01584684
4	0.39291596	0.01731282

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of QUADRANTE
LS-means with the same letter are not significantly different.

	Metil_Kv	LSMEAN	Number
DMR1	LSMEAN	QUADRANTE	
A	0.39291596	4	4
A	0.37166667	2	2
A	0.34948636	3	3
A	0.33917241	1	1

ANALISE DA METILAÇÃO DO H19DMR

MODELO COM QUADRANTE

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
PLACA	4	1641 1646 1653 1654
QUADRANTE	4	1 2 3 4

Number of Observations Read	45
Number of Observations Used	45

Dependent Variable: Metil_H19DMR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	0.22268247	0.03711374	3.20	0.0121
Error	38	0.44044198	0.01159058		
Corrected Total	44	0.66312444			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Metil_H19DMR Mean
0.335808	29.32615	0.107660	0.367111

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	3	0.05662908	0.01887636	1.63	0.1988NS
QUADRANTE	3	0.14253999	0.04751333	4.10	0.0129*

The GLM Procedure

Least Squares Means

Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

	Metil_H19DMR	Standard Error
QUADRANTE	LSMEAN	
1	0.39670310	0.03454663
2	0.40916667	0.03107863
3	0.27425337	0.03130742
4	0.39929386	0.03255653

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of QUADRANTE

LS-means with the same letter are not significantly different.

	Metil_H19DMR	LSMEAN	QUADRANTE	Number
LSMEAN				
A	0.40916667	2	2	
A	0.39929386	4	4	
A	0.39670310	1	1	
B	0.27425337	3	3	

ANALISE DA METILAÇÃO DO KvDMR1 MODELO COM POSICAO

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
-------	--------	--------

PLACA 4 1641 1646 1653 1654
 POSICAO 2 1 2

Number of Observations Read 44
 Number of Observations Used 44

The GLM Procedure
 Dependent Variable: Metil_KvDMR1
 Sum of

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.02172288	0.00543072	1.67	0.1754
Error	39	0.12646576	0.00324271		
Corrected Total	43	0.14818864			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Metil_KvDMR1 Mean
0.146589	15.66962	0.056945	0.363409

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	3	0.02092134	0.00697378	2.15	0.1094NS
POSICAO	1	0.00064318	0.00064318	0.20	0.6585NS

The GLM Procedure
 Least Squares Means
 Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

Metil_KvDMR1		H0:LSMean1=		
POSICAO	LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0	LSMean2
1	0.36075720	0.01026789	Pr > t	Pr > t
2	0.36917482	0.01583537	<.0001	0.6585

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of POSICAO

LS-means with the same letter are not significantly different.

Metil_Kv	LSMEAN	POSICAO	Number
A	0.36917482	2	2
A	0.36075720	1	1

ANALISE DA METILAÇÃO DO H19DMR MODELO COM POSICAO

The GLM Procedure
 Class Level Information

Class	Levels	Values
PLACA	4	1641 1646 1653 1654
POSICAO	2	1 2

Number of Observations Read 45
 Number of Observations Used 45

The GLM Procedure

Dependent Variable: Metil_H19DMR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.08023414	0.02005854	1.38	0.2593
Error	40	0.58289030	0.01457226		
Corrected Total	44	0.66312444			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Metil_H19DMR Mean
----------	-----------	----------	-------------------

0.120994	32.88258	0.120716	0.367111
----------	----------	----------	----------

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	3	0.07997030	0.02665677	1.83	0.1573
POSICAO	1	0.00009167	0.00009167	0.01	0.9372

The GLM Procedure

Least Squares Means

Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

H0:LSMean1=			
	Metil_H19DMR	LSMean2	
POSICAO	LSMEAN	Pr > t	
1	0.36904476	0.9372	
2	0.36594858		

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of POSICAO

LS-means with the same letter are not significantly different.

	Metil_H19DMR	LSMEAN	
	LSMEAN	POSICAO	Number
A	0.36904476	1	1
A	0.36594858	2	2

ANALISE DA METILAÇÃO DO KvDMR1
MODELO COM TAMANHO

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
PLACA	4	1641 1646 1653 1654
TAMANHO	2	1 2

Number of Observations Read	44
Number of Observations Used	44

The GLM Procedure

Dependent Variable: Metil_KvDMR1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.02487482	0.00621871	1.97	0.1187
Error	39	0.12331381	0.00316189		
Corrected Total	43	0.14818864			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Metil_KvDMR1 Mean
----------	-----------	----------	-------------------

0.167859	15.47312	0.056231	0.363409
----------	----------	----------	----------

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	3	0.02247452	0.00749151	2.37	0.0854NS
TAMANHO	1	0.00379513	0.00379513	1.20	0.2800NS

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

		H0:LSMean1=			
		Metil_KvDMR1	Standard	H0:LSMEAN=0	LSMean2
		TAMANHO	LSMEAN	Error	Pr > t
1	0.37350100	0.01263509	<.0001	0.2800	
2	0.35456983	0.01161848	<.0001		

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of TAMANHO

LS-means with the same letter are not significantly different.

		Metil_Kv	LSMEAN		
		DMR1	LSMEAN	TAMANHO	Number
A	0.37350100	1	1		
A	0.35456983	2	2		

ANALISE DA METILAÇÃO DO H19DMR MODELO COM TAMANHO

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
PLACA	4	1641 1646 1653 1654
TAMANHO	2	1 2

Number of Observations Read	44
Number of Observations Used	44

The GLM Procedure

Dependent Variable: Metil_H19DMR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.12985714	0.03246429	2.99	0.0304
Error	39	0.42383376	0.01086753		

Corrected Total 43 0.55369091

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Metil_H19DMR Mean
0.234530	27.83306	0.104247	0.374545

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	3	0.09024672	0.03008224	2.77	0.0545
TAMANHO	1	0.03961043	0.03961043	3.64	0.0636

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	3	0.08906097	0.02968699	2.73	0.0568
TAMANHO	1	0.03961043	0.03961043	3.64	0.0636

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

H0:LSMean1=					
	Metil_H19DMR	Standard	H0:LSMEAN=0	LSMean2	
TAMANHO	LSMEAN	Error	Pr > t	Pr > t	
1	0.41153585	0.02395941	<.0001	0.0636	
2	0.35040912	0.02114722	<.0001		

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of TAMANHO

LS-means with the same letter are not significantly different.

Metil_				
	H19DMR	LSMEAN		
	LSMEAN	TAMANHO	Number	
A	0.41153585	1	1	
A	0.35040912	2	2	

APÊNDICE D: Perfil de metilação da KvDMR1 e da H19DMR entre embrião, cordão umbilical, vilosidade coriônica e âmnion.

ANALISE - COMPARAÇÃO METILAÇÃO KvDMR1 NOS TECIDOS
TESTE t PAREADO - Embriao_KvDMR1 VS Cordao_KvDMR1

The TTEST Procedure

Difference: Embriao_KvDMR1 - Cordao_KvDMR1

N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
7	0.0571	0.4390	0.1659	-0.6800	0.5900

Mean	95% CL Mean	Std Dev	95% CL Std Dev
0.0571	-0.3489 0.4632	0.4390	0.2829 0.9667

DF	t Value	Pr > t
6	0.34	0.7423

ANALISE - COMPARAÇÃO METILAÇÃO KvDMR1 NOS TECIDOS
TESTE t PAREADO - Embriao_KvDMR1 VS Vilosidade_KvDMR1

The TTEST Procedure

Difference: Embriao_KvDMR1 - Vilosidade_KvDMR1

N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
8	0.0125	0.3017	0.1066	-0.4000	0.4500

Mean	95% CL Mean	Std Dev	95% CL Std Dev
0.0125	-0.2397 0.2647	0.3017	0.1994 0.6139

DF	t Value	Pr > t
7	0.12	0.9100

ANALISE - COMPARAÇÃO METILAÇÃO KvDMR1 NOS TECIDOS
TESTE t PAREADO - Embriao_KvDMR1 VS Amnion_KvDMR1

The TTEST Procedure

Difference: Embriao_KvDMR1 - Amnion_KvDMR1

N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
3	0.0633	0.2421	0.1398	-0.1100	0.3400

Mean	95% CL Mean	Std Dev	95% CL Std Dev
0.0633	-0.5382 0.6649	0.2421	0.1261 1.5218

DF	t Value	Pr > t
2	0.45	0.6949

ANALISE - COMPARAÇÃO METILAÇÃO KvDMR1 NOS TECIDOS
TESTE t PAREADO - Embriao_H19DMR VS Cordao_H19DMR

The TTEST Procedure

Difference: Embriao_H19DMR - Cordao_H19DMR

N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
5	0.1260	0.2790	0.1248	-0.2300	0.5000

Mean	95% CL Mean	Std Dev	95% CL Std Dev
0.1260	-0.2204 0.4724	0.2790	0.1671 0.8017

DF	t Value	Pr > t
4	1.01	0.3697

ANALISE - COMPARAÇÃO METILAÇÃO KvDMR1 NOS TECIDOS
TESTE t PAREADO - Embriao_H19DMR VS Vilosidade_H19DMR

The TTEST Procedure

Difference: Embriao_H19DMR - Vilosidade_H19DMR

N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
6	-0.0650	0.3142	0.1283	-0.6200	0.2800

Mean	95% CL Mean	Std Dev	95% CL Std Dev
-0.0650	-0.3947 0.2647	0.3142	0.1961 0.7706

DF	t Value	Pr > t
5	-0.51	0.6339

ANALISE - COMPARAÇÃO METILAÇÃO KvDMR1 NOS TECIDOS
TESTE t PAREADO - Embriao_H19DMR VS Amnion_H19DMR

The TTEST Procedure

Difference: Embriao_H19DMR - Amnion_H19DMR

N	Mean	Std Dev	Std Err	Minimum	Maximum
1	0.2200	.	0.2200	0.2200	

Mean	95% CL Mean	Std Dev	95% CL Std Dev
0.2200	.	.	.

DF	t Value	Pr > t
0	.	.

APÊNDICE E: Perfil de metilação da KvDMR1 e da H19DMR entre o primeiro e o terceiro trimestres gestacionais.

**ANALISE DA METILAÇÃO VILOSIDADE KvDMR1
COMPARACAO ENTRE TRIMESTRES 1 e 3**

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRIMESTRE	2	1 3

Number of Observations Read 20
Number of Observations Used 19
ANALISE DA METILAÇÃO VILOSIDADE KvDMR1

The GLM Procedure

Dependent Variable: Vilosidade_KvDMR1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.02752023	0.02752023	4.50	0.0489
Error	17	0.10399556	0.00611739		
Corrected Total	18	0.13151579			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Vilosidade_KvDMR1 Mean
0.209254	16.92552	0.078214	0.462105

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRIMESTRE	1	0.02752023	0.02752023	4.50	0.0489

The GLM Procedure
Least Squares Means

Vilosidade_KvDMR1	LSMEAN	Standard Error	H0:LSMean1=LSMean2 Pr > t
TRIMESTRE	LSMEAN	Error	
1	0.50222222	0.02607124	0.0489
3	0.42600000	0.02473335	

T Comparison Lines for Least Squares Means of TRIMESTRE
LS-means with the same letter are not significantly different.

Vilosidade_KvDMR1	LSMEAN	TRIMESTRE	Number
A	0.50222222	1	1
B	0.42600000	3	2

**ANALISE DA METILAÇÃO VILOSIDADE H19DMR
COMPARACAO ENTRE TRIMESTRES 1 e 3**

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
-------	--------	--------

TRIMESTRE 2 1 3

Number of Observations Read 20
Number of Observations Used 19

The GLM Procedure

Dependent Variable: Vilosidade_H19DMR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.00280474	0.00280474	0.17	0.6892
Error	17	0.28809000	0.01694647		
Corrected Total	18	0.29089474			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Vilosidade_H19DMR Mean
0.009642	36.10794	0.130179	0.360526

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRIMESTRE	1	0.00280474	0.00280474	0.17	0.6892

ANALISE DA METILAÇÃO VILOSIDADE KvDMR1

The GLM Procedure
Least Squares Means

Vilosidade_		H0:LSMean1=	
H19DMR	Standard	LSMean2	
TRIMESTRE	LSMEAN	Error	Pr > t
1	0.37333333	0.04339287	0.6892
3	0.34900000	0.04116609	

T Comparison Lines for Least Squares Means of TRIMESTRE

LS-means with the same letter are not significantly different.

Vilosidade_		LSMEAN	
H19DMR	LSMEAN	TRIMESTRE	Number
A	0.37333333	1	1
A	0.34900000	3	2

APÊNDICE F: Perfil de metilação do gene *AR* e do marcador ICX1 nos modelos com posição e com tamanhos dos cotilédones.

ANALISE DA METILAÇÃO DO AR_1 e AR_2
MODELO COM TAMANHO

The GLM Procedure

Class Level Information
 Class Levels Values
 PLACA 2 1646 1654
 TAMANHO 2 1 2

Number of Observations Read 23
 Number of Observations Used 23

The GLM Procedure

Dependent Variable: AR_1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	9474.93840	4737.46920	11.17	0.0006
Error	20	8482.24069	424.11203		
Corrected Total	22	17957.17909			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	AR_1 Mean
0.527641	41.38083	20.59398	49.76696

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	1	9383.940100	9383.940100	22.13	0.0001
TAMANHO	1	18.209564	18.209564	0.04	0.8379

The GLM Procedure

Dependent Variable: AR_2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	9470.13386	4735.06693	11.16	0.0006
Error	20	8482.87527	424.14376		
Corrected Total	22	17953.00913			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	AR_2 Mean
0.527496	41.00232	20.59475	50.22826

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	1	9379.486088	9379.486088	22.11	0.0001
TAMANHO	1	18.063787	18.063787	0.04	0.8386

ANALISE DA METILAÇÃO DO AR_1 e AR_2
MODELO COM TAMANHO

The GLM Procedure
 Least Squares Means
 Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

		H0:LSMean1=		
		Standard	LSMean2	
TAMANHO	AR_1 LSMEAN	Error		Pr > t

1	49.9980097	6.8813018	0.8379
2	48.1721429	5.5039728	

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of TAMANHO

LS-means with the same letter are not significantly different.

	AR_1	LSMEAN	
	LSMEAN	TAMANHO	Number
A	50.00146	1	1
A			
A	51.82000	2	2

		H0:LSMean1=	
	Standard	LSMean2	
TAMANHO	AR_2 LSMEAN	Error	Pr > t
1	50.0014563	6.8815592	0.8386
2	51.8200000	5.5041787	

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of TAMANHO

LS-means with the same letter are not significantly different.

	AR_2	LSMEAN	
	LSMEAN	TAMANHO	Number
A	51.82000	2	2
A			
A	50.00146	1	1

ANALISE DA METILAÇÃO DO AR_1 e AR_2

MODELO COM POSICAO

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
PLACA	2	1646 1654
POSICAO	2	1 2

Number of Observations Read	23
Number of Observations Used	23

The GLM Procedure

Dependent Variable: AR_1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	9708.61858	4854.30929	11.77	0.0004
Error	20	8248.56051	412.42803		
Corrected Total	22	17957.17909			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	AR_1 Mean
0.540654	40.80684	20.30832	49.76696

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	1	8938.744265	8938.744265	21.67	0.0002
POSICAO	1	251.889745	251.889745	0.61	0.4437

The GLM Procedure

Dependent Variable: AR_2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	9704.53996	4852.26998	11.77	0.0004
Error	20	8248.46917	412.42346		
Corrected Total	22	17953.00913			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	AR_2 Mean
0.540552	40.43184	20.30821	50.22826

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	1	8933.823520	8933.823520	21.66	0.0002
POSICAO	1	252.469882	252.469882	0.61	0.4431

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

		H0:LSMean1=		
		Standard	LSMean2	
POSICAO	AR_1 LSMEAN	Error		Pr > t
1	51.1081833	5.1050762		0.4437
2	43.8606477	7.7000390		

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of POSICAO

LS-means with the same letter are not significantly different.

		AR_1	LSMEAN	
		LSMEAN	POSICAO	Number
	A	48.88426	1	1
	A			
	A	56.14013	2	2

		H0:LSMean1=		
		Standard	LSMean2	
POSICAO	AR_2 LSMEAN	Error		Pr > t
1	48.8842575	5.1050479		0.4431
2	56.1401343	7.6999964		

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of POSICAO

LS-means with the same letter are not significantly different.

		AR_2	LSMEAN	
		LSMEAN	POSICAO	Number
	A	56.14013	2	2
	A			
	A	48.88426	1	1

ANALISE DA METILAÇÃO DO ICX1_1 ICX1_2
MODELO COM TAMANHO

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
PLACA	2	1646 1654
TAMANHO	2	1 2

Number of Observations Read 23
Number of Observations Used 23

The GLM Procedure

Dependent Variable: ICX1_1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	3049.998858	1524.999429	9.38	0.0013
Error	20	3252.462237	162.623112		
Corrected Total	22	6302.461096			

R-Square Coeff Var Root MSE ICX1_1 Mean
0.483938 34.69049 12.75238 36.76043

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	1	2991.078649	2991.078649	18.39	0.0004
TAMANHO	1	22.053509	22.053509	0.14	0.7166

The GLM Procedure

Dependent Variable: ICX1_2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	2999.224097	1499.612049	9.36	0.0013
Error	20	3203.335389	160.166769		
Corrected Total	22	6202.559487			

R-Square Coeff Var Root MSE ICX1_2 Mean
0.483546 20.03973 12.65570 63.15304

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	1	2945.300703	2945.300703	18.39	0.0004
TAMANHO	1	19.243274	19.243274	0.12	0.7325

The GLM Procedure

Least Squares Means

Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

H0:LSMean1=				
ICX1_1	Standard	LSMean2		
TAMANHO	LSMEAN	Error	Pr > t	
1	37.4865049	4.2610972	0.7166	
2	35.4771429	3.4082160		

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of TAMANHO

LS-means with the same letter are not significantly different.

		ICX1_1	LSMEAN	
		LSMEAN	TAMANHO	Number
	A	62.50374	1	1
	A			
	A	64.38071	2	2

		H0:LSMean1=		
	ICX1_2	Standard	LSMean2	
TAMANHO	LSMEAN	Error	Pr > t	
1	62.5037379	4.2287939	0.7325	
2	64.3807143	3.3823784		

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of TAMANHO

LS-means with the same letter are not significantly different.

		ICX1_2	LSMEAN	
		LSMEAN	TAMANHO	Number
	A	64.38071	2	2
	A			
	A	62.50374	1	1

ANALISE DA METILAÇÃO DO ICX1_1 ICX1_2 MODELO COM POSICAO

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
PLACA	2	1646 1654
POSICAO	2	1 2

Number of Observations Read	23
Number of Observations Used	23

Dependent Variable: ICX1_1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	3138.382446	1569.191223	9.92	0.0010
Error	20	3164.078650	158.203932		
Corrected Total	22	6302.461096			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ICX1_1 Mean
0.497961	34.21590	12.57791	36.76043

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	1	2841.955293	2841.955293	17.96	0.0004
POSICAO	1	110.437097	110.437097	0.70	0.4133

The GLM Procedure

Dependent Variable: ICX1_2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	3097.483698	1548.741849	9.98	0.0010
Error	20	3105.075789	155.253789		
Corrected Total	22	6202.559487			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ICX1_2 Mean
0.499388	19.72999	12.46009	63.15304

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLACA	1	2791.530448	2791.530448	17.98	0.0004
POSICAO	1	117.502875	117.502875	0.76	0.3946

Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

H0:LSMean1=			
ICX1_1	Standard	LSMean2	
POSICAO	LSMEAN	Error	Pr > t
1	37.7334913	3.1618173	0.4133
2	32.9345814	4.7690017	

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of POSICAO

LS-means with the same letter are not significantly different.

ICX1_1			
LSMEAN	POSICAO	Number	
A 62.12964	1	1	
A 67.07969	2	2	

H0:LSMean1=			
ICX1_2	Standard	LSMean2	
POSICAO	LSMEAN	Error	Pr > t
1	62.1296445	3.1321983	0.3946
2	67.0796919	4.7243270	

Tukey-Kramer Comparison Lines for Least Squares Means of POSICAO

LS-means with the same letter are not significantly different.

ICX1_2			
LSMEAN	POSICAO	Number	
A 67.07969	2	2	
A 62.12964	1	1	

ANEXOS

Anexo A: Aprovação do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 2066/2004

Registro CONEP: 10401 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE-0091.0.004.000-04

Processo nº 25060.080982/2004-11

Projeto de Pesquisa: "Estudo da Influência da Região 11p15.5 na Pré-Esclâmpica"

Pesquisador Responsável: Dra. Ester Silveira Ramos

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Área Temática Especial: Genética Humana e Reprodução Humana

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 1351/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que

a) foram atendidas as solicitações do referido parecer;

b) O projeto preenche os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Brasília 5 de Outubro de 2004

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS