UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência da idade gestacional no perfil
epigenético placentário**

Sarah Blima Paulino Leite

Ribeirão Preto
2012

Sarah Blima Paulino Leite

**Influência da idade gestacional no perfil epigenético
placentário**

Dissertação apresentada à 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
2012

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.

Leite, Sarah Blima Paulino.

Influência da idade gestacional no perfil epigenético placentário

99p. il.; 30 cm.

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

Orientadora: Ramos, Ester Silveira

1. *Imprinting* genômico; 2. Placenta; 3. Idade Gestacional; 4. Mosaicismo; 5. KvDMR1; 6. H19DMR

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sarah Blima Paulino Leite

Influência da idade gestacional no perfil epigenético placentário

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 este trabalho ao meu porto seguro,
minha família.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão desse trabalho se tornasse possível.

Ao meu amado Pai Celestial, por eu acreditar que nossa existência pressupõe uma outra infinitamente superior.

À minha orientadora Prof^a Dra. Ester Silveira Ramos pela oportunidade de trabalhar em seu grupo e pela orientação no desenvolvimento dessa dissertação.

À Prof^a Dra. Susana Marina Chuva de Sousa Lopes pela colaboração e envio de parte das amostras necessárias para a execução deste trabalho.

Aos médicos do Centro Obstétrico do HCFMRP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto), principalmente ao Dr. Conrado por sua disponibilidade e ajuda inestimável durante a coleta das amostras, bem como às pacientes que gentilmente aceitaram participar deste estudo.

Aos membros da banca examinadora que aceitaram participar dessa avaliação.

À minha querida família, meus pais Joaquim e Roselena, por todo o apoio, amor e carinho que foram imprescindíveis para que eu continuasse firme em meus objetivos. E as minhas amadas irmãs, Suzan e Stephanie, pelo amor incondicional e por essa linda amizade que nos une e que me mantém de pé mesmo quando os obstáculos parecem intransponíveis.

Ao meu namorado e amigo Henrique Diniz por seu amor e companheirismo, por sua presença e seu conforto nos momentos mais difíceis, assim como nos mais alegres. Seu sorriso me encoraja e torna meus dias muito mais felizes!

Aos meus queridos amigos Cristiana Furtado e Filipe Machado pelo auxílio no laboratório e pelas valiosas discussões que contribuíram bastante para este trabalho e para minha formação científica.

Às minhas queridas amigas Karina Salomão, Larissa Guimarães e Mariana Pedrosa que além de toda a ajuda no laboratório, dividiram comigo seus sonhos, somando a amizade e o carinho que tornaram minha estadia em Ribeirão Preto muito mais agradável e divertida.

À Hélida Magalhães pela ajuda no laboratório, principalmente nas reações de PCR em tempo real e pelos ensinamentos.

Ao Murilo Soares por sua constante disposição em me ajudar na coleta das amostras assim como sua amizade e seu bom humor que me renderam boas risadas durante as horas de espera nos corredores do Centro Obstétrico.

Aos amigos e colegas do bloco C, que ali estão e que ali já passaram, que me deram a maravilhosa oportunidade de conhecê-los e com eles desfrutar de vários

momentos agradáveis de descontração: Flávia Gaona, Lisandra Caetano, Paula Felício, Matheus Eiras, Adriana Renzi, Fernanda Elias, Jaqueline Oliveira, Rafaela Lemes, Vivian Cipriano, Anderson Mioranza, Alexandra Galvão, Juliana Dourado e Ciro Pereira.

Aos funcionários do Bloco C pela convivência e suporte sempre constantes durante estes anos: Marli, Reginaldo, Sílvio, Mara, Luciano, Cristiano, Luís e Paulo.

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

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

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.”
(Thomas Huxley)

RESUMO

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

O *imprinting* genômico, processo regulado epigeneticamente segundo o qual os genes se expressam de acordo com sua origem parental, está envolvido no crescimento e desenvolvimento placentário. Na região 11p15.5 encontram-se vários genes regulados por duas regiões controladoras de *imprinting* (ICR1 e ICR2), onde se encontram as regiões diferencialmente metiladas H19DMR e KvDMR1. Acredita-se que o padrão de *imprinting* seja dinamicamente regulado durante o desenvolvimento da placenta. Em humanos, há poucas informações sobre *imprinting* genômico e desenvolvimento placentário, principalmente para estágios precoces do desenvolvimento devido às dificuldades técnicas de obtenção dessas placentas. A descrição de mosaicismos do padrão de metilação restrito a placenta ou entre a placenta e o feto evidencia um perfil epigenético único deste órgão. A 5-hidroximetilação, a qual não tem um papel de silenciamento gênico, pode ser confundida com a metilação do DNA nas análises moleculares. O objetivo principal do presente estudo foi o de verificar a influência da idade gestacional (IG) no perfil de metilação do DNA das ICRs 1 e 2 em vilosidade coriônica, bem como a existência de mosaicismos do perfil de metilação intra-placentário. Neste trabalho também foi investigada a presença de hidroximetilação na KvDMR1. Foram coletadas amostras de tecido placentário, sendo 25 de vilosidades coriônicas (VC) (15 de 3º trimestre gestacional e 10 do 1º trimestre) e nove de cordão umbilical (UC) de 1º trimestre (pareadas com a VC). Quatro placentas de 3º trimestre foram analisadas em separado para o estudo de mosaicismos. O perfil de metilação do DNA das regiões foi verificado por PCR Específica para a Metilação (MS-PCR), Análise Combinada de Bissulfito e Restrição Enzimática (COBRA) e Método de Digestão Enzimática Sensível à Metilação Associada à PCR em Tempo Real (DESM-RT), além do ensaio para hidroximetilação na KvDMR1. Com os ensaios qualitativos (MS-PCR e COBRA) foi observado um perfil de metilação monoalélico, sendo que na H19DMR foi identificada a presença de CpGs diferentemente metilados. Para a H19DMR foram observadas médias de 0,43 de metilação em VC e 0,31 em UC de 1º trimestre, e de 0,41 em VC de 3º trimestre. Para a KvDMR1, foram encontradas médias de 0,47 em VC e 0,57 em UC de 1º trimestre, e de 0,41 em VC de 3º trimestre. A presença de hidroximetilação na KvDMR1 foi excluída. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias das diferentes IGs ou entre tecidos pelos testes *t* e *F* para ambas as regiões. Não foi observada correlação positiva no perfil de metilação para H19DMR e KvDMR1 entre os tecidos. Em relação ao mosaicismos, não houve diferenças significativas no perfil de metilação entre os diferentes cotilédones amostrados numa mesma placenta. Os resultados demonstram uma discordância entre tecido embrionário (UC) e extraembrionário (VC). Apesar de não serem observadas alterações significantes nos perfis de metilação da H19DMR e KvDMR1 em diferentes IGs, as informações apresentadas são importantes para as pesquisas sobre a dinâmica do fenômeno de *imprinting* genômico ao longo da gestação, para os estudos de mosaicismos intra-placentário bem como o perfil epigenético da placenta em relação a outros tecidos.

Palavras-chave: *Imprinting* genômico; Placenta; Idade gestacional; Mosaicismos; KvDMR1; H19DMR.

ABSTRACT

LEITE, S.B.P. **Influence of gestational age on placental epigenetic profile**. 2012. 99 f. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Genomic imprinting, an epigenetically regulated process by which genes are expressed accordingly to their parental origin, is involved in placental growth and development. In 11p15.5 region, there are many genes regulated by two Imprinting Control Regions (ICR1 and ICR2), in which are found two Differentially Methylated Regions, H19DMR and KvDMR1, respectively. Imprinting patterns seem to be adjusted during placenta development. In humans, there is little information on genomic imprinting and placental development, especially for early stages of development due to technical difficulties in obtaining these placentas. The description of mosaicism in methylation pattern restricted to placenta or between placenta and fetus shows a unique epigenetic profile of this organ. The 5-hidroxymethylation, which has no role in gene silencing, can be confused with DNA methylation in molecular analysis. The main aim of our study was to verify the influence of gestational age (GA) in DNA methylation profile of ICRs 1 and 2 in chorionic villi, as well as the existence of intra-placental methylation profile mosaicism. The presence of hydroximethylation in the KvDMR1 was also investigated. Samples were collected from placentas, 25 from chorionic villi (CV) (15 of the 3rd gestational trimester and 10 of the 1st trimester) and nine from umbilical cord (UC) in 1st trimester (paired with the CV samples). Four 3rd trimester placentas were separately analyzed for mosaicism. DNA methylation profile was verified by Methylation Specific PCR (MS-PCR), and Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) and Methylation-Sensitive Enzyme Digestion Method associated with Real-Time PCR (DESM-RT), in addition to hydroximethylation test in the KvDMR1 region. With qualitative assays (MS-PCR and COBRA), it was observed a monoallelic methylation pattern, and, only for the H19DMR, differently methylated CpGs were observed. For the H19DMR, we observed methylation means of 0.43 in CV and 0.31 in UC of 1st trimester, and 0.41 in CV of 3rd trimester. For KvDMR1, we observed means of 0.47 in CV and 0.57 in UC of 1st trimester, and 0.41 in CV of 3rd trimester. No hydroximethylation in the KvDMR1 was observed. There were no significant differences between the means of different GAs or between tissues by *F* and *t* tests for both regions. No positive correlation was found on methylation profile for H19DMR and KvDMR1 between tissues. In relation to mosaicism, there were no significant differences in methylation profile between different cotyledons sampled in the same placenta. The results showed a discrepancy between embryonic (UC) and extra-embryonic (CV) tissues. Although it was not observed significant changes in methylation profiles of H19DMR and KvDMR1 in different GAs, the presented results are important to research on dynamics of genomic imprinting phenomenon during pregnancy, studies of intra-placental mosaicism and placenta epigenetic profile in relation to other tissues.

Keywords: Genomic imprinting; Placenta; Gestational age; Mosaicism; KvDMR1; H19DMR

ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
5-mC	5-metilcitosina
5-hmC	5-hidroximetilcitosina
<i>CDKN1C</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i> (Inibidor de quinase dependente de ciclina)
CH ₃	Radical metil
COBRA	Análise Combinada de Bissulfito e Restrição Enzimática (do inglês, Combined Bisulfite Restriction Analysis)
CpG	Dinucleotídeo Citosina-fosfato-Guanina
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
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
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
<i>H19</i>	Gene supressor tumoral <i>H19</i>
H19DMR	<i>H19 differential methylated region</i> (região diferencialmente metilada do <i>H19</i> – ICR1)
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCl	Ácido Clorídrico
ICR	<i>Imprinting control region</i> (Região Controladora de <i>Imprinting</i>)
ICSI	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i> (Injeção intracitoplasmática de espermatozoide)
<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>
<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>)
LUMC	<i>Leiden University Medical Center</i>
M	Molar
MCI	Massa Celular Interna
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
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
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)
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
RCIU	Restrição de Crescimento Intrauterino
rpm	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RN	Recém-nascido
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SBW	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio

SRS	Síndrome de Silver-Russel
STB	Sinciciotrofoblasto
T4-BGT	T4 β -glucosiltransferase
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tris	Hidroximetil Aminometano
tRNA	RNA transportador
USP	Universidade de São Paulo
UTR	<i>Untranslated Region</i> (Região não-traduzida)
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação de um modelo proposto para a demetilação passiva do DNA mediado pelas enzimas Tet em mamíferos.....	25
Figura 2.	Representação esquemática da região cromossômica 11p15 em humanos.....	29
Figura 3.	Foto da face materna de uma placenta (Plc 13) mostrando o mapeamento de todos os cotilédones incluindo os utilizados para o estudo de mosacismo (números circundados).....	40
Figura 4.	Sítios de restrição para <i>Bst</i> UI no fragmento estudado.....	42
Figura 5.	Esquema representativo do protocolo experimental do kit comercial EpiMark™ 5-hmC and 5-mC Analysis (New England).....	46
Figura 6.	Fórmulas fornecidas junto com o kit comercial para quantificar a porcentagem do material: Hidroximetilado (A), metilado (B) e sem digestão (C).....	47
Figura 7.	Padrão de metilação da H19DMR pelo método COBRA em amostras de placentas.....	52
Figura 8.	Curva de amplificação em qPCR da região H19DMR para a amostra Plc 1.....	53
Figura 9.	Curva de amplificação em qPCR da região KvDMR1 para a amostra E4.....	57
Figura 10.	Padrão de metilação da KvDMR pelo método MS-PCR em placentas de 3º trimestre.....	59
Figura 11.	Comparação das curvas de amplificação em qPCR para a KvDMR1 obtidas pelo ensaio DESM-RT (A e C) e pelo <i>kit</i> comercial EpiMark™ 5-hmC and 5-mC Analysis (B e D).....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados gerais das pacientes brasileiras, doadoras de amostras de placenta de 3º trimestre.....	38
Tabela 2.	Quantificação da metilação da H19DMR em amostras de vilosidade coriônica e cordão umbilical referente ao 1º trimestre gestacional.....	50
Tabela 3.	Quantificação da metilação na H19DMR em amostras de 3º trimestre gestacional.....	54
Tabela 4.	Quantificação da metilação na H19DMR em cotilédones placentários de amostras de 3º trimestre gestacional.....	55
Tabela 5.	Quantificação da metilação da KvDMR1 em amostras de vilosidade coriônica e cordão umbilical referentes ao 1º trimestre gestacional.....	58
Tabela 6.	Comparação entre os resultados obtidos por DESM-RT e pelo <i>kit Epimark™ 5-hmC and 5-mC Analysis</i> . Avaliação da metilação nas amostras Plc 4 e Plc 11.....	60
Tabela 7.	Quantificação da metilação e hidroximetilação na KvDMR1 nas placentas de 3º trimestre com o <i>kit Epimark™ 5-hmC and 5-mC Analysis</i>	61
Tabela 8.	Quantificação da metilação na KvDMR1 em amostras de 3º trimestre gestacional.....	62
Tabela 9.	Quantificação da metilação na KvDMR1 em diferentes cotilédones placentários de uma mesma placenta de gestações de 3º trimestre.....	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Representação gráfica para a variação de metilação encontrada na H19DMR entre os cotilédones placentários para cada uma das placentas (Plc 12 – Plc 15).....	56
Gráfico 2.	Representação gráfica para a variação de metilação encontrada na H19DMR de acordo com a posição (central ou periférica) dos cotilédones placentários para cada uma das placentas (Plc 12 – Plc 15).....	56
Gráfico 3.	Representação gráfica para a variação de metilação encontrada na KvDMR1 entre os diferentes cotilédones placentários para cada uma das placentas (Plc 12 – Plc 15).....	63
Gráfico 4.	Representação gráfica para a variação de metilação encontrada na KvDMR1 de acordo com a posição (central ou periférica) dos cotilédones placentários para cada uma das placentas (Plc 12 – Plc 15).....	64

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	22
1.1.	Epigenética.....	22
1.2.	<i>Imprinting</i> genômico.....	26
1.3.	Desenvolvimento placentário.....	29
1.4.	<i>Imprinting</i> genômico e a placenta.....	31
2.	OBJETIVOS.....	35
2.1.	Geral.....	35
2.2.	Específicos.....	35
3.	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1.	Aspectos Éticos do Projeto.....	37
3.2.	Casuística.....	37
3.3.	Coleta de Tecido Placentário.....	38
3.3.1.	Mapeamento dos cotilédones.....	39
3.4.	Extração do DNA.....	40
3.5.	Ensaio Qualitativos.....	41
3.5.1.	Análise Combinada de Bissulfito e Restrição Enzimática (COBRA).....	42
3.5.2.	PCR metilação-específica (MS-PCR).....	43
3.6.	Ensaio Quantitativos.....	44
3.6.1.	Método de Digestão Enzimática Sensível à Metilação Associada à PCR em Tempo Real (DESM-RT).....	44
3.6.2.	Ensaio de Hidroximetilação.....	45
3.7	Análise Estatística.....	47
4.	RESULTADOS.....	50
4.1.	Análise do Perfil de Metilação da H19DMR.....	50
4.1.1.	Amostras de 1º trimestre gestacional.....	50
4.1.2.	Amostras de 3º trimestre gestacional.....	51
4.2.	Análise do Perfil de Metilação da KvDMR1.....	57
4.2.1.	Amostras de 1º trimestre gestacional.....	57
4.2.2.	Amostras de 3º trimestre gestacional.....	58
5.	DISCUSSÃO.....	66

6.	CONCLUSÕES.....	76
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
	APÊNDICES.....	87
	ANEXOS.....	90

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epigenética

Durante o desenvolvimento de um organismo, as células pluripotentes são submetidas a um processo altamente regulado de diferenciação que leva à formação de diferentes tipos celulares. No genoma humano, a expressão de um subconjunto de aproximadamente 30.000 genes, que são ativos em diferentes órgãos e tecidos, é resultado da regulação de diferentes mecanismos que atuam na ativação ou inibição de determinados genes ou domínios cromossômicos que podem ocasionar mudanças na estrutura da cromatina, sem haver necessariamente alterações na sequência do DNA (REIK, 2007).

O termo epigenética foi utilizado pela primeira vez por Conrad Waddington (1942) em estudos de desenvolvimento embrionário. Russo, Martuenssen e Riggs (1996) sugeriram que epigenética seria o estudo das alterações herdáveis mitótica e/ou meioticamente na função gênica que não podem ser explicadas por mudanças na sequência do DNA. Porém, sobre esta definição, Bird (2007) discutiu o aspecto restritivo desta visão de herdável e redefiniu epigenética como sendo “a adaptação estrutural de regiões cromossômicas para registrar, sinalizar ou perpetuar estados de atividade”. Esta definição foca não somente no gene, mas também nos cromossomos sem considerar, no entanto, o conceito de herdabilidade.

O epigenoma compreende o conjunto das modificações epigenéticas que é característico para cada tipo celular. As marcas epigenéticas fornecem mecanismos à diferenciação, por meio da regulação da acessibilidade da informação genética para a maquinaria celular, além de promover o silenciamento de elementos repetitivos, inibindo sua replicação e transposição dentro do genoma. Estas modificações incluem três mecanismos principais: metilação do DNA, modificação de histonas e atuação de RNAs não codificadores (ncRNAs), sendo que a maioria dessas marcas é estabelecida durante a diferenciação e mantidas nas múltiplas divisões celulares (SHARMA et al., 2010).

As modificações de histonas são importantes mecanismos epigenéticos no controle da expressão gênica. A cauda N-terminal das histonas pode sofrer uma variedade de modificações covalentes pós-traducionais, incluindo: metilação, acetilação, ubiquitinação, fosforilação, sumoilação, desaminação, isomerização de prolina e ADP-ribosilação em resíduos específicos (KOUZARIDES, 2007).

Tais modificações podem criar, estabilizar, romper ou ocluir domínios de interação na cromatina para proteínas regulatórias, como fatores de transcrição, proteínas envolvidas na condensação da cromatina e reparo do DNA, e dessa forma também estão

envolvidas no remodelamento da estrutura dos cromossomos (HAKE et al., 2004; ROSA; CALDAS, 2005).

A grande complexidade de modificações, aliada à multiplicidade de combinações que podem ser geradas, constitui um verdadeiro “código de histona”, que pode ser lido e interpretado por diferentes fatores celulares. Assim, a presença de uma dada modificação pode facilitar ou impedir que uma segunda modificação aconteça e essa modificação pode induzir níveis distintos de organização da cromatina (KOUZARIDES, 2007).

Os ncRNAs estão envolvidos em vários processos epigenéticos de silenciamento gênico, podendo atuar isoladamente ou em associação com outros mecanismos epigenéticos, como as modificações de histonas e a metilação do DNA, desencadeando um silenciamento estável e herdável. O *imprinting* genômico e a inativação do cromossomo X são exemplos de vias biológicas em que os ncRNAs atuam no controle e regulação de determinados genes. (EGGER et al., 2004).

Até o momento, a metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais bem caracterizado e estudado por sua grande influência na regulação gênica, sendo um dos principais envolvidos na alteração da estrutura tridimensional da molécula de DNA (WAGGONER, 2007). A modificação covalente do DNA por meio da metilação ocorre pela adição do grupo metil (CH_3), que advém do doador S-adenosilmetionina ao carbono 5' da citosina, formando a 5-metilcitosina (5-mC). A metilação do DNA está envolvida em diversos processos de silenciamento gênico, como na inativação parcial de um dos cromossomos X nas mulheres, no *imprinting* genômico bem como no processo de carcinogênese (BAYLIN, 2005).

A metilação do DNA é catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). Em mamíferos, são encontradas três classes de DNMTs: DNMT1, DNMT2 e DNMT3. A DNMT1 é predominante e responsável pela restauração dos sítios hemi-metilados que ocorrem durante a replicação do DNA, copiando o padrão de metilação da fita original, processo conhecido como metilação de manutenção (HERMAN; BAYLIN, 2003). A DNMT2, diferentemente das demais metiltransferases, apresenta uma atividade metiltransferase de tRNA (BESTOR, 2000). DNMT3a e DNMT3b estão relacionadas à aquisição de novos sítios metilados (DNA não-metilado previamente). Enquanto isso, DNMT3L, apesar de não possuir atividade de metiltransferase, parece ter um importante papel regulatório na metilação do DNA (OKANO et al., 1999; BOURC'HIS et al., 2001).

Em humanos e outros mamíferos, a reação de metilação ocorre predominantemente nas citosinas adjacentes a uma guanina (no contexto 5'CG3'), também conhecido como dinucleotídeos CpGs (Citosina-fosfato-Guanina) (BIRD, 2002; HERMAN; BAYLIN, 2003). Em células somáticas, a 5-mC corresponde a

aproximadamente 1% do total de bases do DNA e está presente quase que exclusivamente em dinucleotídeos CpGs, enquanto que em células-tronco embrionárias uma quantidade substancial de 5-mC também é observada fora do contexto CpG (RAMSAHOYE et al., 2000).

Os dinucleotídeos são encontrados em maiores concentrações nas ilhas CpG, as quais estão geralmente presentes na região 5'UTR (do inglês, *Untranslated region*) dos genes, especialmente no promotor e no primeiro exon. As ilhas são regiões com cerca de 1 kb de tamanho, que ocorrem em média a cada 100 kb e possuem frequência de dinucleotídeos CpGs aproximadamente 10 vezes maior que o restante do genoma. Estas possuem uma razão de CpG para GpC de pelo menos 60% e ocorrem em mais da metade dos genes em humanos (ROBERTSON; JONES, 2000; BIRD, 2002; DAS; SINGAL, 2004).

A metilação da citosina pode afetar a expressão dos genes por impedir estericamente a ligação de fatores de transcrição a seus sítios de reconhecimento presentes na região reguladora de seus respectivos genes (SINGAL; GINDER, 1999). Os padrões de metilação mudam dinamicamente durante a embriogênese inicial, quando a metilação dos dinucleotídeos CpGs é essencial para a inativação do cromossomo X e a expressão assimétrica dos genes marcados (*imprinted*) (REIK, 2007).

Aliadas a estas variações, novas descobertas no campo da epigenética incluem a presença da base 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) em células-tronco embrionárias, células de Purkinje do cérebro e outros tecidos adultos de camundongo (KRIAUCIONIS; HEINTZ, 2009; TAHILIANI et al., 2009). Enquanto os níveis de 5-mC são relativamente constantes, os de 5-hmC variam significativamente entre os tecidos, com altos níveis relatados para tipos celulares específicos no cérebro (KRIAUCIONIS; HEINTZ, 2009) e em células embrionárias que vão diminuindo ao longo da diferenciação (TAHILIANI et al., 2009).

A base 5-hmC é gerada pela oxidação de 5-metilcitosina (5-mC) pelas proteínas TET (Figura 1). As enzimas TET1 e TET2 são altamente expressas em células embrionárias e regulam a expressão de genes envolvidos com a pluripotência e com o potencial de diferenciação das linhagens embrionária e extraembrionária (ITO et al., 2010; WALTER, 2011). Essas proteínas possuem expressão diferencial em tecidos específicos, sendo que TET1 é expressa principalmente em células-tronco embrionárias, enquanto TET2 e TET3 são expressas de forma ubíqua (TAHILIANI et al., 2009).

Figura 1. Representação de um modelo proposto para a demetilação passiva do DNA mediado pelas enzimas Tet em mamíferos. A metilação do DNA (5-mC) é estabelecida e mantida por DNA metiltransferases (Dnmt). A 5-mC pode ser hidroxilada por enzimas da família Tet para gerar a 5-hmC. Esta, por sua vez, é fracamente reconhecida pela Dnmt1 e durante replicações celulares sucessivas os sítios que eram metilados serão passivamente demetilados (Adaptado de Wu e Zhang, 2011).

Apesar de possuírem poucas diferenças químicas, há indicações que tais bases possuem funções biológicas distintas. A 5-hmC também é descrita como participante na regulação epigenética e seria uma das moléculas-chave envolvidas no processo de demetilação do DNA (HUANG et al., 2010).

A substituição de 5-mC por 5-hmC pode interferir com a manutenção da metilação catalisada pela enzima DNMT1 durante a divisão celular resultando numa demetilação passiva do DNA; assim como a 5-hmC também pode ser reconhecida como uma base aberrante pelo mecanismo de reparo do DNA substituindo-a por uma citosina, num processo equivalente à demetilação ativa (VALINLUCK; SOWERS, 2007; HUANG et al., 2010; NOMURA et al., 2011).

Outro modelo sugere que a 5-hmC teria um efeito direto no recrutamento ou deslocamento de proteínas ligantes do DNA por alterar o ambiente naquela região da cromatina. Este modelo é apoiado por estudos que verificaram que a maior parte das proteínas ligantes à 5-mC não reconhecem a 5-hmC e, portanto, dissociam-se do DNA quando a 5-mC é convertida em 5-hmC (VALINLUCK et al., 2004; JIN; KADAM; PFEIFER, 2010; WILLIAMS; CHRISTENSEN; HELIN, 2011).

Entretanto, a existência da 5-hmC coloca em discussão o método mais amplamente utilizado para mapear a 5-mC no genoma total ou em locos específicos, o tratamento com bissulfito de sódio seguido pela amplificação por PCR (do inglês, *Polymerase chain reaction*) e sequenciamento. A modificação do DNA pelo bissulfito de sódio acontece por deaminação de citosinas não-metiladas a uracilas que serão lidas como timinas após a amplificação por PCR. Porém, na presença de 5-hmC, o tratamento com bissulfito de sódio não é capaz de deaminar a citosina, implicando numa proporção de locos genômicos identificados como metilados que podem, na realidade, estarem hidroximetilados (HUANG et al., 2010).

1.2. Imprinting Genômico

Em mamíferos, os genes que sofrem *imprinting* (marcação) genômico tem um importante papel no desenvolvimento feto-placentário. Eles afetam o crescimento, morfologia e a capacidade de transferência de nutrientes e, portanto, controlam o crescimento do feto. O *imprinting* genômico é o processo epigenético no qual somente um dos alelos de um determinado loco será expresso de acordo com sua origem parental. Isto ocorre principalmente pela ação alelo-específica de ncRNAs, modificações de histonas e/ou metilação de citosinas em áreas do DNA com alta densidade de dinucleotídeos CpGs, conhecidas como regiões controladoras de *imprinting* (ICR, do inglês, *imprinting control region*) (FOWDEN et al., 2006, FOWDEN et al., 2010).

Estas marcas de *imprinting* são estabelecidas na linhagem germinativa e são propagadas de forma estável por vários ciclos de replicação do DNA durante o desenvolvimento. Esse fenômeno interfere na expressão do alelo por alterar direta ou indiretamente a estrutura da cromatina nessas regiões. Dessa forma, os genes marcados são expressos seletivamente, maternal ou paternalmente, e, como consequência, são funcionalmente haploides, o que aumenta sua susceptibilidade a mutações e epimutações, mas por outro lado permite um controle mais estrigente da dosagem gênica para fatores regulatórios-chave do desenvolvimento e crescimento (FOWDEN et al., 2006; WAGSCHAL; FEIL, 2006; FROST; MOORE, 2010).

Os genes sob a influência do *imprinting* raramente são encontrados em regiões isoladas. Em torno de 80% dos casos, estão fisicamente ligados em um agrupamento (*cluster*) com outros genes marcados, o que deve refletir a regulação coordenada dos genes em um domínio cromossômico. As ICRs são diferencialmente metiladas, recebendo também a denominação de Regiões Diferencialmente Metiladas (DMR, do inglês, *Differentially Methylated Regions*) devido à presença da metilação do DNA em apenas um dos alelos parentais. As ICRs são necessárias para o controle e expressão dos genes marcados e a sua existência sugere que o controle primário do *imprinting* não é realizado em um único gene, mas em nível cromossômico (MOORE, 2001; REIK; DEAN; WALTER, 2001; NELISSEN et al., 2011).

O status de metilação de uma única DMR pode regular a expressão de vários genes marcados dentro de um *cluster* e, uma vez que é estabelecido, torna-se potencialmente capaz de resistir aos eventos de reprogramação do genoma total durante o período pré-implantação e, após a fertilização, durante a diferenciação dos tecidos (WOODFINE; HUDDLESTON; MURREL, 2011).

As DMRs podem ser classificadas em somáticas ou germinativas. As germinativas são locos que exibem diferenças no estado de metilação entre o oócito e o espermatozoide, e são mantidas pós-fertilização. Já as DMRs somáticas adquirem seu padrão de metilação após a fertilização. Além disto, as DMRs são de origem parental-específica, ou seja, paternal ou maternalmente metiladas (WOODFINE; HUDDLESTON; MURREL, 2011).

Alguns estudos demonstraram que as DMRs somáticas são mais variáveis em seus níveis de metilação tecido-específica enquanto as DMRs germinativas são particularmente mais estáveis com pouca perda ou ganho de metilação tecido-específica. Foi visto também que a metilação em CpGs individuais é mais variável dentro das DMRs metiladas paternalmente do que em DMRs maternas que por sua vez, apresentam níveis mais homogêneos de metilação para todos as CpGs (FROST et al., 2010; WOODFINE; HUDDLESTON; MURREL, 2011).

Os promotores de genes e as ilhas CpGs associadas com regiões regulatórias possuem diferentes densidades de dinucleotídeos CpG metilados que sofrem mudanças dinâmicas ao longo da diferenciação podendo variar entre os tecidos normais (MOHN; SCHUBELER, 2009).

A importância no desenvolvimento de doenças do *imprinting* genômico em humanos pode ser demonstrada pelas síndromes de Beckwith-Wiedemann (SBW) e de Silver-Russell (SRS) associadas ao crescimento e que resultam da expressão anômala de certos genes presentes na região 11p15 na qual estão localizadas as ICR1 e ICR2 (FROST; MOORE, 2010).

Mutações e epimutações em genes marcados, como as que ocorrem na região 11p15, têm sido associadas a outras doenças que acarretam alterações no desenvolvimento da placenta e do feto, como a Restrição de Crescimento Intrauterino (RCIU) ou a crianças consideradas Pequenas para a Idade Gestacional (PIG), especialmente quando o peso placentário está abaixo da média (MCMINN et al., 2006; GUO et al., 2008; DIPLAS et al., 2009; FOWDEN et al., 2010).

A ICR1 também denominada H19DMR é um domínio responsável pelo controle em *cis* dos genes *IGF2/H19*. O gene *IGF2* (do inglês, *Insulin-like Growth Factor 2*), que produz um fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2, é expresso paternalmente em grande parte dos tecidos fetais, com exceção do cérebro no qual sua expressão será bialélica por toda a vida. Esse gene tem um importante papel na diferenciação celular, no crescimento fetal e desenvolvimento da placenta. Já o gene *H19* codifica uma molécula de ncRNA e é expresso maternalmente. Alguns autores acreditam que este gene teria uma ação supressora tumoral (MOORE, 2001; IDERAABDULLAH; VIGNEAU; BARTOLOMEI, 2008).

A expressão dos genes regulados pela H19DMR depende do estado de metilação alelo-específico dessa região. No cromossomo materno, este domínio não está metilado e permite a ligação de uma proteína insuladora: a CTCF (Fator de ligação CCCTC). O complexo formado impede a ação de *enhancers* que estão posicionados *downstream* ao gene *H19* de atuar sobre o promotor de *IGF2*. Dessa forma, não ocorre a transcrição de *IGF2* enquanto o gene *H19* é expresso. No cromossomo paterno, a H19DMR está metilada e não há possibilidade de ligação da proteína CTCF, permitindo a ação dos *enhancers* sobre o promotor de *IGF2*, inibindo a transcrição de *H19* (Figura 2) (EDWARDS; FERGUNSON-SMITH, 2007; IDERAABDULLAH; VIGNEAU; BARTOLOMEI, 2008).

Em contraste, o outro domínio de *imprinting* da região 11p15 (ICR2) é um longo agrupamento de genes que são regulados pela KvDMR1, matematicamente metilada, situada no íntron 10 do gene *KCNQ1* (do inglês, *Potassium channel, voltage-gated, kqt-like subfamily, member 1*). O gene *KCNQ1*, também conhecido como *KvLQT1* (do inglês, *Potassium Voltage-Gated Channel*), codifica um canal de potássio e é expresso a partir do alelo materno (LEE et al., 1999; TILGHMAN et al. 2006).

Nessa região encontra-se também o promotor do gene *KCNQ1OT1* (ou *LIT1*, *Long intronic transcript 1*) que se sobrepõe à sequência do gene *KCNQ1*, mas como um transcrito *antisense* (BEATTY; WEKSBERG; SADOWSKI, 2006). Ao lado do *KCNQ1* muitos outros genes do domínio apresentam silenciamento paterno sendo um deles o *CDKN1C* (*cyclin-dependent kinase inhibitor*), também chamado de *P57kip21* (FITZPATRICK et al., 2007).

A metilação materna da KvDMR1 impede a expressão do gene *LIT1*, permitindo que os genes *CDKN1C* e *KCNQ1* sejam matematicamente expressos. Já no cromossomo paterno, a KvDMR1 não está metilada promovendo a expressão deste transcrito em detrimento do silenciamento de *CDKN1C* e *KCNQ1* (Figura 2) (FITZPATRICK et al., 2007).

O gene *CDKN1C* codifica um inibidor de quinase dependente de ciclina, regulador negativo de proliferação celular e crescimento, que pode também atuar como supressor tumoral. Por sua vez, o transcrito do *LIT1* pode controlar negativamente em *cis* a expressão do gene *CDKN1C*, atuando como um oncogene quando sua expressão está alterada (ARIMA et al., 2005). Outro gene silenciado paternalmente no domínio é o *PHLDA2*, importante para o crescimento placentário (DELAVAL et al., 2006).

Figura 2: Representação esquemática da região cromossômica 11p15 em humanos. O esquema apresenta a metilação diferencial nas ICR1 (H19DMR) e ICR2 (KvDMR1) de acordo com a origem parental (paterno e materno). As setas ligadas às caixas indicam a orientação da transcrição, as caixas verdes/laranjas indicam, respectivamente, a expressão/repressão dos genes, as caixas pretas/brancas indicam a metilação na DMR, o trapézio vermelho, a proteína CTCF, e o círculo azul, o *enhancer*.

1.3. Desenvolvimento placentário

A placenta é um órgão altamente especializado que garante o crescimento e o desenvolvimento normal do feto. Este órgão provê o contato entre mãe e conceito, garantindo o aporte de nutrientes, a troca de gases e a transferência de produtos residuais do metabolismo fetal que serão posteriormente excretados pela mãe (GUDE et al., 2004; HUPPERTZ, 2008).

Embora estas sejam suas principais funções, a placenta também é responsável por proteger o feto do ataque do sistema imune materno e pela secreção de hormônios e fatores de crescimento associados à gestação que asseguram o sucesso da gravidez (ROSSANT; CROSS, 2001; MACCANI; MARSIT, 2009). Falhas destas mudanças fisiológicas ou alterações de qualquer evento nesta sucessão podem conduzir a diversas complicações obstétricas para a mãe e/ou para o feto, incluindo aborto espontâneo, Pré-eclâmpsia e RCIU (CHEN; BAJORIA; APLIN, 2002; LYALL, 2005).

As interações entre o feto e a mãe durante a gestação são possíveis pelo desenvolvimento de regiões especializadas da placenta, as interfaces materno-fetais, onde as células dos dois indivíduos são colocadas em próxima associação para interagir uma com a outra. O desenvolvimento destas interfaces é parte da placentação, um processo altamente coordenado que envolve a formação e subsequente desenvolvimento da placenta bem como ao remodelamento e as modificações anatômicas no tecido materno que servirão de suporte para o órgão (GEORGIADES; FERGUNSON-SMITH; BURTON, 2002).

O primeiro evento de diferenciação no desenvolvimento de mamíferos ocorre no estágio de blastocisto dando origem a duas populações celulares distintas. A primeira linhagem de células a se diferenciar será o trofoblasto. Este irá circundar a massa celular interna (MCI) formando uma camada de células trofoblásticas mononucleadas que, posteriormente, dará origem a partes da placenta e membranas fetais, enquanto a MCI originará o embrião, o cordão umbilical e o mesênquima placentário (HUPPERTZ, 2008).

A formação da placenta humana requer a diferenciação das células trofoblásticas em citotrofoblastos (CTBs) que durante a diferenciação, podem assumir caminhos distintos. Nas vilosidades flutuantes, eles fundem-se para formar os sinciciotrofoblastos (STBs) multinucleados que circundam o embrião e realizam o transporte e produção de hormônios. Enquanto nas vilosidades de ancoragem, os CTBs são mononucleados e adquirem propriedades tumorais que os tornam invasivos (GUDE et al., 2004; LYALL, 2005).

Por sua vez, os CTBs mononucleados diferenciam-se em duas populações identificadas na placenta como citotrofoblastos intersticial e endovascular. O primeiro invade profundamente o estroma decidual, funde-se para formar células multinucleadas gigantes e libera vasodilatadores [por exemplo, óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO)] que atuam nas artérias espiraladas maternas. Enquanto isso, o CTB endovascular invade o leito das artérias espiraladas uterinas, cruza o primeiro terço do miométrio adjacente, ancora-se à parede do vaso e promove a dilatação arterial. Posteriormente, ele remodela toda extensão das artérias que eventualmente perdem sua camada de músculo liso e o controle vasomotor (LYALL, 2005).

O CTB endovascular também é capaz de expressar 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 intervilo aumenta suficientemente para permitir o crescimento fetal durante a segunda metade da gravidez (ZHOU et al., 1997; DAMSKY; FISHER, 1998).

A placenta humana madura (ou a termo) é um órgão discoidal circular com aproximadamente 22 cm de diâmetro. A face fetal, também chamada de placa coriônica, carrega os vasos sanguíneos coriônicos fetais, os quais se ramificam do cordão umbilical. A face materna, também chamada de placa basal, formada por trofoblastos extravilosos fetais e células maternas da decídua uterina, é uma superfície que emerge da separação entre placenta e parede uterina durante o parto. O espaço entre essas duas faces é denominado espaço intervilloso que contém as principais unidades funcionais da placenta, os cotilédones. Esses lóbulos placentários compreendem o agrupamento e a extensa ramificação de vilosidades coriônicas contendo os vasos sanguíneos fetais. A maior parte das trocas materno-fetais ocorre na região terminal destas vilosidades coriônicas (GUDE et al., 2004; HUPPERTZ, 2008).

1.4. *Imprinting* genômico e a placenta

O *imprinting* genômico surgiu na evolução dos mamíferos (há aproximadamente 150 milhões de anos) e pode estar associado à evolução do desenvolvimento intrauterino que requer a formação da placenta. A placenta, particularmente as linhagens de células trofoblásticas invasivas, é um importante foco da “teoria do conflito” (REIK; DEAN; WALTER, 2001).

A ideia central da “teoria do conflito”, um modelo proposto para explicar o fenômeno do *imprinting* genômico, é a de que há uma competição entre os genomas paterno e materno na alocação dos recursos para o desenvolvimento do embrião. Nesta competição, o genoma paterno tenta maximizar o uso dos recursos maternos para o benefício da sua descendência à custa de outras gestações que podem ter outros genomas paternos. Por sua vez, o genoma materno tenta limitar a provisão de nutrientes a cada embrião individualmente para distribuir de forma igual a toda sua prole, independente do genoma paterno. Assim, os genes expressos paternalmente tendem a estimular o crescimento dos tecidos extraembrionários para maior aporte ao feto, enquanto os genes expressos maternalmente têm o efeito inverso (MOORE, 2001; FOWDEN et al., 2010).

São aproximadamente 60 os genes marcados já descritos para a espécie humana (<http://geneimprint.com/site/genes-by-species>) e em alguns casos o *imprinting* é específico para a placenta, não sendo encontrado em outros tecidos adultos ou embrionários (FOWDEN et al., 2010). Tal fenômeno é essencial para o desenvolvimento normal da placenta de mamíferos (SURANI; BARTON; NORRIS, 1984) e os genes que apresentam este fenômeno exibem expressão temporal e espacial na placenta podendo ser generalizada ou específica para certos tipos celulares (FOWDEN et al., 2006).

Estudos demonstram que a atuação dos genes marcados na placenta envolvem o controle do crescimento fetal e a regulação da capacidade de transferência de nutrientes da mãe ao conceito (CONSTANCIA et al., 2002; REIK et al., 2003). Por exemplo, os genes *Igf2P0*, *Phlda2* e *H19* parecem ser indispensáveis para o correto desenvolvimento morfológico e funcional da placenta enquanto o *Igf2* foi caracterizado como o principal modulador do crescimento fetal e placentário pela regulação do aporte de nutrientes (CONSTANCIA et al., 2002; ANGIOLINI et al., 2006).

O status de *imprinting* é também dinamicamente variável nas placentas de murinos e bovinos ao longo da gestação e a expressão bialélica advinda da perda de *imprinting* é mais comum em placentas coletadas no primeiro trimestre gestacional em relação às do terceiro (POZHARNY et al., 2010). Dessa forma, as observações mostram que o *imprinting* placentário é regulado durante o desenvolvimento deste órgão e pode estar confinado a períodos críticos da gestação (FOWDEN et al., 2010). Em humanos, alguns poucos estudos têm demonstrado que existem diferenças no padrão de *imprinting* e de expressão gênica na placenta ao longo dos três trimestres gestacionais (LAMBERTINI et al., 2008; POZHARNY et al., 2010; NOVAKOVIC et al., 2011; SITRAS et al., 2012).

A placenta possui propriedades únicas, possivelmente, devido à sua natureza transitória no desenvolvimento e seu papel, muitas vezes contraditório, na resposta da mãe e do feto (YUEN; ROBINSON, 2011). Além disso, ela é adaptável ao mosaicismismo e muitos defeitos celulares que seriam letais para o feto, como algumas trissomias cromossômicas (KALOUSEK; VEKEMANS, 1996) ou células androgenéticas (ROBINSON et al., 2007). Yuen e Robinson (2011) sugerem que a placenta seja capaz de atenuar as consequências de uma variedade de condições genéticas e ambientais por meio de uma plasticidade única na expressão de genes que seriam mediados por processos epigenéticos.

A variabilidade epigenética na placenta quando comparada a outros tecidos ainda não foi completamente avaliada, porém já existem relatos de que a variação na metilação do DNA em alguns genes é maior na placenta do que em tecidos somáticos, mesmo em relação aos tecidos que também participam do estabelecimento e manutenção da gestação, como âmnio, córion e cordão umbilical (AVILA et al., 2010; BOURQUE et al., 2010; TURAN et al., 2010).

Aliada a essa variabilidade inter-tecidual, alguns estudos também têm mostrado um nível significativo de variabilidade na expressão gênica e na metilação do DNA em diferentes sítios dentro da mesma placenta e que, portanto, uma amostragem única pode não ser representativa da placenta como um todo (AVILA et al., 2010; BOURQUE et al., 2010; TURAN et al., 2010; YUEN; ROBINSON, 2011; PEÑAHERRERA et al., 2012).

Há poucas informações na literatura sobre *imprinting* genômico e desenvolvimento placentário, principalmente para estágios precoces do desenvolvimento devido às dificuldades técnicas de obtenção dessas placentas. Por outro lado, o conhecimento sobre a presença de mosaicismo em relação ao perfil epigenético placentário também deve ser considerado, uma vez que há muita heterogeneidade em relação à coleta de amostras de placentas na literatura e da possibilidade de resultados não representativos, caso ocorra o mosaicismo. Como grande parte das técnicas de estudo de metilação são baseadas na modificação do DNA por bissulfito de sódio torna-se necessário também verificar a ocorrência da 5-hmC visto que tal base pode ser confundida com 5-mC e portanto gerar falsos resultados.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Verificar o perfil epigenético das regiões controladoras de *imprinting*, ICR1 e ICR2, de 11p15.5 em placentas de diferentes estágios da gravidez e em regiões distintas de uma mesma placenta.

2.2. Específicos:

1. Verificar diferenças no padrão de metilação das regiões diferencialmente metiladas H19DMR (ICR1) e KvDMR1 (ICR2) em tecido placentário de 3º trimestre gestacional por meio de Reação em Cadeia da Polimerase Específica para a Metilação (MS-PCR) e Análise Combinada de Bissulfito e Restrição Enzimática (COBRA), respectivamente;
2. Verificar diferenças no padrão de metilação da H19DMR e da KvDMR1 em tecido placentário de 1º e 3º trimestres por meio de Método de Digestão Enzimática Sensível à Metilação Associada à PCR em Tempo Real (DESM-RT).
3. Verificar a presença de mosaicismo em relação ao padrão de metilação da H19DMR e da KvDMR1 em diferentes regiões (cotilédones) placentárias em tecidos de 3º trimestre gestacional.
4. Verificar diferenças no padrão de metilação da H19DMR e da KvDMR1 em tecidos de vilosidade coriônica e cordão umbilical de placentas de 1º trimestre gestacional.
5. Verificar a presença de hidroximetilação na região KvDMR1.

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos do Projeto

Este estudo, faz parte de um projeto mais amplo, 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 da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CAAE-0091.0.004.000-04) (Anexo A).

As amostras de placentas de 1º trimestre gestacional, utilizadas neste projeto, foram enviadas pelo Laboratório da Profª. Dra. Susana Marina 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 (Tabela 1) foram recrutadas durante sua internação na enfermaria ou no Centro Obstétrico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (HCFMRP-USP), onde foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da Pesquisa (TCLE) (Apêndice A). Foram selecionadas mulheres saudáveis, sem hipertensão e/ou proteinúria alta, apresentando gravidez de feto único.

As pacientes voluntárias que aceitaram participar do estudo, responderam a um questionário (Apêndice B), contendo perguntas sobre seus antecedentes pessoais e obstétricos, além de dados sobre os membros de sua família, para elaboração de heredograma. Outras informações mais detalhadas sobre o quadro clínico gestacional da paciente foram obtidas junto aos prontuários médicos revisados após o parto.

Tabela 1. Dados gerais das pacientes brasileiras, doadoras de amostras de placenta de 3º trimestre.

Amostra	Registro Laboratorial	Ano de Nascimento da Paciente	Idade Gestacional (semanas e dias)	Peso RN (g)	Sexo RN
Plc 1	596	1978	41s 6d	3240	m
Plc 2	794	1986	40s	ND	ND
Plc 3	795	1982	39s 1d	3565	m
Plc 4	846	1967	40s 2d	4490	m
Plc 5	1156	1985	40s 1d	3250	m
Plc 6	1172	1990	40s 5d	4090	f
Plc 7	1174	1986	37s 2d	2325	m
Plc 8	1185	1977	41s	3210	f
Plc 9	1213	1986	41s 3d	4270	m
Plc 10	1216	1976	38s 3d	3555	m
Plc 11	1281	1981	38s 5d	3005	m
Plc 12	1641	1975	39s 3d	3500	m
Plc 13	1646	1974	38s 5d	3675	f
Plc 14	1653	1991	41s 3d	3770	m
Plc 15	1654	1982	34s 3d	2160	f

(Plc) Placenta. (Peso do RN) Peso do recém-nascido. (Sexo do RN) Sexo do recém-nascido. (m) Masculino. (f) Feminino. (ND) Não constam os dados. Idade Gestacional (por ocasião do parto).

3.3. Coleta de Tecido Placentário

Foram coletadas 34 amostras, sendo 25 de vilosidades coriônicas (15 referentes a placentas do 3º trimestre e 10 do 1º trimestre) e nove de cordão umbilical de 1º trimestre gestacional, provenientes da mesma gestação (pareadas) de nove das 10 amostras de vilosidade coriônica do 1º trimestre. Dentre as amostras de 3º trimestre, quatro placentas foram analisadas em separado para o estudo de mosaicismo.

Das amostras referentes ao 1º trimestre (todas com no máximo 12 semanas gestacionais no momento da interrupção da gravidez e do sexo feminino) foram retirados fragmentos de tecidos como vilosidade coriônica, cordão umbilical, âmnio e córion. Destes, foram enviadas alíquotas de DNA já extraído (100ng/μl), pela equipe holandesa, de nove

amostras pareadas de tecidos de vilosidade coriônica e cordão umbilical (membrana), totalizando 10 placentas representativas do 1º trimestre gestacional.

As placentas das pacientes brasileiras foram coletadas logo após o parto. Com o auxílio de bisturi estéril, entrando pela face materna, foram retirados dois pequenos fragmentos da placenta, de aproximadamente 2cm³ da região com vilosidade coriônica próxima ao cordão umbilical. Para as amostras destinadas ao estudo do mosaicismo (quatro placentas), os cotilédones foram primeiramente mapeados e identificados na face materna e de cada um destes foram retirados pequenos fragmentos também de aproximadamente 2cm³ da região com vilosidade coriônica. Os fragmentos obtidos foram lavados com solução fisiológica (NaCl 0,9%), e dissecados em lupa para assegurar a permanência apenas das vilosidades coriônicas sem outros tecidos. Este material foi colocado em microtubos cônicos contendo tampão PBS 1X e armazenado a -80°C até o momento da extração de DNA.

3.3.1. Mapeamento dos cotilédones

As placentas destinadas ao estudo do mosaicismo placentário (Plc 12 a Plc 15) tiveram seus cotilédones identificados e mapeados com o auxílio do Dr. Conrado Milani Coutinho, médico obstetra membro da Equipe Médica do Centro Obstétrico do HCFMRP-USP. Após a identificação, foram escolhidos quatro cotilédones, consistindo em dois centrais (próximos à inserção do cordão umbilical) e dois periféricos (adjacentes aos centrais e afastados do cordão umbilical) (Figura 3).

Figura 3. Foto da face materna de uma placenta (Plc 13) mostrando o mapeamento de todos os cotilédones incluindo os utilizados para o estudo de mosaicismo (números circundados). A seta indica a posição da inserção do cordão umbilical.

3.4. Extração do DNA

A extração do DNA da vilosidade coriônica foi realizada com base no protocolo de extração e precipitação de DNA em NaCl (OLERUP; ZETTERQUIST, 1992, modificado). Nesta extração, as amostras de placentas foram lavadas três vezes em NaCl 0,9% centrifugadas a 14.000 rpm por 20 segundos, lavadas duas vezes em tampão de lise celular [Sacarose 0,32M; Tris HCl (pH 7,5) 12mM; $MgCl_2$ 5,0M; Triton X 1,0%] e centrifugadas 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 (pH 8,0) 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 a 20°C, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* restante desidratado. Por fim, o *pellet* foi ressuscitado em 50µL de água deionizada e armazenado sob refrigeração a -20°C.

3.5. Ensaios Qualitativos

Os ensaios qualitativos, MS-PCR (do inglês, *Methylation Specific PCR*) e COBRA (Análise Combinada de Bissulfito e Restrição Enzimática), envolveram inicialmente uma etapa de modificação do DNA pelo bissulfito de sódio. Como explicado anteriormente, nesta técnica as bases nucleotídicas citosinas são convertidas *in vitro* em bases uracilas nas moléculas do DNA tratado, porém esta conversão não ocorre quando as citosinas encontram-se metiladas. De acordo com Clark et al (1994), após esta “modificação” do DNA com bissulfito de sódio as amostras podem ser analisadas quanto ao padrão de metilação com base na presença de citosinas que permanecem no DNA após a modificação com bissulfito de sódio (citosinas metiladas).

Para o protocolo convencional de modificação com bissulfito de sódio, foi empregado 1µg de DNA genômico diluído em 70µL de água ultra pura estéril onde foram adicionados 8µL de NaOH 3M para a desnaturação do DNA. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos e a 94°C por 5 minutos. Terminado este tempo de incubação, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo e, a cada tubo, acrescentou-se 1mL de uma solução contendo 2,7M de bissulfito de sódio, 0,6mM de hidroquinona e 0,36M de NaOH.

Em seguida as amostras foram incubadas a 55°C, no escuro, por 5 horas (para evitar a evaporação das amostras, utilizou-se 100µL de óleo mineral) e posteriormente purificadas com o kit *Wizard DNA Clean-up System* (Promega). Na próxima etapa, adicionou-se, ao DNA, 5µL de NaOH 3M incubado a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, o DNA foi novamente precipitado em 5µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 100µL de etanol absoluto e incubado a -20°C *overnight*.

Na manhã seguinte, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 20 minutos e lavadas com etanol 70% seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então desprezado, e, após secar, o DNA modificado foi ressuspendido em 30µL de água ultra pura estéril.

Devido à grande demanda de volume e concentração de DNA exigida pelos ensaios qualitativos, já que para a conversão pelo protocolo de bissulfito de sódio é necessário 1µg/µL de amostra para cada nova modificação, estes ensaios foram realizados apenas com as amostras de 3º trimestre uma vez que, a quantidade de material enviada de amostras de 1º trimestre não foi suficiente para esta análise.

3.5.1. Análise Combinada de Bissulfito e Restrição Enzimática (COBRA)

O ensaio COBRA foi utilizado para avaliar o padrão de metilação da H19DMR. Nesta metodologia, o DNA modificado por bissulfito foi amplificado com *primers* que não discriminam entre alelos metilados e não-metilados, já que não contém em sua sequência dinucleotídeos CpGs (XIONG; LAIRD, 1997).

Para a primeira etapa do COBRA, por meio de PCR convencional, foi amplificado um fragmento de 225 pb [chr11:2021077-2021301: UCSC Genome Browser on Human Genome Sequence: Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly, <http://genome.ucsc.edu/>] que possui três sítios de restrição para a enzima *Bst*UI (Figura 2).

Após algumas adaptações para otimizar a reação, a padronização se deu com as seguintes concentrações: 10 pmol/μL de cada *primer* (P1A: 5'-GTATAGTATATGGGTATTTTGGAGGTTTT-3' e P1B: 5'-TAAATATCCTATTCCCAAATAACCC-3'), KCl 50mM; Tris HCl (pH 8,4) 10mM; MgCl₂ 1,5mM; dNTP (0,1mM de cada nucleotídeo); *AmpliTaQ Gold® DNA Polimerase* 1U; DNA genômico 4.10⁻³ μg/μL e água ultra pura para completar o volume de 25μL.

```
GCATAGCACATGGGTATTTCTGGAGGCTTCTccttcggtctcaccgcctggatggca
cggaattggttgtagttgtggaatcggaagtggccgcgcggcggcagtgccaggctca
cacatcacagcccgagcccgccccaactgggggttcgcccgtggaaacgtcccgggtc
acccaagccacgcgtcgcagggttcacggGGGTCATCTGGGAATAGGACACTCA
```

Figura 4. Sítios de restrição para *Bst*UI no fragmento estudado. Sequência de 225 pb com a representação do par de *primers* utilizados (sublinhado) e os três sítios de digestão (negrito) para a enzima de restrição *Bst*UI (CGCG).

A ciclagem de temperatura foi realizada em termociclador *PTC-100 Thermocycler* (MJ Research Inc.) com uma etapa de aquecimento inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos por 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, pareamento a 61°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, finalizando com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Do produto amplificado, 1μg foi submetido à digestão com 5U da enzima *Bst*UI (New England), incubado em 5mM NaCl, 1mM Tris-HCl, 1mM de MgCl₂, 0,1mM DTT, pH 7,9

(Buffer 2, 1x), *overnight* a 60 °C, e visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata (0,2%).

Para controle de eficiência da modificação por bissulfito de sódio, foi amplificado um fragmento a partir de DNA genômico com o par de *primers* H19 UPH19II: 5'-CAATGAGGTGTCCCAGTTCCA-3' e H19 UPH19III: 5'-ACATAAGTAGGCGTGA-3'. Esse fragmento amplificado [chr11:2020964-2021399: UCSC Genome Browser on Human Genome Sequence: Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly, <http://genome.ucsc.edu/>], não-metilado, foi usado como controle de hipometilação.

Para controle de eficiência da digestão enzimática, foi utilizada uma amostra de DNA de espermatozoide humano, o qual é conhecidamente hipermetilado para a região da H19DMR, e, portanto, é totalmente digerido após a amplificação. Além do uso dos controles, os ensaios foram repetidos no mínimo duas vezes para cada amostra para que os resultados fossem confirmados.

3.5.2. PCR metilação-específica (MS-PCR)

A técnica de MS-PCR foi utilizada para avaliar o padrão de metilação da KvDMR1 e consiste na diferenciação de fragmentos metilados e não-metilados de uma determinada região do DNA modificada por bissulfito de sódio (HERMAN et al, 1996), utilizando *primers* específicos para apenas um tipo de fragmento.

Para a amplificação do fragmento metilado foi utilizado o par de *primers* denominado "M" (M1A: 5' TTTTTCGGTTAATGATAGGATACG 3' e M1B: 5' TCTACCTAAAACTACGACAACGCT 3') e para a amplificação do fragmento não-metilado foi utilizado o par de *primers* "U" (U2A: 5'TTTTTCGGTTAATGATAGGATATGG3' U2B: TCTACCTAAAACTACAACAACACT 3') (GOMES et al., 2007). Tais *primers* geram um fragmento de 169 pares de base (pb) cuja sequência pode ser consultada em chr11:2721222-2721390 [UCSC Genome Browser on Human Genome Sequence: Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly, <http://genome.ucsc.edu/>].

Após a realização de alguns ajustes para otimizar o ensaio, a reação de amplificação da KvDMR1 foi padronizada com as seguintes concentrações: KCl 50mM; MgCl₂ 1,5mM; Tris HCl (pH 8,4) 10mM; dNTP (0,1mM de cada nucleotídeo); além de 10pmol/μL de cada *primer*, *AmpliTaq Gold® DNA Polimerase* 1U; 8.10³μg/μL de DNA genômico.

A ciclagem de temperatura foi realizada em termociclador *PTC-100 Thermocycler* (MJ Research Inc.) com uma etapa de aquecimento inicial de 94 °C por 5 minutos, seguidos por 50 ciclos de desnaturação a 94 °C por 90 segundos, pareamento a 56,2 °C por 90 segundos e extensão a 72 °C por 90 segundos, finalizando com uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de

Poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata (0,2%). As técnicas foram repetidas no mínimo duas vezes para cada amostra para que os resultados fossem confirmados.

3.6. Ensaios Quantitativos

3.6.1. Método de Digestão Enzimática Sensível à Metilação Associada à PCR em Tempo Real (DESM-RT)

Este método, desenvolvido em nosso laboratório, foi utilizado para avaliar quantitativamente a metilação presente nas regiões KvDMR1 e H19DMR. O protocolo de análise da metilação consiste em uma digestão do DNA, previamente à PCR, pela 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. Nas amostras em que a metilação da DMR for monoalélica, a enzima *HpaII* irá clivar uma das fitas (não-metilada) impedindo a amplificação desse fragmento e nos casos de metilação bialélica não irá clivar nenhuma das fitas de DNA, permanecendo, então, os dois alelos.

Para a etapa prévia de digestão, utilizou-se 0,2µg de DNA genômico em meio contendo 20mM de Tris-HCL (pH 7,4), 10mM MgCl₂ com 10U da enzima *HpaII* (Invitrogen) a 37°C, *overnight*, seguido por uma etapa de 60°C a 20 minutos para inativação da enzima. O material não digerido recebeu o mesmo tratamento retirando-se apenas a enzima da solução. Como controle de digestão, todas as amostras foram digeridas separadamente pela enzima *MspI* (New England), uma enzima isoesquisômera da *HpaII*, que possui o mesmo sítio de restrição (CCGG) mas que não é sensível à metilação, e que, portanto, digere todo o material.

A quantificação do DNA metilado, por meio de PCR em Tempo Real, foi obtida pelo Sistema de Detecção de Sequência *StepOne™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems) em um volume total de reação de 10µL contendo *SYBR Green PCR Master Mix* e os *primers*.

Para avaliar a KvDMR1, foram utilizados 0,075pmol de cada *primer* descrito por Gomes e colaboradores (2007), cujas sequências são: *sense*: 5' GTGCCTCTCAGCGTGGTCC 3' e *antisense* 5' AACACGATGACTGACGCAC 3'. As condições de ciclagem para esta reação foram: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos (95°C por 15 segundos e 65,4°C por 45 segundos), seguido por análise de dissociação realizada de 60°C a 95°C, variando 1°C a cada segundo. Após a amplificação foi gerado um fragmento de 96 pb [chr11:2721039-2721134: UCSC Genome Browser on Human Genome Sequence:

Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly, <http://genome.ucsc.edu/>] para a KvDMR1 que possui dois sítios de digestão para a enzima *Hpa*II.

Para quantificar a metilação da H19DMR, foram utilizados 0,3pmol de cada um dos seguintes *primers*: UPH19II 5'-CAATGAGGTGTCCCAGTTCCA-3' e H19 Real T-2 5'-CTATGAGTGTCTATTCCCA-3' que geraram um fragmento de 236 pb [chr11:2021074-2021399: UCSC Genome Browser on Human Genome Sequence: Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly, <http://genome.ucsc.edu/>] com a presença de dois sítios de restrição para a enzima *Hpa*II. As condições de ciclagem para esta região foram padronizadas em: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos (95°C por 15 segundos e 61°C por 60 segundos), seguidos por análise de dissociação realizada de 60°C a 95°C, variando 1°C a cada segundo.

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

As amostras foram analisadas em duplicatas ou triplicatas estipulando o desvio padrão máximo de 0,3. As reações foram repetidas pelo menos duas vezes para cada amostra, realizando uma nova digestão e em seguida uma nova amplificação.

3.6.2. Ensaio de Hidroximetilação

Paralelamente aos ensaios de DESM-RT, 11 amostras de 3º trimestre foram submetidas ao *kit* comercial *EpiMark™ 5-hmC and 5-mC Analysis* (New England), para avaliar os níveis de metilação e de hidroximetilação presentes na KvDMR1.

No protocolo de execução do *kit* (Figura 3), foi observado que os passos que levam ao preparo dos tubos 4 (digerido com *Msp*I), 5 (digerido com *Hpa*II) e 6 (sem digestão), compreendem as mesmas etapas utilizadas no nosso ensaio da DESM-RT. Inicialmente, comparou-se a eficiência e a similaridade dos resultados na quantificação da metilação obtidas com a DESM-RT e com o ensaio proposto pelo *kit*. Para este teste foram utilizadas as amostras Plc 4 e Plc 11. Os experimentos, realizados em paralelo, consistiram na padronização das concentrações dos reagentes utilizados na PCR em tempo real utilizando as amostras digeridas pelo *kit EpiMark™*.

Figura 5. Esquema representativo do protocolo experimental do kit comercial EpiMark™ 5-hmC and 5-mC Analysis (New England). Na Reação de Glicosilação, o DNA de interesse é tratado com T4-BGT e UDP-Glicose. A T4-BGT transfere a glicose da UDP-Glicose para a 5-hmC (gerando a 5-hidroxi metilcitossina glicosilada, 5-ghmC). A enzima Mspl corta o DNA contendo 5-hmC mas não corta sítios contendo 5-ghmC. A enzima HpaII é bloqueada por qualquer uma dessas modificações. A presença de 5-hmC e 5-mC é determinada pela análise por PCR. Na Reação Controle, similar ao ensaio DESM-RT, o DNA de interesse é digerido seguindo uma reação controle com UDP-Glicose sem a presença da enzima T4-BGT, deixando os sítios contendo 5-hmC livres da glicosilação. Assim, a enzima Mspl cliva o DNA não modificado, 5-hmC e 5-mC, enquanto a HpaII cliva somente o DNA não modificado.

De acordo com o fabricante, a metilação do DNA é diferenciada da hidroximetilação pela adição de glicose ao grupo hidroxil da 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) pela reação enzimática promovida pela T4 β -glucosiltransferase (T4-BGT). Quando a 5-hmC ocorre em um contexto contendo a sequência CCGG (sítio de restrição para a enzima *HpaII* e *MspI*), esta modificação converte o fragmento em um sítio com clivagem e um sem o corte para a enzima *MspI*. As amostras que tiveram seus sítios CpGs glicosilados, pela presença de 5-hmC, são clivadas normalmente pela *HpaII*, mas não pela *MspI*.

Para obter os valores percentuais referentes à hidroximetilação, foi utilizada a fórmula do kit (Figura 6). Enquanto, para quantificar a metilação presente nas amostras, utilizou-se a fórmula $(1/2)^{d-nd}$, sendo “d” a média do Ct do DNA digerido e “nd” a média do Ct do DNA não digerido (utilizando os valores de Ct obtidos nos tubos 4, 5 e 6).

<p>A) $C^{hm}CGG\% = [M2 \cdot (C1/C2) - M1]/C1;$</p> <p>B) $C^mCGG\% = [H1 - M2 \cdot (C1/C2)]/C1;$</p> <p>C) $CCGG\% = (C1 - H1)/C1;$</p>
--

Figura 6. Fórmulas fornecidas junto com o kit comercial para quantificar a porcentagem do material: Hidroximetilado (A), metilado (B) e sem digestão (C). Os parâmetros utilizados são: M2: valor da qPCR (PCR quantitativa em tempo real) na amostra de DNA genômico com *MspI* e T4-BGT; H2: valor da qPCR na amostra de DNA genômico com *HpaII* e T4-BGT; C2: valor da qPCR na amostra de DNA genômico somente com T4-BGT; M1: valor da *qPCR na amostra de DNA genômico com *MspI*; H1: valor da qPCR na amostra de DNA genômico com *HpaII*; C1: valor da qPCR na amostra somente com DNA genômico; (*) Os valores de qPCR podem ser os valores de Ct brutos ou normalizados.

3.7. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*) empregando-se os testes *t* não pareado e F, além do coeficiente de correlação de Pearson, considerando-se $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Os dados quantitativos foram expressos como média $\pm$ 1DP.

Os testes estatísticos foram usados para verificar as diferenças significativas nos perfis de metilação da H19DMR e KvDMR1 nos tecidos, entre os grupos: (a) 1º trimestre e 3º trimestre; (b) vilosidades coriônicas (1º trimestre) e cordão umbilical (1º trimestre). Para o estudo de mosaicismos com as quatro placentas de 3º trimestre, foram comparados também os perfis de metilação entre os cotilédones de acordo com sua posição no disco placentário. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação do perfil de metilação entre os tecidos de vilosidade coriônica e cordão umbilical das amostras pareadas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise do Perfil de Metilação da H19DMR

A metilação da H19DMR em placentas humanas de 1° e 3° trimestre foi avaliada por meio de técnicas qualitativas (COBRA) e quantitativas (DESM-RT). Os ensaios COBRA e DESM-RT foram aplicados nas amostras de 3° trimestre enquanto as amostras de 1° trimestre, incluindo os tecidos de cordão umbilical e vilosidade coriônica, foram submetidas apenas à DESM-RT.

4.1.1. Amostras de 1° trimestre gestacional

O padrão de metilação da H19DMR no 1° trimestre gestacional foi avaliado, por meio da DESM-RT, em 10 amostras sendo que em nove delas foi possível o pareamento de tecidos com origens distintas (vilosidades coriônicas e cordão umbilical). Apenas uma das amostras não apresentou esse pareamento de tecidos, tendo apenas a quantificação da metilação em vilosidade coriônica (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação da metilação da H19DMR em amostras de vilosidade coriônica e cordão umbilical referente ao 1° trimestre gestacional.

Amostra	Metilação	Metilação
	(vilosidade coriônica)	(cordão umbilical)
E1	0,37	0,43
E2	0,33	0,38
E3	0,31	0,13
E4	0,35	0,50
E7	0,40	0,18
E10	1,01	-
E12	0,46	0,11
E13	0,33	0,12
E15	0,09	0,50
E23	0,72	0,52

As placentas de 1º trimestre apresentaram como valor de média dos níveis de metilação da H19DMR $0,43 \pm 0,25$ (média $\pm$ 1DP) para vilosidade coriônica e $0,31 \pm 0,18$ para cordão umbilical. As análises estatísticas para a comparação entre as médias de metilação dos dois tecidos, feitas pelo teste F e *t*, não foram significativas (ambos com $p=0,2641$). A correlação entre os valores de metilação encontrados nos dois tecidos para cada uma das nove amostras pareadas (E1, E2, E3, E4, E7, E12, E13, E15, E23), foi calculada pelo coeficiente de correlação de Pearson que não foi estatisticamente significativo ($p=0,915$).

4.1.2. Amostras de 3º trimestre gestacional

4.1.2.1. COBRA

O ensaio qualitativo COBRA utilizado para avaliar a metilação da H19DMR consistiu na amplificação do fragmento por PCR, seguido pela digestão com a enzima de restrição *Bst*UI, que tem como sítio a sequência CGCG. Para este ensaio foram observados três pontos de clivagem da enzima *Bst*UI no fragmento amplificado específico para uma porção da H19DMR (Figura 4).

As amostras de 3º trimestre submetidas ao COBRA apresentaram um padrão condizente com metilação monoalélica. Em relação à digestão pela *Bst*UI, foi observado que de acordo com o sítio CGCG no qual a enzima atuou puderam ser distinguidos até quatro fragmentos no gel de poliacrilamida 10% de aproximadamente 88 pb, 95 pb, 130 pb e 180 pb (Figura 7).

Figura 7. Padrão de metilação da H19DMR pelo método COBRA em amostras de placentas. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% visualizado por impregnação com nitrato de prata 0,2%. (Ld) marcador molecular (Ladder 100bp); (Br) controle negativo da amplificação; (Plc 1 a Plc 14) representação das amostras de placenta; (HIPO) fragmento amplificado com *primers* UPHII e UPHII posteriormente modificado por bissulfito de sódio – controle hipometilado; (ESP) DNA de espermatozoide - controle hipermetilado.

Os resultados observados nas amostras de placenta a termo mostraram que existem diferentes padrões de metilação entre os dinucleotídeos CpGs presentes no fragmento estudado da H19DMR.

4.1.2.2. DESM-RT

A quantificação dos níveis de metilação da H19DMR nas 15 amostras de 3º trimestre foi obtida por DESM-RT (Figura 8). A Tabela 3 apresenta os valores de metilação em cada placenta estudada.

Figura 8. Curva de amplificação em qPCR da região H19DMR para a amostra Plc 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; (Hpall) – amostra digerida com a enzima Hpall; (Mspl) – amostra digerida com a enzima Mspl.

Tabela 3. Quantificação da metilação na H19DMR em amostras de 3º trimestre gestacional.

Amostra	Metilação
Plc 1	0,50
Plc 2	0,86
Plc 3	0,41
Plc 4	0,58
Plc 5	0,42
Plc 6	0,30
Plc 7	0,22
Plc 8	0,47
Plc 9	0,30
Plc 10	0,37
Plc 11	0,27
Plc 12	0,32
Plc 13	0,44
Plc 14	0,34
Plc 15	0,41

As placentas de 3º trimestre apresentaram como valor da média de metilação $0,41 \pm 0,15$ para a H19DMR. Quanto à avaliação do mosaicismo na placenta, as amostras de diferentes cotilédones das placentas Plc 12, Plc 13, Plc 14 e Plc 15 foram submetidos à DESM-RT para observar a variação intra-placentária da metilação. Foram analisados quatro cotilédones em cada placenta, levando-se em consideração sua distância em relação à inserção do cordão umbilical (Tabela 4).

Tabela 4. Quantificação da metilação na H19DMR em cotilédones placentários de amostras de 3º trimestre gestacional.

Amostra	Cotilédone	Posição	Metilação
Plc 12	C1	Periférico	0,33
	C2	Central	0,30
	C7	Periférico	0,26
	C8	Central	0,35
Plc 13	C2	Periférico	0,47
	C5	Central	0,47
	C9	Periférico	0,34
	C10	Central	0,41
Plc 14	C4	Periférico	0,35
	C5	Periférico	0,33
	C6	Central	0,40
	C9	Central	0,29
Plc 15	C5	Central	0,39
	C7	Central	0,43
	C9	Periférico	0,38
	C12	Periférico	0,23

A variabilidade de metilação da H19DMR entre os diferentes cotilédones dentro da mesma placenta pode ser observada no Gráfico 1. Em relação ao posicionamento na placenta, o Gráfico 2 apresenta as diferenças de metilação entre os cotilédones localizados próximos ao cordão umbilical (centrais) e aqueles próximos à borda (periféricos).

As análises estatísticas, por meio dos testes F e *t*, não foram significativas (ambos com $p=0,2185$) na comparação das médias de metilação da H19DMR entre os cotilédones centrais e periféricos. Apesar dessa variabilidade não ser estatisticamente significativa, é possível observar a variação intra-placentária assim como inter-placentária para as amostras estudadas.

Gráfico 1. Representação gráfica para a variação de metilação encontrada na H19DMR entre os cotilédones placentários para cada uma das placentas (Plc 12 – Plc 15). As caixas representam o intervalo interquartil (IQ) para os quatro cotilédones avaliados por placenta. As linhas verticais representam os últimos dados dentro de $\pm 1,5$ vezes o IQ e as barras horizontais indicam as medianas.

Gráfico 2. Representação gráfica para a variação de metilação encontrada na H19DMR de acordo com a posição (central ou periférica) dos cotilédones placentários para cada uma das placentas (Plc 12 – Plc 15).

Na comparação das médias de metilação para a H19DMR referentes às vilosidades coriônicas do 1° e do 3° trimestre, foram utilizados os testes F e *t* que não apresentaram resultados estatisticamente significativos (ambos com $p=0,7807$).

4.2. Análise do Perfil de Metilação da KvDMR1

O perfil de metilação da KvDMR1 em placentas humanas foi avaliado por ensaios qualitativos e quantitativos. Para essa avaliação, foram utilizadas amostras de 10 gestações de 1° trimestre e 15 de 3° trimestre.

4.2.1. Amostras de 1° trimestre gestacional

O perfil de metilação da KvDMR1 nas amostras de 1° trimestre foram analisados por DESM-RT como exemplificado na Figura 9, que mostra a curva de amplificação da amostra E4. Para o 1° trimestre, foram avaliados diferentes tecidos placentários. Das 10 amostras do 1° trimestre, apenas uma amostra não possui o pareamento dos tecidos de vilosidade coriônica e cordão umbilical (Tabela 5).

Figura 9. Curva de amplificação em qPCR da região KvDMR1 para a amostra E4. (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*.

Tabela 5. Quantificação da metilação da KvDMR1 em amostras de vilosidade coriônica e cordão umbilical referentes ao 1º trimestre gestacional.

Amostra	Metilação	
	(vilosidade coriônica)	(cordão umbilical)
E1	0,59	0,50
E2	0,52	0,80
E3	0,41	0,32
E4	0,55	0,48
E7	0,54	0,40
E10	0,58	-
E12	0,40	0,17
E13	0,34	0,70
E15	0,20	1,21
E23	0,59	0,58

Para esse grupo de amostras a média dos níveis de metilação foi de $0,47 \pm 0,13$ para vilosidade coriônica e $0,57 \pm 0,30$ para cordão umbilical. As análises estatísticas para a comparação entre as médias de metilação dos dois tecidos, feitas pelo teste F e teste *t* (ambos com $p=0,3504$), não foram significativas considerando-se $p<0,05$ como estatisticamente significativo. A aplicação do coeficiente de correlação de Pearson para verificar a relação da metilação entre os dois tecidos nas nove amostras pareadas (E1, E2, E3, E4, E7, E12, E13, E15, E23) também não foi significativa ($p=0,171$), demonstrando que a metilação encontrada para um tecido não é relacionada ao outro e vice-versa.

4.2.2. Amostras de 3º trimestre gestacional

Os níveis de metilação da KvDMR1 nas amostras de 3º trimestre foram pesquisados por MS-PCR e DESM-RT. Foi estudada a metilação em 15 amostras de

placenta (vilosidade coriônica), sendo que em quatro, os cotilédones foram identificados, mapeados de acordo à sua posição no disco placentário em centrais ou periféricos e as amostras referentes à cada cotilédone submetidas à análise de quantificação por DESM-RT. Além da avaliação da metilação, 11 amostras deste período gestacional foram submetidas à pesquisa da presença de hidroximetilação na região KvDMR1.

4.2.2.1. MS-PCR (Methylation specific PCR)

O método qualitativo da MS-PCR para a KvDMR1 demonstrou um padrão de metilação monoalélico (presença de alelos metilados e não metilados pós-digestão) em todas as amostras do 3º trimestre gestacional (Figura 10).

Figura 10. Padrão de metilação da KvDMR pelo método MS-PCR em placentas de 3º trimestre. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% visualizado por impregnação com nitrato de prata 0,2%. (Ld) marcador molecular (Ladder 100bp). (Plc 1 a Plc 8) Representação das amostras de placenta dos pacientes de 1 a 8. (M) reação utilizando os *primers* M1A e M1B; (U) reação utilizando os *primers* U2A e U2B.

4.2.2.2. DESM-RT e Ensaio de Hidroximetilação

Os experimentos para verificar a similaridade entre os resultados obtidos com o *kit* comercial *EpiMark™* e o método DESM-RT na análise quantitativa da metilação presente na região KvDMR1 foram satisfatórios por apresentarem resultados muito próximos (Tabela 6 e Figura 11).

Tabela 6. Comparação entre os resultados obtidos por DESM-RT e pelo *kit EpiMark™ 5-hmC and 5-mC Analysis*. Avaliação da metilação nas amostras Plc 4 e Plc 11.

Amostra	Metilação (DESM-RT)	Metilação (Kit EpiMark)
Plc 4	0,39	0,37
Plc 11	0,50	0,45

*Resultados considerados próximos para estes ensaios variaram em até 0,10.

Figura 11. Comparação das curvas de amplificação em qPCR para a KvDMR1 obtidas pelo ensaio DESM-RT (A e C) e pelo *kit comercial EpiMark™ 5-hmC and 5-mC Analysis* (B e D). Os gráficos A e B apresentam os resultados da amostra Plc 4 enquanto C e D mostram os resultados da amostra Plc 11. (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*; (Mspl) amostra digerida com a enzima *Mspl*.

Após os testes, as amostras de Plc 1 a Plc 11 foram submetidas ao protocolo do kit *EpiMark™ 5-hmC and 5-mC Analysis* e juntamente com a porcentagem de metilação obteve-se a porcentagem de hidroximetilação existente na KvDMR1 (Tabela 7). Em relação à hidroximetilação, os valores foram considerados desprezíveis (todos menores que 10%) e, portanto, não foi identificada a presença de hidroximetilação na KvDMR1 em placentas a termo.

Tabela 7. Quantificação da metilação e hidroximetilação na KvDMR1 nas placentas de 3º trimestre com o kit *Epimark™ 5-hmC and 5-mC Analysis*.

Amostra	Metilação	Hidroximetilação
Plc 1	0,51	0,007
Plc 2	0,53	- 0,02
Plc 3	0,50	- 0,01
Plc 4	0,37	- 0,0004
Plc 5	0,31	-0,02
Plc 6	0,27	- 0,004
Plc 7	0,29	- 0,008
Plc 8	0,40	- 0,002
Plc 9	0,47	0,0005
Plc 10	0,36	0,003
Plc 11	0,45	- 0,005

Para completar o quadro de avaliação da metilação das amostras de 3º trimestre, as amostras de Plc 12 a Plc 15 foram submetidas ao método DESM-RT (Tabela 8).

Tabela 8. Quantificação da metilação na KvDMR1 em amostras de 3° trimestre gestacional.

Amostra	Metilação
Plc 12	0,41
Plc 13	0,42
Plc 14	0,43
Plc 15	0,47

Verificou-se que a média para os valores de metilação da KvDMR1 nas placentas de 3° trimestre foi de $0,41 \pm 0,08$. Paralelamente, os DNAs extraídos dos cotilédones placentários obtidos das amostras Plc 12, Plc 13, Plc 14 e Plc 15 foram submetidos à DESM-RT para avaliar a variação intra-placentária da metilação. Foram analisados quatro cotilédones em cada placenta, levando-se em consideração sua distância em relação à inserção do cordão umbilical (Tabela 9).

Tabela 9. Quantificação da metilação na KvDMR1 em diferentes cotilédones placentários de uma mesma placenta de gestações de 3° trimestre.

Amostra	Cotilédone	Posição	Metilação
Plc 12	C1	Periférico	0,49
	C2	Central	0,40
	C7	Periférico	0,36
	C8	Central	0,43
Plc 13	C2	Periférico	0,50
	C5	Central	0,41
	C9	Periférico	0,30
	C10	Central	0,44
Plc 14	C4	Periférico	0,35
	C5	Periférico	0,50
	C6	Central	0,44
	C9	Central	0,43
Plc 15	C5	Central	0,48

C7	Central	0,47
C9	Periférico	0,47
C12	Periférico	0,45

O gráfico 3 apresenta a variabilidade dos valores de metilação encontrados nos diferentes cotilédones dentro da mesma placenta. O gráfico 4 mostra a variação de metilação de acordo com o posicionamento do cotilédone dentro do disco placentário para cada placenta. Apesar da variação intra-placentária, como pode ser visto nas amostras Plc 12, Plc 13 e Plc 14, os testes estatísticos F e *t*, aplicados para verificar a diferença de metilação entre os cotilédones centrais e periféricos nas quatro placentas não foram significativos (ambos com $p=0,7131$).

Gráfico 3. Representação gráfica para a variação de metilação encontrada na KvDMR1 entre os diferentes cotilédones placentários para cada uma das placentas (Plc 12 – Plc 15). As caixas representam o intervalo interquartil (IQ) para os quatro cotilédones avaliados por placenta. As linhas verticais representam os últimos dados dentro de $\pm 1,5$ vezes o IQ e as barras horizontais indicam as medianas.

Gráfico 4. Representação gráfica para a variação de metilação encontrada na KvDMR1 de acordo com a posição (central ou periférica) dos cotilédones placentários para cada uma das placentas (Plc 12 – Plc 15).

Como última análise, a comparação das médias de metilação referentes às vilosidades coriônicas do 1º e do 3º trimestre realizadas por meio dos testes F e *t*, não foram estatisticamente significativos (ambos com $p=0,1706$).

Todas as análises estatísticas realizadas pelo programa SAS podem ser encontradas nos ANEXOS de B a D.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A placenta é um dos mais importantes sítios de atuação dos genes marcados e mesmo sendo um órgão de extrema importância para o desenvolvimento fetal, alguns estudos têm demonstrado que a regulação de genes sob o *imprinting* genômico parece ser menos estável na placenta do que em tecidos adultos ou embrionários (BOURQUE et al., 2010) indicando um perfil epigenético único neste órgão (MACCANI; MARSIT, 2009).

Neste trabalho, para acompanhar os perfis de metilação da H19DMR e da KvDMR1 ao longo da gestação, foram avaliadas amostras de vilosidade coriônica de placentas em diferentes idades gestacionais (1° e 3° trimestre). A investigação da variabilidade intra-placentária foi realizada pela avaliação de quatro placentas de 3° trimestre, sendo coletados quatro cotilédones por placenta, de acordo com suas posições em relação à inserção do cordão umbilical. Para verificar a correlação dos perfis de metilação entre tecidos de diferentes linhagens, foram avaliadas amostras de cordão umbilical (origem embrionária) e de vilosidade coriônica (origem extraembrionária) em placentas de 1° trimestre. Adicionalmente, foi excluída a presença da hidroximetilação na KvDMR1 em placentas de 3° trimestre.

Os ensaios qualitativos COBRA (para a H19DMR) e MS-PCR (para a KvDMR1) utilizados nas placentas de 3° trimestre apresentaram resultados condizentes com o padrão de metilação normal para as DMRs, as quais estão sujeitas ao fenômeno do *imprinting*, por demonstrarem a presença de alelos metilados e não metilados (Figuras 7 e 10).

No ensaio COBRA, além da presença de alelos metilados e não metilados, após a digestão, pôde ser evidenciado a existência de dinucleotídeos CpGs diferentemente metilados presentes na região em estudo da H19DMR em placentas a termo. Na figura 7, observa-se que as amostras Plc 2 e Plc 5 apresentam um padrão de digestão diferente das restantes, com o aparecimento de apenas duas bandas após a digestão.

Coolen e colaboradores (2011) encontraram grande variabilidade nos níveis de metilação individuais de dinucleotídeos CpGs, notavelmente no loco *H19/IGF2*, em amostras de sangue de pares de gêmeos monozigóticos e dizigóticos, sugerindo que a existência da variabilidade nos padrões de metilação podem ter impacto na expressão gênica e possíveis diferenças na susceptibilidade a doenças.

Os resultados do presente trabalho também estão de acordo com o relatado por Woodfine, Huddleston e Murrell (2011), que, ao analisarem várias DMRs associadas ao *imprinting* em sangue periférico humano, notaram que em DMRs paternalmente metiladas (como a H19DMR) existe uma maior variação na metilação individual dos dinucleotídeos CpGs dentro da DMR em comparação a DMRs maternas, enquanto que

as DMRs maternalmente metiladas, como a KvDMR1, apresentaram níveis mais similares de metilação para todos os CpGs ao longo das regiões avaliadas (COOLEN et al. 2011; WOODFINE; HUDDLESTON; MURRELL, 2011).

Em relação à MS-PCR, para a avaliação qualitativa da KvDMR1 nas amostras de 3º trimestre, também foi observado um padrão de metilação monoalélico. Esta técnica, apesar de pouco utilizada nos últimos anos, foi empregada por Sazhenova e Lebedev (2008) para discutir o impacto de epimutações no padrão de metilação da KvDMR1 em placentas provenientes de abortos terapêuticos e espontâneos de 1º trimestre gestacional. Como observado no presente trabalho, os autores também encontraram um padrão de metilação monoalélica para as amostras analisadas, com exceção de 9,5% dos abortos espontâneos, nos quais observaram que o padrão de metilação da KvDMR1 foi hipometilado, devido à presença de epimutações (SAZHENOVA; LEBEDEV, 2008).

Como observado no presente estudo, os resultados gerados pela MS-PCR permitem acessar o perfil de metilação da região KvDMR1 e em alguns trabalhos, esta técnica pode funcionar como um método de triagem para identificar alterações (mutações ou epimutações) em regiões diferencialmente metiladas (SAZHENOVA; LEBEDEV, 2008). Porém, apesar de ser uma técnica capaz de detectar padrões específicos de metilação do DNA, a MS-PCR é um método sensível e qualitativo e, portanto, uma análise quantitativa pode ser necessária para validar seus resultados (LAIRD, 2003).

A PCR em tempo real associada à utilização de enzima sensível à metilação, da maneira descrita na metodologia deste trabalho, foi descrita pela primeira vez pelo Grupo de Epigenética e Reprodução da FMRP-USP, sendo na época denominado de DESM-RT. Esta técnica permite avaliar pontualmente dinucleotídeos metilados presentes em sítios de restrição de enzimas endonucleases (GOMES et al., 2007). Este método foi empregado em todas as amostras de tecidos obtidas para o 1º e 3º trimestres gestacionais.

Em geral os métodos empregados para a análise de metilação são baseados em duas técnicas: a conversão por bissulfito de sódio ou a digestão com enzimas de restrição sensíveis a metilação (LAIRD, 2003). Em comparação a outros métodos como COBRA, MS-PCR, pirosequenciamento e sequenciamento pós modificação de produtos clonados da amplificação por PCR, a DESM-RT não exige a etapa prévia de modificação do DNA por bissulfito de sódio.

As técnicas de sequenciamento pós modificação e pirosequenciamento têm sido recentemente consideradas como padrão-ouro para a análise da metilação do DNA. O sequenciamento genômico pós bissulfito de produtos clonados fornece informações detalhadas do padrão de distribuição da 5-mC ao longo da cadeia de DNA (LAIRD, 2003). A análise de metilação por pirosequenciamento permite diferenciar alelos

metilados e não metilados mesmo em baixas frequências, e quantificar até pequenas mudanças nos níveis de metilação de um determinado fragmento genômico (RONAGHI, 2011).

Porém, alguns trabalhos têm demonstrado a presença da base 5-hmC em tecidos de cérebro e células tronco embrionárias de camundongos (KRIAUCIOUNIS; HEINTZ, 2009; TAHILIANI et al., 2009). A presença da 5-hmC pode gerar falsos resultados em estudos de metilação baseados na modificação do DNA por bissulfito de sódio, visto que estes não são capazes de distinguir entre as bases metiladas e hidroximetiladas (HUANG et al., 2010).

A distribuição da 5-hmC ainda não foi rigorosamente explorada na maior parte dos tecidos embrionários e adultos. Com um ensaio imunohistoquímico para a detecção global da 5-hmC em vários tecidos humanos e de camundongos, Haffner e colaboradores (2011) foram capazes de observar que a 5-hmC estava altamente correlacionada com a diferenciação celular sendo que as células mais diferenciadas apresentavam os mais altos níveis de marcação para a 5-hmC. Além disso, mostraram uma perda quase uniforme da base hidroximetilada em tecidos cancerosos quando comparados com seus tecidos normais, sugerindo um complexo papel da 5-hmC na diferenciação tecidual e na neoplasia (HAFFNER et al., 2011).

No presente estudo, no qual foi utilizado um kit comercial para a detecção da 5-hmC, os resultados foram negativos para a presença de hidroximetilação na região KvDMR1 em placentas de 3º trimestre ao menos nos dinucleotídeos avaliados. Em outro estudo conduzido por Li e Liu (2011) sobre a distribuição global da 5-hmC em diferentes tecidos humanos por meio de imunoensaio, foram relatados níveis abundantes de sítios hidroximetilados em tecidos de cérebro, rim, cólon, reto e fígado (0,40-0,65%), enquanto em placenta os níveis foram significativamente reduzidos (0,06%). Tais informações, reforçam os presentes resultados para a ausência de hidroximetilação na KvDMR1 em placentas, demonstrando que a análise do perfil de metilação da KvDMR1 do presente trabalho avaliou sítios metilados (5-mC) e não houve contaminação por sítios hidroximetilados (5-hmC).

A placenta humana passa por diversas mudanças fisiológicas, como a transição para normóxia do 1º ao 2º trimestre, diminuição da invasão trofoblástica na decídua materna (LYALL, 2005; NOVAKOVIC et al., 2011) e mudanças morfológicas ao longo da gestação, já que no início da gravidez o peso da placenta é mais alto e aumenta mais rapidamente que o peso do feto, mas no meio da gestação, o crescimento da placenta torna-se desacelerado até o final da gestação enquanto o feto continua com o aumento do ganho de peso (SITRAS et al., 2012). Tem sido evidenciado que modificações epigenéticas em genes marcados têm efeitos diretos no tamanho e na morfologia

placentária bem como na capacidade de transporte de nutrientes da placenta (FOWDEN et al., 2010).

A avaliação quantitativa por DESM-RT do perfil de metilação da H19DMR em vilosidade coriônica de 1º trimestre resultou em média de metilação de $0,43 \pm 0,25$ enquanto no 3º trimestre foi encontrada $0,41 \pm 0,15$. Os testes estatísticos não mostraram diferenças significativas entre as médias de metilação dos períodos gestacionais, indicando que não houve alterações significativas no perfil de metilação da H19DMR em placentas de diferentes idades gestacionais (precoces e a termo).

Até o momento, são poucos os trabalhos na literatura que avaliaram o padrão de *imprinting* e o perfil de metilação da H19DMR em diferentes períodos gestacionais (JINNO et al., 1995; LAMBERTINI et al., 2008; YU et al., 2009; POZHARNY et al., 2010). No Brasil, a escassez de estudos em placentas de 1º trimestre deve-se principalmente às dificuldades para se obter coletas de tecidos gestacionais mais precoces. Esse problema é consequência das restrições impostas pela legislação brasileira sobre os abortos terapêuticos (ou seja, sem a indicação médica para interrupção da gravidez) sendo que esse tipo de prática é permitido apenas em casos especiais. Por outro lado, material proveniente de aborto espontâneo pode possuir anormalidades genéticas e epigenéticas que não corresponderiam ao progresso e a programação de uma gestação normal. No presente estudo, as amostras oriundas de gestações precoces foram obtidas pela parceria com o grupo holandês, visto que na Holanda o aborto terapêutico é legalizado.

No trabalho de Jinno e colaboradores (1995), foi avaliado o status de metilação no promotor e na região 3' UTR do gene *H19* em tecidos placentários de diferentes idades gestacionais por ensaios de restrição enzimática e *Southern blotting*. Nesta pesquisa, a região promotora do gene *H19* mostrou-se hipometilada ao longo da gestação enquanto a porção na região 3' UTR mostrou progressivo ganho de metilação em todos os estágios do desenvolvimento. Guo e colaboradores (2008) também demonstraram a hipometilação do promotor deste gene, exclusivamente em placentas humanas, na presença de uma H19DMR diferencialmente metilada, enquanto que, em sangue neonatal, o promotor de *H19* manteve-se diferencialmente metilado no alelo paterno como visto para a maior parte dos tecidos humanos.

Para placentas precoces, apesar de não existirem muito trabalhos que examinaram o perfil de metilação da H19DMR, quatro estudos relataram diferenças consideráveis no padrão de *imprinting* e expressão dos genes que estão sob o domínio desta DMR. Os trabalhos de Jinno e colaboradores (1995) e YU e colaboradores (2009) mostraram a perda de *imprinting* e expressão bialélica do gene *H19* restrita a placentas com até 10 semanas de gestação não interferindo nos níveis de expressão de *IGF2*.

Pozharny e colaboradores (2010) observaram uma alta taxa de perda de *imprinting*, embora tenha sido visto pouca diferença na expressão gênica, para vários genes marcados em placentas de 1º trimestre quando comparadas ao 3º trimestre, incluindo o gene *H19*. Porém, a mesma perda não foi encontrada para o gene *IGF2*. Esses resultados sugerem que o *imprinting* do domínio *H19-IGF2* deve ser regulado por diferentes moléculas intermediárias na placenta quando comparada com outros tecidos (GUO et al., 2008) e que as mudanças no padrão de *imprinting* durante o desenvolvimento, sem necessariamente afetar a expressão gênica, teria um papel importante na maturação e no desenvolvimento da placenta (POZHARNY et al., 2010). Lambertini e colaboradores (2008) também sugerem de que a perda de *imprinting* seria um fenômeno comum em placentas humanas, porém em seus resultados não observaram a perda de *imprinting* no gene *H19*.

Em relação a placentas a termo, os resultados para a metilação da H19DMR encontrados neste trabalho são corroborados, por serem muito semelhantes, por diversos trabalhos na literatura, como o de Guo e colaboradores (2008) com um índice de metilação de $0,47 \pm 0,07$, Bouque e colaboradores (2010) com $0,36 \pm 0,03$ e Woodfine, Huddleston e Murrell (2011) com 0,45 para o perfil de metilação da H19DMR em placentas a termo.

Em humanos, a perda de metilação da KvDMR1, que leva à expressão bialélica do *LIT1*, está associada à SBW, caracterizada por hipercrecimento intrauterino e pós-natal (GOMES et al., 2007). Ainda são poucos os trabalhos que tratam sobre a evolução do perfil de metilação da KvDMR1 na placenta humana durante a gestação assim como em períodos mais precoces do desenvolvimento (MONK et al., 2006; GUO et al., 2008).

No presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas no perfil de metilação da KvDMR1 entre as placentas de 1º trimestre e 3º trimestre, sugerindo então que a metilação nesta região seria constante ao longo da gestação. As médias de metilação nos tecidos de vilosidade coriônica para esses períodos gestacionais foram de $0,47 \pm 0,13$ para o 1º trimestre e $0,41 \pm 0,08$ para o 3º trimestre.

Monk e colaboradores (2006) avaliaram o padrão de *imprinting* da KvDMR1 em placentas de 1º e 3º trimestre por meio de sequenciamento de DNA modificado por bissulfito de sódio. Foram analisadas a metilação e a expressão gênica neste domínio e esses autores constataram que não houve diferenças significativas no perfil de metilação sendo que a KvDMR1 manteve seu status de diferencialmente metilada em ambos os períodos gestacionais.

Em placentas de 3º trimestre, Guo e colaboradores (2008) encontraram um valor semelhante ao do presente trabalho para a metilação na KvDMR1 (índice de metilação de $0,48 \pm 0,07$) por meio de digestão enzimática sensível à metilação combinado com

Southern blotting. Woodfine, Huddleston e Murrell (2011), ao realizar um estudo quantitativo de várias regiões marcadas em humanos, também obtiveram valores próximos aos aqui apresentados para a KvDMR1 (0,4225) em placentas a termo. Diferentemente, Bourque e colaboradores (2010) encontraram uma média de metilação de $0,65 \pm 0,34$ para a KvDMR1 em placentas a termo por meio de pirosequenciamento.

Assim como para a H19DMR, poucos trabalhos avaliaram a metilação na KvDMR1 em placentas de 1º trimestre, apenas a expressão gênica dos genes sob seu domínio. Pozharny e colaboradores (2010) demonstraram que especialmente em placentas de 1º trimestre, vários genes marcados incluindo o gene *PHLDA2* sob o domínio da KvDMR1, apresentaram uma significativa perda de *imprinting* (expressão bialélica) quando comparadas à placentas a termo.

Recentemente, Frost e colaboradores (2010), ao investigarem a expressão quantitativa de 36 genes marcados em leucócitos de sangue periférico em humanos, encontraram um padrão de *imprinting* alterado para a KvDMR1. Sabe-se que o transcrito do gene *KCNQ1OT1* (ou *LIT1*) é um ncRNA envolvido com a regulação e o silenciamento de outros genes presentes no domínio da KvDMR1 e que a expressão bialélica deste ncRNA, advinda da perda de metilação na DMR, foi associada à SBW. Apesar de Frost e colaboradores (2010) não observarem alterações na metilação da KvDMR1, que se manteve entre 0,35 e 0,50 metilada em sangue periférico, o gene *LIT1* mostrou expressão bialélica, assim como *SLC22A18* e *KCNQ1* que deveriam ter sua expressão silenciada devido à perda do padrão de *imprinting* na KvDMR1.

Essas informações sugerem que exista um desacoplamento da metilação e da expressão de genes marcados, indicando que outros mecanismos epigenéticos, tais como modificação de histonas e ncRNAs podem estar envolvidos no padrão de *imprinting* de genes marcados (MONK et al., 2006; LAMBERTINI et al., 2008; FROST et al., 2010). Essa regulação epigenética para a expressão gênica pode prover um mecanismo essencial à placenta permitindo-a atuar como atenuadora das consequências de uma variedade de condições ambientais e genéticas (PEÑAHERRERA et al., 2012). Portanto, apesar de não termos encontrado no presente estudo, alterações no perfil de metilação da KvDMR1 e da H19DMR, a hipótese de que o *imprinting* placentário seja dinâmico ao longo da gestação não deve ser descartada.

Outra importante análise deste estudo foi averiguar a existência de mosaicismo na placenta. Kalousek e Dill (1983) já relatavam a ocorrência do mosaicismo confinado à placenta, nos quais se observavam a presença de duas ou mais linhagens celulares diferentes do ponto de vista cromossômico dentro da placenta enquanto o feto por sua vez era geralmente diploide. Yuen e Robinson (2011) afirmaram que a placenta é desigual em termos de origem celular, de tal modo, que as células clonalmente derivadas

de um blastocisto progenitor comum tendem a serem localizadas próximas umas das outras. Para investigar as causas do mosaicismo é importante entender como a variabilidade celular, epigenética e de expressão gênica estão normalmente distribuídas dentro da placenta.

Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado que esse alto grau de variabilidade intra-placentário também ocorre na metilação do DNA, especialmente em genes marcados (AVILA et al., 2010; BOURQUE et al., 2010; TURAN et al., 2010; YUEN; ROBINSON, 2011; PEÑAHERRERA et al., 2012) assim como para a inativação do cromossomo X (MOREIRA DE MELLO et al., 2010). No presente estudo, em quatro placentas a termo, foi verificado o perfil de metilação da H19DMR e da KvDMR1 em quatro diferentes cotilédones distribuídos no disco placentário. Tanto para a ICR1 (Gráfico 1 e 2) quanto para a ICR2 (Gráfico 3 e 4) não foram observadas diferenças quanto ao perfil de metilação dentro da placenta mesmo em relação à distância da inserção do cordão umbilical.

Bourque e colaboradores (2010) avaliaram a metilação da ICR1 e ICR2 em dois sítios distintos dentro da mesma placenta coletada e observaram que a ICR1 mostrou-se mais variável entre os sítios amostrados do que a ICR2 que apresentou uma forte correlação intra-placentária. Turan e colaboradores (2010) e Peñaherrera e colaboradores (2012) também demonstraram que o domínio da H19DMR apresenta um alto grau de variação sítio-a-sítio dentro da mesma placenta, porém a mesma avaliação não foi feita para a KvDMR1.

Alguns autores discutem que a origem de tal variabilidade dentro da placenta pode não seguir um padrão de desenvolvimento determinado, ou seja, o estado da metilação não seria apenas configurado no embrião pré-implantação e mantido de forma estável nas divisões subsequentes, como ocorre para a inativação do cromossomo X (KATARI et al., 2009), mas ao contrário, essa variação teria surgido após a formação da árvore vilosa e portanto, ser resultado de influências mais localizadas (PEÑAHERRERA et al., 2012). Logo, mudanças na metilação entre diferentes sítios dentro da mesma placenta podem ocorrer durante a gestação em resposta a efeitos ambientais, como por exemplo, o suplemento de nutrientes (ANGIOLINI et al., 2006).

Como o fenômeno de *imprinting* genômico, a inativação do cromossomo X durante o desenvolvimento é encontrada apenas em mamíferos placentários, alguns estudos têm revelado mecanismos paralelos entre ambos e a sua co-evolução em relação ao o desenvolvimento da placenta (REIK; LEWIS, 2005, MONK et al., 2006). Um recente estudo sobre inativação do cromossomo X em placentas a termo demonstrou não apenas que a origem parental do X inativado é aleatória em humanos, mas que o órgão é

um mosaico para o padrão de inativação do X por apresentar variação intra-placentária (MOREIRA DE MELLO et al., 2010).

Provavelmente, um aumento no número amostral de cotilédones assim como no número de placentas analisadas poderá demonstrar uma diferença estatisticamente significativa em relação ao perfil de metilação destas regiões distribuídas ao longo do disco placentário, principalmente para a KvDMR1 para a qual existem poucas informações na literatura.

Os dados sobre a variação da metilação entre tecidos placentários de diferentes linhagens também foram investigados neste trabalho. Para a H19DMR foram obtidas médias de metilação de $0,43 \pm 0,25$ para vilosidade coriônica e de $0,31 \pm 0,18$ para o cordão umbilical não sendo encontrada diferenças estatisticamente significativas para a metilação desta região entre os tecidos. Bourque e colaboradores (2010) também examinaram a metilação da ICR1, entre vilosidade coriônica e âmnio e não encontraram diferenças significativas entre os tecidos oriundos de gestações a termo ($0,36 \pm 0,30$ e $0,35 \pm 0,29$, respectivamente).

Para a KvDMR1 as médias de metilação para vilosidade coriônica foram de $0,47 \pm 0,13$ enquanto para cordão umbilical, $0,57 \pm 0,30$. Assim como para a H19DMR não foram encontradas diferenças significativas entre as médias de metilação dos dois tecidos. Guo e colaboradores (2008) trabalhando com placenta e sangue neonatal também não observaram diferenças significativas para os perfis de metilação da H19DMR e KvDMR entre estes tecidos.

Gomes e colaboradores (2007), ao investigar o padrão de metilação da KvDMR1 durante o diagnóstico pré-natal e logo após o nascimento de uma criança com SBW concebida por ICSI (do inglês, *intracytoplasmatic sperm injection*), identificaram um padrão diferencial de metilação, por meio de MS-PCR e DESM-RT entre placenta, sangue de cordão umbilical e células do líquido amniótico, no qual estes dois últimos mostraram-se hipometilados em relação à placenta. Neste caso, os autores argumentam que as diferenças entre os tecidos pode ser devida a um erro epigenético no estabelecimento das marcas na KvDMR1 após o estágio de diferenciação das linhagens embrionárias e extraembrionárias somente nas células de origem embrionárias (sangue de cordão umbilical e fluido amniótico) e não em células de origem extraembrionária (placenta) (GOMES et al., 2007).

Por outro lado, nas nove amostras pareadas, tanto para a H19DMR quanto para a KvDMR1, não foi encontrada uma correlação positiva para os tecidos avaliados, demonstrando que não há influências de um tecido afetando o perfil de metilação do outro. Em outro estudo, Peñaherrera e colaboradores (2012), também ponderaram sobre essa correlação entre diferentes tecidos formados durante a gestação, porém, avaliando

a inativação preferencial do cromossomo X. Os resultados mostraram uma modesta correlação na média da inativação preferencial do cromossomo X para âmnio e córion e entre trofoblasto e mesênquima (componentes da vilosidade coriônica), mas não para outras comparações (PEÑAHERRERA et al., 2011).

Yuen e Robinson (2011) sugerem que a placenta seja um dos únicos órgãos capazes de se adaptar a anormalidades, já que alterações epigenéticas são mais toleradas na placenta do que em tecidos fetais. Isto pode ser evidenciado em alguns casos de trissomia confinado a placenta em que apesar de se observar uma redução no peso placentário, não há associação com anormalidades de crescimento fetal, assim como alterações significantes na taxa de peso feto-placenta (YONG et al., 2009).

Por outro lado, Gomes e colaboradores (2007) que observaram um padrão de metilação hipometilado da KvDMR1 em tecidos de origem embrionária (sangue de cordão umbilical e fluido amniótico) e não na placenta, discutem a ocorrência de uma possível reversão placentária ou correção da anormalidade pelos trofoblasto placentários, uma vez que, no caso descrito por eles, a placenta apresentava o perfil de metilação normal enquanto que o feto apresentava perfil epigenético e fenótipo compatível com a SBW. Como visto por alguns estudos, existe um ganho nos níveis de metilação globais da placenta de acordo com o avanço da idade gestacional (NOVAKOVIC et al., 2011) e isso portanto poderia contribuir para esta adaptação (reversão) da placenta (GOMES et al., 2007).

Destes resultados é possível inferir o perfil epigenético único da placenta em relação aos outros tecidos assim como sua independência para o estabelecimento e manutenção de perfis de metilação em relação a outros tecidos somáticos. A placenta pode, portanto, ajustar o crescimento fetal e placentário em resposta a anormalidades na regulação epigenética e de fatores estocásticos e/ou ambientais (YUEN; ROBINSON, 2011).

A reunião das informações presentes neste estudo fornece subsídios para o entendimento sobre a dinâmica do fenômeno de *imprinting* genômico e os genes sob seu controle ao longo da gestação, o perfil epigenético da placenta em relação a outros tecidos somáticos bem como a ocorrência do mosaicismo placentário.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A análise qualitativa do perfil de metilação da KvDMR1 por MS-PCR apresentou um padrão de metilação monoalélico nas placentas de 3º trimestre.
- A avaliação qualitativa do perfil da H19DMR pelo COBRA foi capaz de identificar a presença de dinucleotídeos CpGs diferentemente metilados presentes nesta região.
- Os perfis de metilação da H19DMR e da KvDMR1 não sofrem alterações significativas em placentas de diferentes estágios da gravidez.
- Não foi verificada a presença de mosaicismo em relação aos perfis de metilação da H19DMR e KvDMR1 em diferentes cotilédones dentro da mesma placenta oriunda de gestações a termo.
- Não foram observadas diferenças nos perfis de metilação da H19DMR e KvDMR1 entre os tecidos de vilosidade coriônica e cordão umbilical (membrana) de placentas de 1º trimestre.
- Em nove amostras pareadas de tecidos oriundos de linhagem embrionária (cordão umbilical) e extraembrionária (vilosidade coriônica), não foi observada correlação positiva para o perfil de metilação da H19DMR e da KvDMR1.
- A presença da hidroximetilação foi excluída da KvDMR1 ao menos nos dinucleotídeos avaliados por este estudo.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGIOLINI, E. et al. Regulation of placental efficiency for nutrient transport by imprinted genes. **Placenta**, v. 27, 2006.

ARIMA, T. et al. ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 8, p. 2650-2660, 2005.

AVILA, L. et al. Evaluating DNA methylation and gene expression variability in the human term placenta. **Placenta**, v. 31, n. 12, p. 1070-1077, 2010.

BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nature Clinical Practice**, v. 2, supl. 1, p. S4-S11, 2005.

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, n.1, p. 46-56, 2006.

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 16, p. 2395-402, 2000.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 24, p. 396-398, 2007.

BOURC'HIS, D. et al. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. **Science**, v. 294, p. 2536-2539, 2001.

BOURQUE, D. K. et al. Decreased Placental Methylation at the H19 / IGF2 Imprinting Control Region is Associated with Normotensive Intrauterine Growth Restriction but not Preeclampsia. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 197-202, 2010.

CHEN, C.; BAJORIA, R.; APLIN, J. D. Decreased vascularization and cell proliferation in placentas of intrauterine growth-restricted fetus abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. **Am J Obstet Gynecol**, v. 187, n. 3, p. 764-769, 2002.

CLARK, S.J. et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acid Res**, v. 22, p. 2990-2997, 1994.

COOLEN, M. W. et al. Impact of the Genome on the Epigenome Is Manifested in DNA Methylation Patterns of Imprinted Regions in Monozygotic and Dizygotic Twins. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25590, 2011.

CONSTANCIA et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. **Nature**, v. 417, p. 945-948, 2002.

DAS, P. M.; SINGAL, R. DNA methylation in cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 22, p. 4632-4642, 2004.

DAMSKY, C. H.; FISHER, S. J. Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 10, n. 5, p. 660-666, 1998.

DELAVAL, K. et al. Epigenetic deregulation of imprinting in congenital diseases of aberrant growth. **Bioessays**, v. 28, n. 5, p. 453-459, 2006.

DIPLAS, A. I. et al. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. **Epigenetics**, v. 4, n. 4, p. 235-240, 2009.

EDWARDS, C. A.; FERGUNSON-SMITH, A. C. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, n. 3, p. 281-289, 2007.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, p. 457-463, 2004.

FITZPATRICK, G. V. et al. Allele-specific binding of CTCF to the multipartite imprinting control region KvDMR1. **Mol Cell Biol**, v. 27, n. 7, p. 2636-47, 2007.

FOWDEN, A. L. et al. The Biology of Fetal Growth Imprinted Genes, Placental Development and Fetal Growth. **Hormone Research**, v. 65, n. suppl 3, p. 50-58, 2006.

FOWDEN, A. L. et al. Imprinted genes and the epigenetic regulation of placental phenotype. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 44, p. 1-8, 2010.

FROST, J. M. et al. Evaluation of allelic expression of imprinted genes in adult human blood. **PLoS One**, v. 5, n.10, p. e13556, 2010.

FROST, J. M.; MOORE, G. E. The Importance of Imprinting in the Human Placenta. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 7, 2010.

GEORGIADES, P.; FERGUNSON-SMITH, A. C.; BURTON, G. J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. **Placenta**, v. 23, p. 3-19, 2002.

GOMES, M.V. et al. Methylation pattern at the KvDMR in a child with Beckwith-Wiedemann syndrome conceived by ICSI. **Am J Med Genet A**, v. 143, n. 6, p. 625-629, 2007.

GUO, L. et al. Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae. **Blood**, v. 320, n. 1, p. 79-91, 2008.

GUDE, N. M. et al. Growth and function of the normal human placenta. **Thromb Res** v. 114, n. 5-6, p. 397-407, 2004.

HAFFNER, M. C. et al. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. **Oncotarget**, v. 2, n. 8, p. 627-637, 2011.

HAKE, S. B. et al. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. **Br J Cancer**, v. 90, p. 761-69, 2004.

HERMAN, J.G. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, p. 9821-9826, 1996.

HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med**, v. 349, n. 21, p. 2042-54, 2003.

HUANG, Y. et al. The Behaviour of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite Sequencing. **America**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2010.

HUPPERTZ, B. The anatomy of the normal placenta. **J Clin Pathol**, v. 61, p. 1296-1302, 2008.

IDERAABDULLAH, F. Y.; VIGNEAU, S.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting mechanisms in mammals. **Mutat Res**, v. 647, n. 1-2, p. 77-85, 2008.

IMPRINTED GENES DATABASE. 2012. Disponível em: <<http://geneimprint.com/site/genes-by-species>>. Acesso em: 15 mai. 2012.

ITO, S. et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. **Nature**, v. 466, n. 7310, p. 1129-33, 2010.

JIN, S. G.; KADAM, S.; PFEIFER, G. P. Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. 11, e125, 2010.

JINNO, Y. et al. Establishment of functional imprinting of the H19 gene in human developing placentae. *Nature Genetics*, v. 10, p. 318-324, 1995.

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

KALOUSEK, D. K.; VEKEMANS, M. Confined placental mosaicism. **Pathology**, v. 33, n. 7, p. 529-533, 1996.

KATARI, S. et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived *in vitro* or *in vitro*. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 20, p. 3769-3778, 2009.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, p. 693–705, 2007.

KRIAUCIONIS, S.; HEINTZ, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 929-30, 2009.

LAIRD, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews*, v. 3, p. 253-266, 2003.

LAMBERTINI, L. et al. A sensitive functional assay reveals frequent loss of genomic imprinting in human placenta. **Epigenetics**, v. 3, p. 261-269, 2008.

LEE, M. P. et al. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KvLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin growth factor II imprinting. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 5203-5208, 1999.

LI, W.; LIU, M. Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine in Different Human Tissues. *Journal of Nucleic Acids*, v. 2011, p. 1-5, 2011.

LYALL, F. Priming and Remodelling of Human Placental Bed Spiral Arteries During Pregnancy – A Review. **Placenta**, A:S31-6, 2005.

MACCANI, M.; MARSIT, C. J. Epigenetics in the placenta. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 62, p. 78-89, 2009.

MCMINN, J. et al. Unbalanced Placental Expression of Imprinted Genes in Human Intrauterine Growth Restriction. **Placenta**, v. 27, n. 6-7, p. 540-549, 2006.

MOHN, F.; SCHUBELER, D. Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation. **Trends Genet**, v. 25, n. 3, p. 129-136, 2009.

MOORE, T. Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. **Reproduction**, v. 122, p. 185-193, 2001.

MONK, D. et al. Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta. **PNAS**, v. 103, n. 17, p. 6623-6628, 2006.

MOREIRA DE MELLO, J. C. et al. Random X Inactivation and Extensive Mosaicism in Human Placenta Revealed by Analysis of Allele-Specific Gene Expression along the X Chromosome. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e10947, 2010.

NELISSEN, E. C. M. et al. Epigenetics and the placenta. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 3, p. 397-417, 2011.

NOVAKOVIC, B. et al. Evidence for widespread changes in promoter methylation profile in human placenta in response to increasing gestational age and environmental/stochastic factors. **BMC Genomics**, v. 12, n. 529, p. 1-14, 2011.

NOMURA, A. et al. Discrimination between 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine by a chemically designed peptide. **Chemical communications**, v. 47, n. 29, p. 8277-8279, 2011.

OKANO, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, p. 247-257, 1999.

OLERUP, O; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, v. 39, n. 5, p. 225-35, 1992.

PEÑAHERRERA, M. S. et al. Patterns of placental development evaluated by X chromosome inactivation profiling provide a basis to evaluate the origin of epigenetic variation. *Human Reproduction*, v. 27, n. 6, p. 1745-1753, 2012.

POZHARNY, Y. et al. Genomic loss of imprinting in first-trimester human placenta. **American Journal of obstetrics and gynecology**, v. 202, n. 4, p. 391.e1-391, 2010.

RAMSAHOYE, B. H. et al. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. **PNAS**, v.97, n. 10, p. 5237-5242, 2000.

REIK, W.; LEWIS, A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 5, p. 403-410, 2005.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089-93, 2001.

REIK, W. et al. Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. **J Physiol**, v. 547, p. 35-44, 2003.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 24, p. 425-432, 2007.

ROBERTSON, K. D.; JONES, P. A. DNA methylation: past, present and future directions. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 461-467, 2000.

ROBINSON, W. P. et al. Origin and outcome of pregnancies affected by androgenetic / biparental chimerism. **Human Reproduction**, v. 22, n. 4, p. 1114-1122, 2007.

RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Res**, v. 11, p. 3-11, 2011.

ROSA, H. S.; CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **Eur J Cancer**, v. 41, p. 2381-402, 2005.

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

RUSSO, V. E. A.; MARTUENSSEN, R. A.; RIGGS, A. D. (eds) **Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, 1996.

SAZHENOVA, E. A.; LEBEDEV, I. N. Epimutations of the KCNQ1OT1 Imprinting Center of Chromosome 11 in Early Human Embryo lethality. *Russian Journal of Genetics*, v. 44, n. 12, p. 1394-1399, 2008.

SHARMA, S. et al. Epigenetic in cancer. **Carcinogenesis**. v. 31, p. 27-36, 2010.

SINGAL, R.; GINDER, G. D. DNA methylation. **Blood**, v. 93, n. 12, p. 4059-4070, 1999.

SITRAS, V. et al. Differences in gene expression between first and third trimester human placenta: a microarray study. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. e33294, 2012.

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

TAHILIANI, M. et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, v. 324, n. 5929, p. 930-5, 2009.

TILGHMAN, S. M. et al. Elongation of the Kcnq1ot1 transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. **Genes & Dev**, v. 20, p. 1268-1282, 2006.

TURAN, N. et al. Inter- and Intra-Individual Variation in Allele-Specific DNA Methylation and Gene Expression in Children Conceived using Assisted Reproductive Technology. **PLoS Genet**, v. 6, n. 7, p. e1001033, 2010.

VALINLUCK, V. et al. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of MeCP2. **Nucleic Acids Res**, v. 32, p. 4100–4108, 2004.

VALINLUCK, V.; SOWERS, L. C. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. **Cancer research**, v. 67, n. 3, p. 946-50, 2007.

WADDINGTON, C. H. Canalization of development and the inheritance of the acquired characters. **Nature**, v. 150, n. 3811, p. 563-565, 1942.

WAGGONER, D. Mechanisms of disease: epigenesis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 14, n. 1, p. 7-14, 2007.

WAGSCHAL, A.; FEIL, R. Genomic imprinting in the placenta. **Cytogenet Genome Res**, v. 113, n. 1-4, p. 90-98, 2006.

WALTER, J. An Epigenetic Tet a Tet with Pluripotency. **Cell**, v. 8, n. 2, p. 121-122, 2011.

WILLIAMS, K.; CHRISTENSEN, J.; HELIN, K. DNA methylation: TET proteins—guardians of CpG islands?. **Embo Reports**, v. 13, n. 1, p. 28-35, 2011.

WOODFINE, K.; HUDDLESTON, J. E.; MURREL, A. Quantitative analysis of DNA methylation at all human imprinted regions reveals preservation of epigenetics stability in adult somatic tissue. **Epigenetics & Chromatin**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2011.

WU, H.; ZHANG, Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. **Genes & Development**, v. 25, p. 2436-2452, 2011.

XIONG, Z.; LAIRD, P. W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. **Nucleic Acids Res**, v. 25, p. 2532-2534, 1997.

YONG, P. J. et al. Placental weight in pregnancies with trisomy confined to the placenta. **J. Obstet. Gynaecol. Can**, v. 31, n. 7, p. 605-610, 2009.

YU, L. et al. The H19 gene imprinting in normal pregnancy and pre-eclampsia. **Placenta**, v. 30, p. 443–7, 2009.

YUEN, R. K. C.; ROBINSON, W P. A high capacity of the human placenta for genetic and epigenetic variation : Implications for assessing pregnancy outcome. **Placenta**, v. 32, suppl 2, p. S136-141, 2011.

ZHOU, Y. et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?. **J Clin Invest**, v. 99, n. 9, p. 2139–2151, 1997.

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 ALEGRE
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 (coihidos 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

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: 19401 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE-0091.0.004.000-04

Processo nº 25000.080982/2004-11

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

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 292/98, 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

Anexo B: Perfil de metilação da H19DMR e KvDMR1 entre o 1º e 3º trimestre.**Comparacao 1º Trimestre vs 3º Trimestre**

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Trat	2	1T 3T

Number of Observations Read 25
 Number of Observations Used 25
 Comparacao 1º Trimestre vs 3º Trimestre

The GLM Procedure

Dependent Variable: KvDMR1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	1	0.02112267	0.02112267	2.00
Error	23	0.24285333	0.01055884	
Corrected Total	24	0.26397600		

Pr > F

0.1706

R-Square	Coeff Var	Root MSE	KvDMR1 Mean
0.080017	23.54634	0.102756	0.436400

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
--------	----	-------------	-------------	---------

Pr > F

Trat	1	0.02112267	0.02112267	2.00
------	---	------------	------------	------

0.1706

The GLM Procedure

Dependent Variable: H19DMR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	1	0.00317400	0.00317400	0.08
Error	23	0.92017000	0.04000739	

Pr > F

0.7807

Corrected Total 24 0.92334400

R-Square Coeff Var Root MSE H19DMR Mean
0.003438 47.26335 0.200018 0.423200

Source DF Type III SS Mean Square F Value
Pr > F

Trat 1 0.00317400 0.00317400 0.08
0.7807

Comparacao 1º Trimestre vs 3º Trimestre

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for KvDMR1

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error

rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 23
Error Mean Square 0.010559
Critical Value of t 2.06866
Least Significant Difference 0.0868
Harmonic Mean of Cell Sizes 12

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	Trat
A	0.47200	10	1T
A			
A	0.41267	15	3T

Comparacao 1º Trimestre vs 3º Trimestre

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for H19DMR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error

rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 23
Error Mean Square 0.040007
Critical Value of t 2.06866

Least Significant Difference 0.1689
 Harmonic Mean of Cell Sizes 12

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	Trat
A	0.43700	10	1T
A			
A	0.41400	15	3T

Comparacao 1º Trimestre vs 3º Trimestre

The GLM Procedure
 Least Squares Means

H0:LSMean1=		KvDMR1		Standard		H0:LSMEAN=0		LSMean2	
t		Trat	LSMEAN	Error		Pr > t		Pr >	
0.1706		1T	0.47200000	0.03249437		<.0001			
		3T	0.41266667	0.02653154		<.0001			
H0:LSMean1=		H19DMR		Standard		H0:LSMEAN=0		LSMean2	
t		Trat	LSMEAN	Error		Pr > t		Pr >	
0.7807		1T	0.43700000	0.06325140		<.0001			
		3T	0.41400000	0.05164455		<.0001			

Anexo C: Perfil de metilação da H19DMR e KvDMR1 entre vilosidade coriônica e cordão umbilical.

Comparacao Vilosidade (V) X Cordao (C)

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Trat	2	C V

Number of Observations Read	19
Number of Observations Used	19
Comparacao Vilosidade (V) X Cordao (C)	

The GLM Procedure

Dependent Variable: KvDMR1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	1	0.04864000	0.04864000	0.92
0.3504				
Error	17	0.89676000	0.05275059	
Corrected Total	18	0.94540000		

R-Square	Coeff Var	Root MSE	KvDMR1 Mean
0.051449	44.16826	0.229675	0.520000

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
Trat	1	0.04864000	0.04864000	0.92
0.3504				

Dependent Variable: H19DMR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	1	0.06608006	0.06608006	1.33
0.2641				
Error	17	0.84209889	0.04953523	
Corrected Total	18	0.90817895		

R-Square	Coeff Var	Root MSE	H19DMR Mean
0.072761	58.40797	0.222565	0.381053

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
Trat	1	0.06608006	0.06608006	1.33
0.2641				

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for KvDMR1

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error

rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	17
Error Mean Square	0.052751
Critical Value of t	2.10982
Least Significant Difference	0.2226
Harmonic Mean of Cell Sizes	9.473684

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	Trat
A	0.5733	9	C
A			
A	0.4720	10	V

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for H19DMR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error

rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	17
Error Mean Square	0.049535
Critical Value of t	2.10982

Least Significant Difference 0.2158
 Harmonic Mean of Cell Sizes 9.473684

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	Trat
A	0.4370	10	V
A			
A	0.3189	9	C

Comparacao Vilosidade (V) X Cordao (C)

The GLM Procedure
 Least Squares Means

H0:LSMean1=		KvDMR1 LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr > t	LSMean2 Pr >
t	Trat				
0.3504	C	0.57333333	0.07655832	<.0001	
	V	0.47200000	0.07262960	<.0001	

H0:LSMean1=		H19DMR LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr > t	LSMean2 Pr >
t	Trat				
0.2641	C	0.31888889	0.07418837	0.0005	
	V	0.43700000	0.07038127	<.0001	

Anexo D: Perfil de metilação da H19DMR e KvDMR1 entre cotilédones centrais e periféricos.

Comparacao Comparação Cotiledones: Central X Periferico

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Trat	2	Cen Peri

Number of Observations Read	16
Number of Observations Used	16

The GLM Procedure

Dependent Variable: KvDMR1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	1	0.00050625	0.00050625	0.14
Error	14	0.05033750	0.00359554	
Corrected Total	15	0.05084375		
R-Square	Coeff Var	Root MSE	KvDMR1 Mean	
0.009957	13.88429	0.059963	0.431875	

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
Trat	1	0.00050625	0.00050625	0.14
0.7131				

The GLM Procedure

Dependent Variable: H19DMR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	1	0.00765625	0.00765625	1.66
Error	14	0.06458750	0.00461339	
0.2185				

Corrected Total 15 0.07224375

R-Square Coeff Var Root MSE H19DMR Mean
 0.105978 18.96599 0.067922 0.358125

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
Trat	1	0.00765625	0.00765625	1.66
				0.2185

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for KvDMR1

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error

rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	14
Error Mean Square	0.003596
Critical Value of t	2.14479
Least Significant Difference	0.0643

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	Trat
A	0.43750	8	Cen
A			
A	0.42625	8	Peri

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for H19DMR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error

rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	14
Error Mean Square	0.004613
Critical Value of t	2.14479
Least Significant Difference	0.0728

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	Trat
A	0.38000	8	Cen
A			
A	0.33625	8	Peri

Comparacao Comparação Cotiledones: Central X Periferico

The GLM Procedure
Least Squares Means

H0:LSMean1=		KvDMR1 LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr > t	LSMean2 Pr >
t	Trat				
	Cen	0.43750000	0.02120005	<.0001	
0.7131	Peri	0.42625000	0.02120005	<.0001	

H0:LSMean1=		H19DMR LSMEAN	Standard Error	H0:LSMEAN=0 Pr > t	LSMean2 Pr >
t	Trat				
	Cen	0.38000000	0.02401404	<.0001	
0.2185	Peri	0.33625000	0.02401404	<.0001	