UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA

ANDRÉ ROCHA BARBOSA

**Comparação de redes de regulação genica da placenta em resposta a exposição ao
estresse entre sexos**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil
(CAPES)

São Paulo

2020

Comparação de redes de regulação genica da placenta em resposta a exposição ao estresse entre sexos

Versão Original

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioinformática
Orientador: Profa. Dra. Helena Brentani

RESUMO

Transtornos psiquiátricos apresentam altas taxas de agregação familiar, indicando um papel de variantes genéticas em sua etiologia. No entanto, influências ambientais têm sido repetidamente implicadas como fatores contribuintes para essas doenças. Estudos em humanos e modelos animais vêm mostrando que a exposição a fatores de risco intra uterino alteram o desenvolvimento fetal, com efeitos na programação do cérebro, aumentando o risco para doenças no pós-natal. A mediação e resposta aos estímulos ambientais adversos para o desenvolvimento, são realizadas pela placenta. Postula-se que essa modulação da resposta ocorra através de mecanismos epigenéticos e seja sexo-específica. Uma classe de genes que está sob esse mecanismo de regulação e é importante nesta mediação são os genes imprintados. Recentemente observou-se que existe uma sincronia de co-expressão desses genes entre cérebro e placenta, e que mediante a privação alimentar materna, ocorre alteração da expressão dos genes imprintados somente na placenta, preservando a expressão no cérebro fetal, evidenciando a importância desses genes na modulação da resposta ao estresse. Desta forma, os processos regulatórios que ocorrem com genes imprintados na placenta parecem ser importantes para o desenvolvimento do cérebro fetal. Interessantemente, a modulação da resposta ao ambiente parece alterar o perfil de metilação e de expressão de clusters imprintados, de forma diferente entre os sexos. Assim no trabalho abordado na presente tese, nossa hipótese é de que a diferente susceptibilidade dos sexos a transtornos do neurodesenvolvimento, deve ser pelo menos em parte, explicada pela modulação do imprintoma placentário na resposta sexo-específica ao estresse.

Abstract

Psychiatric disorders have high rates of familial aggregation, indicating the role of genetic variants in their etiology. However, environmental influences have been repeatedly implicated as contributing factors to these diseases. Studies in humans and animal models have shown that exposure to intrauterine risk factors alters fetal development, with effects on brain programming, increasing the risk for postnatal diseases. Mediation and response to adverse environmental stimuli for development are carried out by the placenta. It is postulated that this modulation of the response occurs through epigenetic mechanisms and is sex-specific. One class of genes that is under this regulatory mechanism and is important in this mediation is the imprinted genes. Recently it was observed that there is a synchrony of co-expression of these genes between brain and placenta, and that through maternal food deprivation, there is a change in the expression of the genes imprinted only in the placenta, preserving the expression in the fetal brain, evidencing the importance of these genes in modulating the stress response. Thus, the regulatory processes that occur with genes imprinted on the placenta appear to be important for the development of the fetal brain. Interestingly, the modulation of the response to the environment seems to alter the methylation and expression profile of imprinted clusters, differently between the sexes. Thus, our hypothesis is that the different susceptibility of the sexes to neurodevelopmental disorders must be at least partly explained by the modulation of the placental imprint in the sex-specific response to stress.

Sumário

1.0 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Origem do desenvolvimento da saúde e doenças (DOHaD).....	6
1.2 Estresse gestacional e o neurodesenvolvimento.....	8
1.3 Sexo, estresse e o neurodesenvolvimento.....	11
1.4 Placenta: mediação materno-fetal e a resposta sexo-específica ao estresse.....	15
1.5 Placenta, <i>imprinting</i> , e o neurodesenvolvimento.....	20
1.6 Regulação gênica em célula única – <i>Single-cell RNA-seq</i>	24
1.7 Hipótese.....	29
2.0 OBJETIVOS.....	31
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Conjuntos de dados para expressão diferencial e redes de regulação.....	32
3.2 Imprintoma em <i>Mus musculus</i>	33
3.3 Expressão diferencial em placenta de <i>Mus Musculus</i>	34
3.4 Hiper-representação e ranqueamento.....	34
3.5.1 Método PANDA.....	35
3.5.2 Inferência e comparação das redes.....	37
3.5.3 Enriquecimento para processos biológicos.....	39
3.5.4 Fatores de transcrição <i>drivers</i> da mudança regulatória.....	39
3.6 Regulação gênica no trofoblasto em desenvolvimento.....	40
3.6.1 Pré-processamento, quantificação e caracterização celular.....	40
3.6.2 Redes de regulação gênica.....	41
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Resposta ao estresse em placentas de <i>Mus musculus</i>	42
4.2 Regulação gênica da placenta em humanos.....	45
4.2.1 Módulos de co-expressão da placenta e o imprintoma.....	46
4.2.2 Imprintoma em módulos de co-expressão temporais da placenta.....	49
4.2.3 Redes de regulação gênica de resposta ao estresse sexo-específicas na placenta.....	51
4.2.3.1 Fatores de transcrição <i>drivers</i> da regulação ao estresse sexo-específica na placenta.....	53
4.2.3.2 Módulos da regulação ao estresse sexo-específico na placenta.....	57
4.2.3.3 Análise de genes do Imprintoma nos Módulos de resposta ao estresse na placenta.....	67
4.3 Regulação no início de diferenciação do trofoblasto.....	68
4.0 CONCLUSÃO.....	72
5.0 TRABALHOS DESENVOLVIDOS PELO ALUNO.....	73
6.0 REFERÊNCIAS.....	75

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Origem do desenvolvimento da saúde e doenças (DOHaD)

Descrito pela primeira vez em 1986 por Barker e Osmond, o conceito conhecido como Origem do Desenvolvimento das Doenças (DOHaD) postula que a exposição a fatores ambientais adversos durante períodos críticos do desenvolvimento pode trazer consequências a curto e longo prazo para a saúde de um indivíduo (Barker, 2007; Barker and Osmond, 1986). No estudo epidemiológico em que a hipótese DOHaD foi apresentada (inicialmente chamada de *Fetal Origins Hypothesis*), Barker e Osmond (1986) encontraram uma correlação positiva entre a taxa de mortalidade por doença coronariana arterial (de 1968 a 1978) e a taxa de mortalidade infantil e neonatal (de 1921 a 1925) na Inglaterra e País de Gales (Barker and Osmond, 1986). Os autores então especularam que a restrição de nutrientes no início do desenvolvimento da gestação aumentaria a susceptibilidade do indivíduo para efeitos adversos de uma nutrição rica ao longo da vida, ocasionando o aumento da mortalidade por doença coronariana na vida adulta (Gluckman et al., 2008, 2005).

Nesse conceito, o feto em desenvolvimento, quando exposto a um ambiente uterino desfavorável - abuso de drogas, restrição/excesso de nutrientes, infecções virais, distúrbios metabólicos, hipóxia - responde desenvolvendo adaptações que promovem não apenas sua viabilidade imediata, mas também sua sobrevivência em um ambiente similar ao longo da vida (Gluckman et al., 2005). Por exemplo, a diminuição na oferta de nutrientes ao feto estimula a reorganização de gasto energético durante o desenvolvimento, esse ajuste é observado com a regulação negativa da função endócrina/metabólica do feto e consequente diminuição da taxa de crescimento (Barker et al., 2001; Osmond et al., 1993). Dessa forma, as ofertas decorrentes do meio materno parecem gerar uma reprogramação do desenvolvimento, com o intuito de viabilizar uma trajetória factível e harmoniosa para progenitor e prole (Bronson and Bale, 2015; O'Donnell et al., 2009).

Apesar de viabilizar a sobrevivência fetal em um ambiente adverso, as adaptações também podem gerar alterações irreversíveis no desenvolvimento. Modificações na expressão gênica necessárias à adaptação fetal podem alterar os processos de diferenciação e proliferação celular, ocasionando em alterações de estrutura e função de tecidos e órgãos vitais, vistas a curto ou longo prazo (Barker et al., 2001; Gluckman et al., 2008). Assim, o indivíduo que se desenvolve em um ambiente extra-uterino inverso ao experimentado no útero, poderá apresentar um “pior ajuste” ao seu ambiente atual, que lhe predispõe a um risco maior para certas doenças não transmissíveis (DNTs) (Gluckman et al., 2008). Esse risco é ainda mais agravado pelo excesso de peso ganho na vida pós-natal / adulto e pelo próprio processo de envelhecimento (Vickers et al., 2000).

Uma vasta literatura têm sustentado a hipótese DOHaD, mostrando que o início do desenvolvimento (desde a concepção até primeira infância) - período de formação de órgãos e rápido crescimento - é fundamental para a saúde imediata e futura da criança (Barker et al., 2012; Bergman et al., 2010; Gabory et al., 2013; Gheorghe et al., 2007; Kenworthy et al., 2014; Laplante et al., 2008; Lewis et al., 2012; Tarrade et al., 2015).

Estudos de subnutrição mostraram que além do crescimento atrasado, também foram observadas mudanças permanentes na produção hormonal e na sensibilidade de tecidos à esses hormônios, que por sua vez levam ao desenvolvimento anormal de órgãos e doenças como hipertensão, diabetes tipo-2, doença renal, doença cardiovascular e obesidade (Barker et al., 1993; Langley-Evans and McMullen, 2010; Tarry-Adkins et al., 2010).

Sabemos que as DNTs podem ser causadas por vários fatores, incluindo fatores genéticos, ambientais, fisiológicos e comportamentais, e que podem ocorrer em todas as faixas etárias, embora sejam principalmente doenças da terceira idade (WHO, 2014). Atualmente, as DNTs são a principal causa de mortes em todo o mundo, respondendo por cerca de 40 milhões (70%) de mortes anualmente (WHO, 2014). Geralmente são atribuídas a quatro fatores de risco principais: uso de tabaco, consumo excessivo de álcool, má alimentação e

inatividade física (WHO, 2014). No entanto, esses fatores parecem não explicar completamente o padrão de DNTs emergentes nos países em desenvolvimento com ritmo acelerado de urbanização, e consequentes transições epidemiológicas e nutricionais (Gluckman et al., 2010). As DNTs nessas regiões parecem diferir em algumas características, como a apresentação das doenças em uma idade mais precoce, e a progressão em uma taxa mais rápida do que a relatada em países desenvolvidos (Gluckman et al., 2010; WHO, 2015, 2014). Mais de 80% dos 15 milhões de mortes prematuras em todo o mundo por DNTs, ocorrem nas populações de renda baixa e média (WHO, 2014). Essas diferenças poderiam ser explicadas, particularmente, pela maior vulnerabilidade de populações carentes à experiências adversas durante períodos críticos do desenvolvimento (pré-natal, infância e adolescência)(Moore, 2015).

As evidências dos inúmeros estudos citados acima destacam fortemente a necessidade de entender o papel que a DOHaD pode ter no controle das prevalências de DNTs, e como ela poderia contribuir para o desenho de intervenções para resolver esse crescente problema de saúde pública. Especialmente, considerando que as populações mais afetadas estão em regiões onde a pobreza, desnutrição, infecções, baixo peso ao nascer e mau saneamento ainda prevalecem (Moore, 2015).

1.2 Estresse gestacional e o neurodesenvolvimento

Linhas crescentes de evidência apoiam a importância do período pré-natal para a formação e desenvolvimento do cérebro fetal (Bale, 2011; Khalife et al., 2012; Mueller and Bale, 2008; Poelmans et al., 2011). De fato, o cérebro em desenvolvimento é particularmente plástico e sensível a várias adversidades ambientais no útero que podem levar a implicações a longo prazo (Galler et al., 2012; Kapoor and Matthews, 2005). A proliferação, diferenciação, e migração de neurônios, ocorrendo durante o período gestacional, são processos biológicos que possuem componentes genéticos e epigenéticos (Bale, 2015; Fass et al., 2014); assim, eles são fortemente influenciados por fatores ambientais, como estresse

materno sendo um exemplo de adversidades externas. É importante notar que o cérebro em desenvolvimento é um dos órgãos mais sensíveis aos efeitos do estresse no período pré-natal, pois para garantir a organização estrutural e a conectividade durante o desenvolvimento fetal, apresenta altas taxas de divisão e diferenciação celular, ou seja, alta velocidade de crescimento (Gilmore et al., 2018; Khundrakpam et al., 2016).

Diversos estudos de estresse pré-natal em modelos animais vêm obtendo um crescente número de evidências que suportam efeitos de longo prazo no cérebro da prole, mostrando a influência de diferentes tipos de estresse, como, exposição à luz intensa, privação de alimentos, restrição/excesso de nutrientes, restrição de movimentação e outros (Brunton and Russell, 2010; Laloux et al., 2012; Marrocco et al., 2012). Esses estressores foram associados ao desenvolvimento de comportamentos inibidos na prole, como atividade reduzida em testes de campo aberto, redução na sociabilidade, comportamentos aumentados de ansiedade em testes de labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro. Além disso, independentemente do tipo de estressor aplicado, todos esses estudos mostraram consistentemente que manipulações prolongadas no pré-natal prejudicam a aprendizagem e a memória espacial, com um efeito que pode ser observado não apenas na adolescência, mas também na vida adulta (Fumagalli et al., 2007; Giovanoli et al., 2013; Richetto and Riva, 2014).

Estudos epidemiológicos também forneceram suporte aos dados pré-clínicos, mostrando, por exemplo, que o estresse materno durante a gravidez, incluindo a exposição ao luto, desastres naturais ou terrorismo, bem como problemas financeiros e de relacionamento, está associado a um aumento da incidência de problemas do temperamento e comportamentais na prole, tanto na infância quanto na vida adulta (Van den Bergh et al., 2017; Harville et al., 2010; Moog et al., 2018). Um clássico estudo chamado “Dutch Hunger Winter Study” mostrou como a privação de nutrientes no início da vida fetal pode afetar o neurodesenvolvimento e vida adulta (Brown et al., 2000, 1995). O estudo mostra que pessoas concebidas durante um período de fome na segunda guerra mundial,

apresentaram um risco duas vezes maior para desenvolver esquizofrenia. Homens (n=100.053) que foram expostos à má nutrição durante o primeiro e segundo trimestre de gestação apresentaram um risco 2,5 vezes maior para comportamentos antissociais. Indivíduos de ambos os sexos tiveram um desempenho pior em testes cognitivos na vida adulta, comparando com indivíduos não expostos à privação de nutrientes (Brown et al., 2000, 1995). No geral, este mesmo panorama é visto nas populações africanas onde há privação de nutrientes (Kerac et al., 2014).

Em um estudo longitudinal prospectivo realizado por Buss e colaboradores, foram avaliados os efeitos do estresse materno pré-natal (exposição a ansiedade), na morfologia cerebral da prole (Buss et al., 2010). Os dados de estresse na gravidez foram coletados nas semanas 19, 25 e 31 de gestação, e os indivíduos (prole) foram avaliados entre 6 e 9 anos de idade por ressonância magnética. Os resultados revelaram alterações na morfologia cerebral, apenas na prole das mães que apresentaram sintomas relacionados a ansiedade durante a gravidez. Especificamente, a ansiedade na semana 19 da gravidez - e não nas semanas 25 e 31 - foi associada a redução de volume da massa cinzenta em várias áreas do cérebro, incluindo as regiões cortical pré-frontal e temporal medial. Esses achados sugerem que essas regiões são moldadas, e devem ser áreas cerebrais mais sensíveis dos indivíduos expostos ao estresse materno no útero. Da mesma forma, em outro estudo interessante, DiPietro et al. encontraram que o estresse psicológico materno na gravidez estava associado à maturação neurológica fetal acelerada, examinada através da avaliação do tônus, postura, reflexos primitivos, comportamento e medição do potencial auditivo do tronco cerebral, sugerindo que o cérebro humano requer estresse suficiente, mas não excessivo, para promover o desenvolvimento neural antes e depois do nascimento (DiPietro et al., 2010).

Até o momento, diversos tipos de estresse materno já foram associados ao desenvolvimento de transtornos mentais na prole. Atividade física, nutrição materna, uso de tabaco, álcool e outras drogas, estresse psicossocial, distúrbios metabólicos, complicações obstétricas relacionadas à hipóxia ou estresse

respiratório, infecção viral no primeiro trimestre gestacional, são exemplos de fatores de risco para transtornos do neurodesenvolvimento (Atladóttir et al., 2010; Bale et al., 2010; Bruchova et al., 2010; de Deungria et al., 2000; Kinsella and Monk, 2009; Roh et al., 2005; de Rooij et al., 2010). Ademais, alterações metabólicas como diabetes, hipertensão e obesidade também foram associadas a um aumento significativo do risco para TEA, esquizofrenia e TDAH (Krakowiak et al., 2012).

A exposição à fome durante o período peri-concepcional, foi associada à um risco aumentado para desenvolvimento de esquizofrenia e TEA, enquanto que o mesmo tipo de exposição durante o segundo e terceiro trimestres da gestação foi vinculada à transtornos afetivos na prole (Van den Bergh et al., 2017; Brown et al., 2000; Xu et al., 2009). Neste sentido, a janela de exposição aos fatores de risco pré-natal desempenha um papel particularmente importante na trajetória do neurodesenvolvimento.

1.3 Sexo, estresse e o neurodesenvolvimento

Diferenças nos cérebros de homens e mulheres são atualmente amplamente estudadas pela comunidade científica. Especificidades estruturais e funcionais de cérebros saudáveis, masculinos e femininos, já foram observadas e descritas na literatura (Allen et al., 2003; Van den Bergh et al., 2017; Cosgrove et al., 2007). Por exemplo, homens apresentam maior tamanho cerebral em comparação ao tamanho do cérebro feminino, já a proporção de massa cinzenta em relação à substância branca é maior nas mulheres, em comparação à proporção observada no sexo masculino (Herbert et al., 2003). Mulheres possuem maior concentração de massa cinzenta nas regiões do córtex orbitofrontal, hipocampo, amígdala e ínsula, enquanto que em homens, a maior concentração de massa cinzenta está localizada nas regiões entorrinal e pallidum ventral (Allen et al., 2003; Herbert et al., 2003).

De acordo com várias linhas de evidência, o estresse materno pré-natal produz efeitos sexo-específicos em regiões sexualmente dimórficas do cérebro, e que estão envolvidas na regulação do humor, respostas ao estresse, função

metabólica, sistema nervoso autônomo, e vasculatura (Van den Bergh et al., 2017; Weinstock et al., 1992). Essas áreas já foram associadas a transtornos psiquiátricos que apresentam frequências diferentes entre os sexos, como ansiedade, transtorno do espectro do autismo (TEA), transtorno obsessivo compulsivo de início precoce (TOC), transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), e esquizofrenia de início precoce (Van den Bergh et al., 2017; Goldstein et al., 2016). No entanto, embora a literatura sugira que o impacto do estresse seja não só, sexo-específico, mas também relacionado à janela de exposição e região cerebral, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes a essas diferenças de gênero e a diferente vulnerabilidade para o desenvolvimento de resultados negativos na prole masculina e feminina. Apesar de o sexo feminino apresentar maior risco para o desenvolvimento de transtornos como ansiedade e depressão, o sexo masculino é mais afetado para transtornos como TEA, esquizofrenia e TDAH (Van den Bergh et al., 2017; Davis and Pfaff, 2014; Werling and Geschwind, 2013).

Entre todas as regiões do cérebro, a amígdala e o hipocampo receberam atenção especial no contexto do estresse e a programação do desenvolvimento fetal, porque seu desenvolvimento começa em um estágio embrionário inicial e acredita-se, que essas regiões, sejam particularmente sensíveis a níveis elevados de glicocorticóides (hormônios do estresse), como o cortisol (Buss et al., 2012; DiPietro et al., 2010; Wen et al., 2017). Neste contexto, ao avaliar uma coorte de nascimentos da região oeste de São Paulo (ROC), nosso grupo identificou uma associação entre o tamanho de neonatos (pequenos para a idade gestacional) e medidas do neurodesenvolvimento aos 12 meses de idade. Apenas os meninos apresentaram associação com as medidas do neurodesenvolvimento aos 12 meses, mostrando um impacto diferente qualitativo e quantitativo nos sexos, em relação a adversidade gestacional (Fink et al., 2018).

Em outro estudo prospectivo, Buss et al. examinaram a associação entre a concentração materna de cortisol ao longo da gestação, e medidas cerebrais da prole - volume do hipocampo, amígdala, e características clínicas relacionadas às

funções afetivas (Buss et al., 2012). Os autores mostraram que concentrações mais altas de cortisol materno no início da gestação estavam associadas a volumes maiores da amígdala direita e também a problemas afetivos, mais especificamente em meninas de 7 anos de idade. Assim, os autores sugeriram que a presença dos volumes aumentados na amígdala direita associados aos níveis elevados de cortisol materno, poderiam representar um mediador para os comportamentos alterados observados. Além disso, esses dados sustentam a hipótese de que o cortisol materno pode ter um efeito mais poderoso durante a fase inicial da gestação, moderada pelo sexo fetal/infantil, sugerindo que o ambiente intra-uterino deve interagir com o sexo, moldando a vulnerabilidade para o desenvolvimento de comportamentos alterados (Buss et al., 2012).

Além de diferenças funcionais e estruturais, diferenças na modulação da expressão gênica também foram observadas no neurodesenvolvimento de ambos os sexos. Kang e colaboradores identificaram um conjunto de genes que possuem expressão enviesada para cada um dos sexos durante o desenvolvimento cerebral (Kang et al., 2011a). Maiores evidências foram vistas no estudo conduzido por Shi e colaboradores, onde os autores demonstraram que mais de 2.000 genes são diferencialmente modulados em todos os estágios do neurodesenvolvimento, comparando os sexos (Shi et al., 2016). Além disso, os genes com perfil de expressão específicos para o sexo masculino são significativamente enriquecidos de genes relacionados ao TEA, esquizofrenia e transtorno afetivo bipolar (Shi et al., 2016; Ziats and Rennert, 2013). A literatura também mostra que genes do cromossomo Y contribuem para a diferença na expressão gênica cerebral observada entre os sexos durante o neurodesenvolvimento (Dewing et al., 2003; Kang et al., 2011b; Kopsida et al., 2009; Printzlau et al., 2017; Wolstenholme et al., 2013). Essas evidências sugerem que as diferentes susceptibilidades para transtornos psiquiátricos, apresentadas por homens e mulheres, poderiam estar associadas à modulação diferencial da expressão gênica durante o neurodesenvolvimento.

Hipotetizamos que um possível mecanismo contribuinte para as diferentes vulnerabilidades apresentadas pelos sexos, poderia estar relacionado à fatores de transcrição que são diferentes entre os sexos, e sua dosagem gênica. A expressão de genes do cromossomo Y no cérebro, contribui para a expressão diferencial entre sexos durante o neurodesenvolvimento. Um desses genes, o SRY, é evolutivamente derivado do gene SOX3, que por sua vez é localizado no cromossomo X (Cortez et al., 2014). O SRY é apresentado como um gene importante no contexto do desenvolvimento cerebral, e através da regulação da expressão gênica parece contribuir para a formação de áreas cerebrais sexualmente dimórficas (Pinares-Garcia et al., 2018; Tahira et al., 2019).

Partindo desta hipótese, mostramos recentemente que genes regulados pelo SRY/SOX3 são diferencialmente expressos e diferencialmente metilados em meninos e meninas durante o desenvolvimento do cérebro. Além disso, esse conjunto de genes estava enriquecido para genes associados ao TEA, e também genes associados ao estresse e hipóxia no tecido cerebral de casos de TEA e controles (Tahira et al., 2019). Este trabalho corrobora os achados da literatura que propõem que diferenças de susceptibilidade para transtornos mentais entre os sexos, podem estar associadas à modulação epigenética da expressão gênica durante o neurodesenvolvimento, e sugere um mecanismo específico exercido pelos cromossomos sexuais (Lopes-Ramos et al., 2020; Ratnu et al., 2017).

Com objetivo de investigar padrões de metilação sexo-específicos e independentes de exposição ao estresse, nosso grupo realizou um estudo do perfil de metilação do sangue de cordão de bebês nascidos com tamanho adequado para idade gestacional, e sem nenhuma exposição a estresse gestacional (Maschietto et al., 2017). Observamos que as meninas apresentaram duas vezes mais sítios CpG metilados do que meninos, e os genes diferencialmente metilados entre os sexos estavam enriquecidos para genes associados a transtornos mentais, evidenciando que existe uma associação entre sexo e programação cerebral, que ocorre independente do estresse. Além disso, os genes diferencialmente metilados também estavam enriquecidos em módulos de co-

expressão gênica ao longo do neurodesenvolvimento cerebral. Comparando estes achados com dados públicos de neonatos que sofreram exposição tóxica durante a gestação, observamos que os genes diferencialmente metilados entre meninos e meninas, apresentaram um *overlap* significativo com os genes de resposta à exposição tóxica. De forma geral, observamos que esses genes seguem o mesmo padrão de resposta, em ambos os sexos. Ou seja, a alteração da metilação em resposta à exposição tóxica ocorre para o mesmo sentido (hipermetilação ou hipometilação) que o observado entre sexos. Entretanto, a magnitude da diferença de expressão é maior quando há exposição a agentes tóxicos, sugerindo que exista um efeito aditivo entre sexo do conceito e exposição tóxica (Maschietto et al., 2017).

1.4 Placenta: mediação materno-fetal e a resposta sexo-específica ao estresse

Como explicitamos acima, a exposição materna à condições adversas é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças a longo prazo na prole. Dessa forma, a mediação e resposta aos estímulos provenientes do ambiente materno é extremamente importante para a proteção do desenvolvimento fetal (Bronson and Bale, 2015; Sandovici et al., 2012), e também à saúde materna. Ao acometer o organismo materno, o estímulo estressor ou as modificações causadas por este, chegam ao feto através da placenta. Esse órgão que realiza a interface materno-fetal, garantindo a homeostase materno-fetal e a reprogramação fetal para adequação ao ambiente pós natal (Barker et al., 2012; Hsiao and Patterson, 2012; Mueller and Bale, 2008).

A placenta inicia o seu desenvolvimento após a implantação do blastocisto no útero materno (Rossant, 2018). Nos mamíferos, diversas funções são desempenhadas por esse órgão, que transitam desde; evitar a rejeição do embrião/feto pelo sistema imune materno, otimizar a troca de nutrientes e gases, e também produzir metabólitos e hormônios que desempenham importantes funções na adaptação de ambos organismos na gestação (Broad et al., 2016; Gabory et al., 2013; Sandovici et al., 2012). Mas não apenas a função passiva de ser o canal de trocas, a placenta exerce também um importante papel de regulação do

desenvolvimento fetal em função de fatores intrínsecos (ex: demanda energética, idade gestacional) e extrínsecos (ex: dieta nutricional pobre), proporcionando a homeostase intrauterina. Um exemplo interessante de regulação é a ativa proteção contra glicocorticóides maternos realizada pela enzima placentária 11 β -HSD-2, que converte esses hormônios em metabólitos inativos (Harris and Seckl, 2011a; Seckl and Meaney, 2006). Os glicocorticóides são poderosos moduladores da expressão gênica e estão relacionados à diversas funções no metabolismo e sistema imune humano, entretanto no desenvolvimento fetal estudos mostraram que esses hormônios aceleram a maturação dos órgãos fetais (Harris and Seckl, 2011a). Assim, o desenvolvimento ótimo dos órgãos e sistemas do organismo depende, mas não apenas, da atividade crítica em manter as concentrações dos corticosteróides em níveis apropriados na circulação fetal (Brunton and Russell, 2010; Harris and Seckl, 2011b).

Esse importante papel placentário de promoção da homeostase acontece primordialmente com a sinalização endócrina enviada tanto pela mãe quanto pelo feto. Diversos receptores de hormônios são expressos na placenta, incluindo receptores para glicocorticóides, insulina, leptina, citocina, prostaglandina e outros (Fowden et al., 2006; Grayson et al., 2018; Hiden et al., 2009; Unluggedik et al., 2010). A integração desses sinais resulta em cascatas que determinam a alocação de recursos, crescimento da placenta, e ação endócrina (Appiah Adu-Gyamfi et al., 2020; Haram et al., 2019). Assim, estímulos estressores que comprometem a homeostase intrauterina podem afetar a integridade das funções placentárias, com consequências para o pós natal. É importante ressaltar que a placenta também realiza modificações no organismo materno durante a gestação (Appiah Adu-Gyamfi et al., 2020; Rutherford, 2009). Hormônios placentários agem sobre o hipotálamo materno para regular a liberação de glicocorticóides e modular a expressão de prolactina e ocitocina, assim o metabolismo materno é modificado para garantir o sustento energético materno e fetal (Napso et al., 2018; Tarrade et al., 2015).

De forma geral, placentas de gestações sem complicações crescem uniformemente ao redor da inserção do cordão umbilical formando uma estrutura redonda ou oval, com o cordão inserido centralmente (Kalisch-Smith et al., 2017; Salafia et al., 2017). No entanto, a morfologia placentária pode ser modulada pelos estímulos ambientais adversos. Essa modulação já é bem conhecida e até utilizada, por exemplo, em fazendas produtoras de ovelhas e carneiros; ovelhas grávidas são transferidas de pastos ricos para pastos pobres no meio da gestação. Em resposta a subnutrição, a placenta aumenta sua área de superfície de contato para maximizar a recepção de nutrientes, e evitar a falta destes para o desenvolvimento fetal (Aysondu and Ozyurek, 2020; Rosales Nieto et al., 2020). Nesse momento, final da gestação, as ovelhas são transferidas para pastos ricos, e com o maior ganho devido ao aumento da superfície, tendem a dar à luz a cordeiros maiores.

Em humanos, a morfologia e tamanho (área + volume) da placenta tem sido correlacionada com o tamanho do feto, e também com o risco para o desenvolvimento de doenças na vida adulta (Khalife et al., 2012). Por exemplo, placentas pequenas estão vigorosamente associadas com o peso fetal diminuído (restrição de crescimento intrauterino - RCIU), e a RCIU por sua vez é um forte preditor para doenças metabólicas, cardiovasculares e renais na vida adulta (Kalisch-Smith et al., 2017; Turco and Moffett, 2019).

Diversas modificações na placenta em resposta a ambientes maternos adversos já foram descritas na literatura (Bilbo, 2011; Cissé et al., 2020; Gheorghe et al., 2007; Haram et al., 2019). Alterações na vascularização e angiogênese, função endócrina, histologia, super inflamação, e na superfície de trocas, são alguns dos efeitos observados em resposta ao ambiente estressor (Aplin et al., 2020; Salafia et al., 2017; Sood et al., 2006). A vascularização e angiogênese, por exemplo, são processos chave para o desenvolvimento do tecido placentário, realização das funções, e eficiência dos mecanismos de regulação; o fluxo sanguíneo anormal, modulado pelo ambiente materno (obesidade materna), já foi associado com RCIU (Khalife et al., 2012; Longtine and Michael, 2011).

Disfunções vasculares que alteram a capacidade de trocas de nutrientes e gases, já foram ligadas a redução do tamanho do hipocampo e migração neuronal anormal, devido a hipóxia fetal e estresse oxidativo (Lane et al., 2001; Reid et al., 2012). A desregulação na expressão de transportadores de nutrientes também foi demonstrada em modelos animais; a família dos transportadores de glicose (GLUT) foram particularmente sensíveis a condições como estresse psicossocial, diabetes e malnutrição (Fumagalli et al., 2007; Seckl and Meaney, 2006).

Condições estressoras como ansiedade e depressão também já foram associadas com a alteração da permeabilidade da placenta, desregulando o controle fino de entrada de possíveis fatores prejudiciais (O'Donnell et al., 2012; Ponder et al., 2011). Por exemplo, neurotransmissores (serotonina, norepinefrina e dopamina) são produzidos em quantidades aumentadas pelo organismo materno, em condições de estresse (Bonnin et al., 2011; Joëls and Baram, 2009; Marrocco et al., 2012). Curiosamente, além de existir um aumento dos transportadores desses neurotransmissores na placenta, as enzimas metabolizadoras desses sinalizadores apresentam sua expressão diminuída (Blakeley et al., 2013; Bonnin et al., 2011; Mao et al., 2020; Rosenfeld, 2020). A super exposição fetal a esses neurotransmissores, como no caso da serotonina, compromete a migração de interneurônios corticais, ou até mesmo a redução do fluxo sanguíneo entre placenta e útero (Riccio et al., 2009; Rosenfeld, 2020; Velasquez et al., 2013). Assim, a deficiência nas barreiras placentárias ocasionadas pelo estresse pode ser vista como um importante meio da reprogramação fetal na gestação.

Apesar da extrema relevância na programação do desenvolvimento, a placenta sempre foi considerada um órgão assexuado, assim, muitos estudos não consideraram o sexo do embrião. Atualmente os estudos têm levado em consideração que a placenta apresenta o mesmo sexo que o embrião, e placentas femininas e masculinas podem responder de forma diferente à exposição a fatores de estresse (Davis and Pfaff, 2014; Gabory et al., 2013; Wiczorek et al., 2019). Estudos de expressão gênica em placentas de ratos machos e fêmeas, como o realizado por Gabory e colaboradores, analisaram a resposta dos sexos à dieta

materna rica em gordura (Gabory et al., 2012). Os padrões de expressão foram sexualmente dimórficos, no qual os genes expressos exclusivamente em placentas fêmeas estavam relacionados a vias do sistema imune, mecanismos de absorção e metabolismo de aminoácidos. Nos machos, os genes específicos estavam relacionados ao desenvolvimento e função do sistema vascular e ao metabolismo de glicose e ácidos graxos.

Estudos epidemiológicos têm mostrado que o sexo do feto é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças associadas a estresse pré-natal, e que o sexo masculino é frequentemente mais afetado (Baio, 2012; Davis and Pfaff, 2014; Kapoor and Matthews, 2005; Mao et al., 2010). Em camundongos e porquinhos-da-índia, os efeitos do estresse gestacional produziram desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e déficit cognitivo apenas em machos, quando expostos no início e meio da gravidez (Kapoor and Matthews, 2005). A depressão materna gestacional também foi correlacionada com o aumento de comportamentos de ansiedade na prole, onde meninos foram significativamente mais afetados que meninas (Gerardin et al., 2011; Laplante et al., 2008; Mueller and Bale, 2008). Zhang e colaboradores observaram fenótipos de inflexibilidade cognitiva apenas em ratos machos adultos, em resposta ao estresse durante a gestação (Zhang et al., 2016). Howerton e colaboradores (Howerton et al., 2013) sugeriram que há uma relação entre alterações do neurodesenvolvimento, e genes placentários que exibem perfil de expressão sexo-específico em resposta ao estresse; os autores observaram que a expressão da enzima *N-acetilglucosamina (GlcNAc-O) transferase (OGT)* na placenta, é menor em ratos machos (comparado à fêmeas), especialmente quando estes animais são expostos ao estresse gestacional (Cowell et al., 2020; Howerton et al., 2013). Esta redução de expressão foi associada a alterações do neurodesenvolvimento e desregulação do eixo HPA, reduzindo o crescimento pós-puberal e provocando disfunção mitocondrial no hipotálamo.

Esses trabalhos evidenciam que a intermediação realizada pela placenta em resposta ao ambiente pode ser sexo-específica, com consequências diferentes

para os sexos. É importante ressaltar que as respostas adaptativas da placenta parecem estar relacionadas a mudanças epigenéticas, como a metilação no DNA e modificações de histonas, e uma classe de genes que está sob esse mecanismo de regulação e possui um papel importante nesta mediação são os genes imprintados (Schroeder et al., 2013; Zannas and West, 2014).

1.5 Placenta, imprinting, e o neurodesenvolvimento

Juntamente com a evolução da placenta, surgiu o *imprinting* genômico, um mecanismo de controle da expressão no qual um conjunto de genes é expresso de forma monoalélica de acordo com a origem parental (Reik and Walter, 2001; Wolf and Hager, 2006). Até o momento, foram descritos cerca de 100 genes imprintados em humanos e 150 em camundongos (Skaar et al., 2012). Esses genes estão localizados em domínios imprintados coordenadamente regulados e conhecidos como regiões diferencialmente metiladas (DMRs), estabelecidas na oogênese ou espermatogênese e agrupadas em clusters e locais denominados regiões de controle de imprinting (RCI) (Edwards and Ferguson-Smith, 2007). A regulação dos genes imprintados acontece principalmente pela repressão da transcrição do alelo silenciado a partir da metilação inserida no promotor do gene - ou com a inserção de RNAs longos não codificadores nos promotores responsáveis pela expressão do cluster. Apesar de serem mais suscetíveis à mutações e epimutações, os genes imprintados possuem um controle de dosagem gênica mais estrigente, essencial para o desenvolvimento e crescimento fetal normal (Fowden et al., 2011).

Em geral, os genes imprintados são responsáveis pela co-adaptação materno-fetal, promovendo a maior adequação para o desenvolvimento da prole e maternidade (Wolf and Hager, 2006). Em camundongos, estudos mostraram que a deleção de alguns genes imprintados como *Peg3* e *Peg1*, levam à restrição do crescimento da placenta (He and Kim, 2014; Lefebvre et al., 1998). Outros genes como o *Ascl2*, *Peg10*, *Phlda2* e *Cdkn1c* são essenciais para o desenvolvimento do espongiotrofoblasto, região placentária responsável pela produção de hormônios (Frank et al., 2002; Ono et al., 2006; Sekita et al., 2008). *Rtl1*, um gene

paternalmente expresso, é responsável pela manutenção dos capilares placentários. Além desses, a deleção de *Igf2* e *Igf2r* afeta o transporte de nutrientes (Apostolidou et al., 2007; Coan et al., 2008).

Em humanos, o gene imprintado *PHLDA2* é predominantemente expresso na placenta a partir do alelo materno, e a sua expressão elevada neste órgão está relacionada ao baixo peso do neonato e à gravidez com restrição de crescimento intrauterino grave (IUGR), quando comparadas às placentas de gravidez normal (Apostolidou et al., 2007; McMinn et al., 2006). Além disso, outros genes imprintados (ex. *MEST*, *MEG3*, *GATM*, *GNAS*, *PLAGL1* entre outros) têm sua expressão placentária alterada comparando IUGR com não-IUGR (Murphy et al., 2012).

Outro ponto importante é que os genes imprintados participam da modulação da resposta placentária ao estresse ao terem suas regulações alteradas frente à exposição aos fatores ambientais. Broad e Kaverne mostraram em camundongos, que a privação alimentar materna diminui significativamente a expressão do gene *Peg3* na placenta (Broad and Keverne, 2011). Em outro estudo, Haycock e Ramsay observaram o perfil de metilação do cluster imprintado *H19/Igf2* em placentas e embriões de camundongos, após a exposição materna ao etanol (Haycock and Ramsay, 2009). Os autores observaram que os embriões não apresentaram alterações na metilação do cluster, entretanto, na placenta houve significativa diminuição de metilação nos alelos paternos do cluster (Haycock and Ramsay, 2009).

No trabalho de Gallou-Kabani e colaboradores, os pesquisadores mostraram que a dieta materna (camundongos) rica em gorduras alterou o perfil de expressão e metilação de diferentes clusters de genes imprintados na placenta, evidenciando mais uma vez a participação desses genes na resposta à fatores ambientais (Gallou-Kabani et al., 2010). Interessantemente, o estudo mostra que a mudança no perfil de expressão dos genes localizados em dois clusters (*chr12: Dio3, Rtl1, Dlk1* ; *chr17: Slc22a1, Slc22a2, Slc22a3*) foi mais acentuada para o sexo feminino, do que para o sexo masculino. Ainda, placentas femininas

apresentaram níveis mais altos de metilação no cluster *Igf2r/Air* na resposta ao estresse, do que em placentas masculinas (Gallou-Kabani et al., 2010). É importante salientar que fêmeas apresentam um maior nível de metilação do que machos nessa região, independente da dieta materna (Gallou-Kabani et al., 2010). Assim, teoricamente, genes envolvidos com a resposta aos fatores ambientais na placenta - como os genes imprintados - parecem atuar de uma maneira sexo-específica, dependente da exposição ao estresse.

Por outro lado, os genes imprintados também estão relacionados ao desenvolvimento do cérebro e áreas cerebrais que apresentam dimorfismo sexual (Keverne, 2015; McNamara and Isles, 2013; Plasschaert and Bartolomei, 2014). A relação do *imprinting* genômico com os processos de neurodesenvolvimento têm sido observada desde 1984 e, desde então, o papel de diversos genes imprintados no neurodesenvolvimento vêm sendo descrito. Por exemplo, o gene *Peg3*, envolvido em vias de sinalização de morte e sobrevivência celular, além de ser expresso na placenta, apresenta altos níveis de expressão no cérebro durante a gestação (Broad et al., 2009; Kim et al., 2013). Outro gene imprintado relacionado ao neurodesenvolvimento, é o paternalmente expresso *Necdin*. Dentre as suas diversas funções moleculares, o *Necdin* promove a migração tangencial de neurônios neocorticais GABAérgicos, através da formação de um complexo com a proteína *Dlx2* (Ku wajima et al., 2006). Problemas nessa migração neuronal acarretam, principalmente, na disfunção de vias GABAérgicas, que estão relacionadas a um amplo espectro de transtornos mentais, como epilepsia, esquizofrenia, transtorno bipolar e autismo (Fatemi et al., 2009; Ku wajima et al., 2006; Muscatelli et al., 2000).

Diante da importância de genes imprintados na resposta ao estresse e no neurodesenvolvimento, um estudo em camundongos mostrou que genes imprintados apresentam uma sincronia de co-expressos no cérebro fetal, placenta e cérebro materno, sugerindo um mecanismo de coadaptação relacionado a programação hipotalâmica materna, para responder aos sinais enviados pela placenta durante a gestação (Broad and Keverne, 2011). O estudo também

mostrou que a privação alimentar aguda materna, resultou na quebra de co-expressão de alguns genes imprintados somente na placenta, preservando a co-expressão no cérebro fetal durante o desenvolvimento, evidenciando o papel desses genes na modulação da resposta ao estresse pela placenta para a proteção do neurodesenvolvimento. Assim, os processos regulatórios que ocorrem com genes imprintados na placenta parecem ser importantes para o neurodesenvolvimento fetal.

Um trabalho recente corrobora esta ideia, e sugere que genes diferencialmente expressos na placenta possuem também uma importante relação com o risco poligênico para transtornos mentais, como a esquizofrenia (Ursini et al., 2018). Os autores desse estudo hipotetizaram que as variantes genéticas mais significativas encontradas em GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) para esquizofrenia, poderiam alcançar este status estatístico por contribuírem também para o desenvolvimento de mecanismos sensíveis a fatores ambientais que são relativamente comuns entre os pacientes, como fatores de risco perinatais (ELC – *early-life complications*). Assim, o estudo mostrou que genes presentes em loci altamente associados à esquizofrenia são altamente expressos na placenta, e diferencialmente expressos em estados placentários invasivos anormais, sugerindo que esses genes interagem com fatores ambientais que comprometem a saúde placentária e obstétrica. A partir desse conjunto de loci (associados à doença e diferencialmente expressos na placenta), os autores derivaram um escore de risco poligênico (PRS), que juntamente com as ELCs respondeu por uma explicação 5 vezes maior para a esquizofrenia na amostra clínica. Análises de enriquecimento das vias biológicas relacionadas aos genes do PRS revelaram processos relacionados a hipóxia, estresse metabólico e resposta imune/inflamatória. Os autores também encontraram um enriquecimento mais significativo na expressão de genes do PRS em placentas do sexo masculino, comparado às do sexo feminino. Sugerindo que as interações gene-ambiente que influenciam a biologia placentária devem contribuir para o viés sexual observado na incidência de esquizofrenia e, provavelmente, outros distúrbios do neurodesenvolvimento.

Seguindo o raciocínio à respeito da importância dos genes imprintados, um outro estudo mostrou que existe uma rede de interação gênica evolutivamente conservada formada por genes imprintados e seus parceiros no interactoma (não imprintados), denominada de imprintoma (Sandhu, 2010). Analisando a ontologia desses genes, a rede de interação do imprintoma apresenta-se enriquecida para vias de processo de biossíntese celular, metabolismo, crescimento e regulação do desenvolvimento embrionário, demonstrando uma possível relevância do imprintoma no desenvolvimento placentário e fetal.

Como exposto no presente capítulo, os genes imprintados são rapidamente moduláveis na resposta a estressores, fundamentais na mediação metabólica materno-fetal, no crescimento placentário e fetal adequado, assim como no neurodesenvolvimento. Com exceção dos genes imprintados do cromossomo X, teoricamente não existe um viés sexual para o imprinting genômico e o mesmo não está associado com respostas sexo específicas.

1.6 Regulação gênica em célula única – Single-cell RNA-seq

A primeira especificação celular humana ocorre no início da embriogênese, quando os blastômeros se dividem assimetricamente para gerar o Trofotoderma e a Massa Celular Interna (MCI), que formarão o embrião e a placenta, respectivamente (Turco and Moffett, 2019). A placenta humana madura é descrita como tendo três tipos principais de células especializadas: Citotrofoblastos (CTBs), Sincitiotrofoblasto (STB) e trofoblastos extravilosos (EVTs). Os CTBs formam uma camada única e servem como fonte de reabastecimento ao STB e EVT. Os EVT são células trofoblásticas que migram das pontas das vilosidades placentárias, se proliferam e formam uma coluna celular (Turco and Moffett, 2019). EVT na região distal da coluna se separam das vilosidades e invadem os compartimentos intersticiais da parede uterina materna, remodelando a artéria espiral uterina para facilitar a transferência de nutrientes materno-fetal. O STB é uma estrutura multinucleada que cobre toda a superfície da região vilosa placentária e contém aproximadamente 60 bilhões de núcleos. A manutenção de um STB funcional depende da eliminação de seus núcleos apoptóticos e de

citoplasma na circulação materna, e da incorporação contínua de novos componentes celulares através da fusão de CTBs (Turco and Moffett, 2019).

Diversos estudos demonstraram que a formação inadequada do STB ou falha na invasão do EVT, origina graves complicações na gravidez associadas à morbidade e mortalidade materna e fetal, como pré-eclâmpsia e restrição do crescimento intrauterino (Aplin et al., 2020). Apesar do importante papel que os trofoblastos têm na implantação da placenta e na manutenção de uma gravidez bem sucedida, os mecanismos moleculares e celulares responsáveis pelo estabelecimento da linhagem de trofoblastos, as interações e comunicações entre esses subtipos celulares placentários, são ainda limitados em humanos. Devido a questões éticas e práticas, quase não há fonte de células ou tecidos disponíveis para estudar os mecanismos de diferenciação de trofoblastos humanos, que se torna ainda uma barreira ao estudo das doenças associadas à essas células na gravidez. É importante notar também, que as estruturas placentárias e a interação de suas células com o ambiente materno variam tremendamente entre os mamíferos (Keverne, 2014, 2013). Análises de genômica comparativa demonstraram que os genes envolvidos nos processos placentários e de reprodução, estão entre os mais divergentes entre humanos e camundongos (Waterston et al., 2002). Essa grande variação também dificulta a obtenção de informações acuradas a respeito da embriologia placentária humana, a partir do uso de modelos animais. Nesse sentido, Células-tronco Pluripotentes Induzidas (iPS) são modelos poderosos para entender a genética funcional humana e os mecanismos genéticos causais envolvidos nos processos de doenças e fenótipos específicos (Amin et al., 2019). Para órgãos como o cérebro, o rápido progresso no campo levou a modelos de iPS com crescente complexidade e utilidade (Mansour et al., 2018). Para a placenta humana, que está cada vez mais implicada como fator de risco para transtornos do desenvolvimento, vários modelos vêm sendo desenvolvidos e aprimorados para criar células de trofotoderma, a partir de iPS (Chen et al., 2013; Horii et al., 2016; Kojima et al., 2017).

Para entender melhor o desenvolvimento e a atividade da placenta, diversos modelos de iPS humanos foram desenvolvidos com o objetivo de gerar

células primitivas e maduras do trofoblasto, e quase exclusivamente, são baseados na ativação do gene BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) (Tsuchida et al., 2020). Embora esses modelos sejam amplamente usados, existe um debate sobre a semelhança entre as células diferenciadas por esses modelos, e citotrofoblastos in vivo. Algumas das questões levantadas pela comunidade científica são: 1) a proteína BMP4 induz a diferenciação do meso-endoderma, no embrião humano (Goldman et al., 2009); 2) a via de sinalização das proteínas BMP, e a transdução de sinal das proteínas SMAD foram encontradas enriquecidas apenas no endoderma primitivo, e não no trofotoderma (Blakeley et al., 2015; Petropoulos et al., 2016; Stirparo et al., 2018); 3) os modelos iPS baseados em BMP4 geram populações celulares extremamente heterogêneas, com contaminação mesodérmica, e não mantêm populações de células trofoblásticas pluripotentes (Bernardo et al., 2011; Drukker et al., 2012; Yabe et al., 2016); 4) alguns marcadores encontrados nas populações de células geradas por esses modelos nem sequer foram detectados em células da placenta (Liu et al., 2018; Vento-Tormo et al., 2018).

Na busca por desenvolver métodos que promovessem a diferenciação de células mais similares a trofoblasto e o estabelecimento de culturas de longo prazo, recentemente, um estudo conseguiu derivar e cultivar células pluripotentes de trofoblasto a partir de células-tronco embrionárias humanas (blastocisto), usando uma metodologia (chamamos nesse trabalho de TS) que produziu tipos celulares placentários mais fiéis aos observados in-vivo, comparando com as metodologias de iPS atualmente descritas (baseadas em BMP4) (Okoe et al., 2018). Os autores mostraram que a ativação das vias Wnt e EGF, juntamente com a inibição das proteínas TGF β (Fator de Crescimento Transformador Beta), HDAC (histona desacetilase) ROCK (proteína quinase associada a Rho), possibilitou a diferenciação e crescimento de células pluripotentes muito similares às observadas in vivo na placenta humana. Embora os resultados desse estudo sejam importantes para melhorar a compreensão de mecanismos ligados à placenta, questões éticas e de acessibilidade ao uso de células-tronco embrionárias restringem a ampliação do uso dessas técnicas por parte da

comunidade científica, e conseqüentemente o avanço do conhecimento nessa área.

Apesar das dificuldades na obtenção de materiais apropriados para entendermos estados biológicos específicos, a consolidação de diversas técnicas moleculares permitiram avanços substanciais na extração de grandes quantidades de informações biológicas (Behjati and Tarpey, 2013; Wang et al., 2009). Uma estratégia amplamente utilizada no mapeamento genótipo-fenótipo, é a análise de transcriptoma - conjunto formado por todas as moléculas de RNA presentes em uma célula ou população de células (Goodwin et al., 2016). Várias tecnologias foram desenvolvidas para identificar e quantificar transcritos, incluindo abordagens baseadas em hibridização ou sequenciamento.

Tecnologias baseadas em hibridização - principalmente conhecidas como *Microarrays* - geralmente requerem a incubação de cDNA (marcado com fluorescência) em uma superfície sólida preenchida com sondas de DNA que refletem regiões previamente conhecidas do genoma (Clark et al., 2002; Schena et al., 1995). Embora seja possível identificar e quantificar milhares de transcritos provenientes de distintas regiões do genoma, esses métodos apresentam importantes limitações como, conhecimento prévio sobre a sequência de DNA interrogada; altos níveis de ruído devido à hibridização cruzada; e limitado grau de quantificação devido à saturação do sinal de fluorescência (Okoniewski and Miller, 2006; Royce et al., 2007).

Em contraste com os métodos de microarray, as abordagens baseadas em sequenciamento determinam diretamente a sequência de cDNA. Inicialmente, técnicas como, sequenciamento Sanger em bibliotecas de cDNA, *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) e *Cap Analysis Gene Expression* (CAGE) foram as principais metodologias desenvolvidas ou adaptadas para a determinação e quantificação da expressão gênica (Adams et al., 1991; Kouichi et al., 1994; Shiraki et al., 2003; Velculescu et al., 1995). Entretanto, apenas recentemente com o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração (NGS) foi possível produzir dados em larga escala, o que proporcionou uma forma mais robusta de

mapear e quantificar transcriptomas (Lister et al., 2008; Mortazavi et al., 2008; Weber, 2015).

Convencionalmente, o sequenciamento das moléculas de RNA é realizado em populações de células, e fornece apenas o sinal de expressão médio para um conjunto de células e tipos celulares. Embora todas as células de um tecido humano compartilhem genótipos quase idênticos, diferentes tipos celulares expressam transcriptomas únicos, e ainda, tipos celulares específicos podem apresentar subgrupos com funcionalidades e perfis de expressão únicos (Colonna, 2018; Hockley et al., 2019; Kumari et al., 2019; Prieto-Vila et al., 2019; Solé-Boldo et al., 2020; Sturm et al., 2019; Tasic et al., 2016; Wills et al., 2013). Nesse sentido, estudos mostraram que essa variação entre células deve ter um papel importante na diversidade de respostas apresentadas em nível populacional (Fang et al., 2013; Feinerman et al., 2010; Raj and Van Oudenaarden, 2009; Slack et al., 2008; Tay et al., 2010; Veening et al., 2008).

Com os avanços recentes nas técnicas de sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq), estudos de transcriptoma vêm descrevendo continuamente novos aspectos a respeito da heterogenidade celular presente em sistemas biológicos (Habermann et al., 2020; Hammond et al., 2019; Papalexi and Satija, 2018; Qi et al., 2020). Além disso, a técnica de scRNA-seq está sendo cada vez mais utilizada para entender o desenvolvimento e estabelecimento de linhagens celulares, em processos de especificação, diferenciação e determinação do destino celular (Blakeley et al., 2015; Giudice et al., 2019; Liu et al., 2018; Stévant et al., 2019; Vento-Tormo et al., 2018).

Atualmente, as metodologias de capturação individual de células e sequenciamento do transcriptoma, são baseadas na utilização de gotículas ou micropoços (Ziegenhain et al., 2017). As abordagens baseadas em micropoços requerem um compartimento físico rígido para capturar as células, e empregam uma variedade de técnicas de preparação da biblioteca de sequenciamento (Ziegenhain et al., 2017). Embora o uso das abordagens baseadas em micropoços tenha avançado significativamente o campo de scRNA-seq, um significativo

progresso na área veio com o desenvolvimento do protocolo Drop-seq em 2015 (Macosko et al., 2015). Esse método utiliza um fluxo de microfluidos para capturar individualmente, cada célula junto à uma microesfera, em uma gotícula de óleo. Dentro de cada gotícula, as células sofrem lise celular e suas moléculas de RNA são hibridizadas à primers anexados às microesferas. Cada microesfera contém primers que apresentam uma sequência de bases única (*cell barcode*), para que seja possível fazer o reconhecimento das moléculas de RNA, individualmente para cada célula (Macosko et al., 2015).

Junto com o avanço das metodologias de scRNA-seq, as ferramentas de análise de dados vêm sendo aperfeiçoadas para facilitar e otimizar o uso dos ricos conjuntos de dados decorrentes desse tipo de experimento (Stuart and Satija, 2019). Embora ainda não exista um consenso quanto às metodologias de análise de dados, algumas práticas comuns vêm sendo descritas atualmente (Luecken and Theis, 2019). Basicamente, essas práticas envolvem os processos de redução de dimensionalidade, seguida por agrupamento não supervisionado das células, e identificação dos tipo celulares (Hwang et al., 2018). Então, pode-se realizar análises de expressão diferencial expressão diferencial entre os grupos celulares, inferir redes regulatórias, e análises de trajetória de desenvolvimento, para caracterizar ainda mais as diferenças entre as células no conjunto de dados (Hwang et al., 2018).

1.7 Hipótese

Podemos dizer que existe um dimorfismo sexual, que garante vantagens adaptativas de formas diferentes para os sexos, e que este dimorfismo é um produto do controle transcricional de redes gênicas dependentes de fatores dos cromossomos X e Y – por exemplo, dosagem gênica do cromossomo X, presença no cromossomo Y, regulação epigenética dos autossomos. Diante de adversidades ambientais no período gestacional, mecanismos epigenéticos modulam a expressão gênica da placenta para garantir a homeostase mãe-feto e a programação fetal ao longo da vida. Um conjunto de genes que surgiram evolutivamente junto com o desenvolvimento da placenta, os genes imprintados,

são importantes para esta modulação. Como já observado na literatura, essa modulação ocorre de formas diferentes entre os sexos, e o sexo masculino parece ser mais afetado de forma que meninos têm mais problemas periparto, piores desfechos de nascimento, maior mortalidade perinatal e mais transtornos do neurodesenvolvimento. Assim, nossa hipótese de trabalho é que a interação entre a rede gênica que promove o desenvolvimento adequado da placenta e resposta ao estresse intrauterino - o imprintoma, e não apenas genes imprintados - e os genes relacionados ao dimorfismo sexual, deve resultar na diferente resposta placentária ao estresse exibida entre os sexos, e que contribui para a maior suscetibilidade do sexo masculino aos transtornos do neurodesenvolvimento.

No intuito de comprovar esta hipótese, devemos demonstrar que o imprintoma (genes imprintados + genes parceiros não imprintados) associa-se à diferentes tipos de estresse gestacional, e em diferentes períodos da gestação. Devemos demonstrar que diante da exposição gestacional ao estresse, meninos e meninas apresentam redes de regulação gênica diferentes na placenta, explicando quais os processos biológicos que contribuem para os diferentes desfechos entre os sexos; demonstrar que genes do imprintoma e genes associados ao dimorfismo sexual são importantes neste contexto. Mais especificamente, genes do imprintoma devem estar enriquecidos nos conjuntos gênicos de resposta da placenta à diferentes estressores, e as redes regulatórias de meninos e meninas devem apresentar diferenças de modularidade, conectividade, processos biológicos, e de envolvimento do imprintoma. Para estudar o efeito dos cromossomos sexuais - independentemente da ação hormonal - na resposta ao estresse, o modelo ideal seria avaliar o início da diferenciação placentária em modelo transcricional de célula única, assim também pretendemos desenvolver um pipeline de bioinformática que permita a execução deste experimento em projeto futuro.

2.0 OBJETIVOS

- 1) Mostrar que o imprintoma, e não apenas genes imprintados, estão enriquecidos na resposta placentária à diferentes estressores.
- 2) Mostrar as diferenças de enriquecimento para processos biológicos, de envolvimento do imprintoma, e da topologia das redes de regulação gênica de placentas de meninos e meninas, quando expostos ao estresse intra útero.
- 3) Desenvolver um pipeline de análise de sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq).

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Conjuntos de dados para expressão diferencial e redes de regulação

Para analisar a resposta à diferentes condições estressoras, utilizamos dados provenientes dos bancos públicos GEO e ArrayExpress. Foram utilizados quatro conjuntos de dados de expressão gênica placentária de *Mus musculus*, e que contemplam os seguintes fatores de estresse materno: dieta rica em gorduras (DRG) (Gabory et al., 2012), hipóxia (Larkin and Sadovsky, 2013), exposição a bisfenol-A (Tait et al., 2015), e dieta sem ácido fólico (McKay et al., 2016) (**Tabela 1**).

A construção das redes de regulação gênica foi realizada com um conjunto de dados de RNA-seq de 169 placentas de meninos e meninas (Deyssenroth et al., 2017). Esse conjunto abrange crianças que nasceram tamanho adequado para idade gestacional (AIG, controle), bem como crianças que nasceram grandes e pequenas para idade gestacional (PIG e GIG, estresse) (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Dados de expressão gênica de placenta utilizados no presente estudo.

Condição	Organismo	Nº amostral	Sexo	Plataforma e Acesso
Dieta rica em gordura (DRG)	<i>Mus musculus</i>	4 - Controle	Macho	Affymetrix Mouse Exon 1.0 ST GSE29585
		4 - Caso	Macho	
		4 - Controle	Fêmea	
		4 - Caso	Fêmea	
Hipóxia	<i>Mus musculus</i>	3 - Controle	Macho	Agilent G3 Mouse GE 8x60k GSE46381
		3 - Case	Macho	
		3 - Controle	Fêmea	
		3 - Caso	Fêmea	
Bisfenol A	<i>Mus musculus</i>	3 - Controle	NA	Agilent Mouse Genome 4x44k GSE63852
		4 - Caso (low)	NA	
		4 - Caso (high)	NA	
Ácido Fólico	<i>Mus musculus</i>	6 - Controle	NA	Affymetrix NuGO Mm1a520177 E-MTAB-3940
		6 - Caso	NA	
Tamanho inapropriado para a idade gestacional	<i>Homo sapiens</i>	51 - Controle	Menina	RNA-Seq Illumina HISEq SRP095910
		35 - Caso	Menina	
		43 - Controle	Menino	
		40 - Caso	Menino	

3.2 Imprintoma em *Mus musculus*

A rede de interação do imprintoma (genes imprintados + genes parceiros no interactoma) para *Mus musculus* foi construída utilizando os genes imprintados da espécie (<http://geneimprint.com>) como sementes, e adicionando à rede os genes que realizam interações diretamente com os imprintados, a partir das interações proteína-proteína do banco STRING. Inicialmente todas as interações de *Mus Musculus* foram baixadas do banco, e utilizamos apenas àquelas com score maior que 700 (definidas como confiáveis pelo banco; o score é definido pela soma de diferentes evidências que apoiam a existência da interação), para considerar os genes que interagem diretamente com os genes imprintados. O banco de interações STRING apresenta interações com evidências experimentais e de

predições derivadas de fontes como; predições genômicas, co-expressão e *text mining*.

3.3 Expressão diferencial em placenta de *Mus Musculus*

Para cada *dataset*, o controle de qualidade foi realizado para observar a presença de amostras *outliers*, bem como problemas técnicos que poderiam prejudicar ou invalidar a utilização de amostras. Inicialmente pseudo-imagens das lâminas foram geradas para checar possíveis problemas espaciais. Plots de controle de hibridização, transcrição reversa e degradação do RNA foram gerados utilizando probes controles das plataformas. Finalmente, foram gerados e analisados MA-plots pré e pós normalização, clusterização e correlação das amostras, e boxplots para identificação de amostras outliers. Todas as análises de qualidade foram realizadas no R utilizando os pacotes, Oligo, LIMMA, xps, Affy e BeadArray.

As análises de expressão diferencial foram realizadas com três pacotes do R: SAM (Significance Analysis of Microarray), LIMMA (Linear Models for Microarray Data) e RP (Rank Product), que utilizam metodologias diferentes. Para cada dataset foram realizadas as comparações entre os grupos Estresse Vs Controle, utilizando as três metodologias. Apenas os genes que obtiveram p-valor menor que 0,05 para os três métodos foram considerados diferencialmente expressos.

As análises de enriquecimento para processos biológicos (GO) dos genes diferencialmente expressos foram realizadas na ferramenta web WebGestalt, utilizando o método Overrepresentation Enrichment Analysis (ORA) e considerando FDR menor que 0,05.

3.4 Hiper-representação e ranqueamento

As análises de enriquecimento do imprintoma nos conjuntos de genes diferencialmente expressos foram realizadas utilizando a ferramenta MSET, implementada no R. O MSET realiza randomizações calculando a frequência em que se obtém o mesmo *overlap* de genes entre as listas de interesse, construindo

conjuntos aleatórios de genes do mesmo tamanho que o conjunto gênico de interesse, em todo o universo de genes presente na análise. Assim, repetindo o processo por 10 mil vezes (parâmetro escolhido pelo usuário de acordo com seu número amostral), verificamos a probabilidade de um conjunto de genes estar representado em outro fruto do mero acaso. Consideramos o p-valor (da permutação) menor que 0,05 para aceitar que existe hiper-representação.

As análises de ranqueamento foram realizadas utilizando a função `TestNodeRank` do pacote `ALPACA` do R. Basicamente a função testa se um conjunto de genes é altamente ranqueado em outro conjunto, de acordo com alguma metodologia de ranqueamento (por exemplo, p-value). A função realiza permutações para verificar se conjuntos aleatórios de genes apresentam ranqueamento igual ao de nossas listas de interesse, definindo a probabilidade do nosso ranqueamento acontecer ao acaso. Consideramos o p-valor (da permutação) menor que 0,05 para aceitar a hipótese de alto ranqueamento.

3.5 Redes de regulação na placenta em humanos

As redes de regulação construídas para entender a resposta de cada sexo frente a condições adversas foram construídas utilizando o dado bruto de expressão gênica obtido do estudo de Deyssenroth (Deyssenroth et al., 2017) (**Tabela 1** - seção 3.1). Para cada sexo foram construídas duas redes regulatórias, uma para caso (placentas de crianças com peso inadequado para a idade gestacional) e uma para controle (peso adequado para idade gestacional). As redes caso e controle do sexo feminino foram inferidas com 35 e 51 amostras respectivamente, e as redes caso e controle do sexo masculino 40 e 43.

3.5.1 Método PANDA

As redes de regulação foram construídas utilizando o pacote `PANDA` implementado no R. O método `PANDA` (Glass et al., 2013; Lopes-Ramos et al., 2020) integra dados de expressão gênica, dados de PPI de fatores de transcrição, e dados de *TF-motif-binding* (presença de sítio de ligação de um dado fator de transcrição em uma dada região gênica regulatória), para inferir interações diretas entre fatores de transcrição (TFs) e seus genes alvo (*targets*).

O algoritmo utiliza o dado de TF-motif como uma rede regulatória inicial, e refina esta rede integrando a expressão gênica dos genes alvo e dados de PPI dos TFs (**Figura 1**). Deste modo, o algoritmo estima os pesos das possíveis arestas (TF-target) com base na evidência de que a informação de um fator de transcrição em particular *i*, está sendo passada com sucesso para um gene *target* em particular *j*. Basicamente a metodologia assume duas premissas: a primeira é de que genes regulados pelo mesmo fator de transcrição devem ser co expressos; e a segunda é que fatores de transcrição que realizam interações entre si devem regular um grupo similar de genes. Assim, os pesos atribuídos às arestas entre fatores de transcrição e genes *target*, vêm da concordância entre as premissas citadas acima, que na metodologia é medida de duas formas. Primeiro, mede-se a correlação da expressão entre o gene *target j* e os demais genes *target*. E segundo, é observado se o fator de transcrição *i* possui *motifs* nesses mesmos genes. Esta concordância é medida usando a similaridade de Tanimoto. Um gene é dito estar 'disponível' se houver fortes evidências desse tipo de concordância. Análogo ao conceito de 'disponibilidade', o conceito de 'responsabilidade' similarmente se concentra nas arestas da rede 'Fator de Transcrição-Gene', mas nesse caso mede a concordância entre TFs que interagem com o fator de transcrição *i* e a respectiva força de evidência de uma via regulatória entre esses fatores de transcrição e o gene *j*. Uma abordagem iterativa atualiza os pesos de arestas de forma incremental, à medida que surgem evidências de novas arestas. Este processo continua até que o algoritmo atinja um ponto de convergência estabelecendo uma pontuação final para a força da informação que suporta um mecanismo regulador para cada combinação de pares de fatores de transcrição e genes.

Figura 1 - Representação do algoritmo PANDA.

Extraído de: (Schlauch et al., 2017)

3.5.2 Inferência e comparação das redes

Os dados brutos de expressão (RNAseq) foram baixados do repositório Sequence Read Archive (SRA) e a qualidade do sequenciamento foi verificada utilizando a ferramenta FastQC. Após a remoção de adaptadores presentes nas sequências (Cutadapt), as *reads* (50 pb) foram mapeadas no genoma humano (hg38) utilizando o alinhador Hisat2, e a quantificação realizada pelo software HTSeq. Inicialmente foram removidos todos os genes com baixos níveis de expressão ($< 0,3$ counts per million).

Os dados de *motif-binding* para fatores de transcrição foram obtidos do estudo de (Sonawane et al., 2017), e engloba interações entre 644 fatores de transcrição e 30243 genes. Para a construção deste dado, o estudo selecionou as sequências reconhecidas (*motifs*) por fatores de transcrição presentes no banco *Catalog of Inferred Sequence Binding Preferences* (CIS-BP), e para cada TF mapeou sua sequência específica (usando sua *position weight matrix*) no genoma humano (hg19), utilizando o software *Find Individual Motif Occurrences*. Apenas os alinhamentos que ocorreram no intervalo de -750pb a +250 pb dos sítios de iniciação de transcrição, e com p-valor menor que 10^{-5} , foram selecionados.

A rede PPI dos fatores de transcrição foi criada utilizando dados do banco STRING, que foi baixado e filtrado para conter apenas as interações entre os TFs presentes no dado TF-motif, e dentre essas mantivemos apenas as interações altamente confiáveis (escore > 900).

As comparações das redes entre caso Vs controle para cada sexo, foram realizadas utilizando o pacote ALPACA, do R. Alpaca é um método que compara globalmente duas redes (no nosso caso, as redes PANDA), usando uma rede como baseline (controle), e uma rede perturbada (caso) para encontrar módulos que melhor caracterizam a perturbação. O algoritmo é baseado na maximização da modularidade e seu aspecto único é que, em vez de calcular a modularidade baseando-se na comparação com a distribuição de arestas de um modelo nulo aleatório, o algoritmo utiliza um modelo nulo baseado na rede baseline, diminuindo o limite de resolução que é observado em métodos de maximização da modularidade. Então, após definir a estrutura modular das rede caso e controle, o ALPACA encontra os genes e arestas que diferenciam os módulos das duas redes, e modulariza novamente esses genes, construindo assim os módulos diferenciais. Para cada módulo o alpaca atribui um escore à cada gene, que reflete a importância do gene na disrupção modular entre as redes caso e controle.

Figura 2 - Representação do algoritmo ALPACA.

Extraído de: (Padi and Quackenbush, 2018)

3.5.3 Enriquecimento para processos biológicos

As análises de enriquecimento para processos biológicos das redes de regulação gênica foram realizadas utilizando o pacote ClusterProfiler, do R. Como as metodologias descritas acima, essa função também realiza um teste hipergeométrico. Consideramos apenas as categorias funcionais (GO) que possuíam cinco ou mais genes anotados em nosso dataset, e FDR menor 0,05 para considerar enriquecimento.

3.5.4 Fatores de transcrição *drivers* da mudança regulatória

Para encontrar os principais fatores de transcrição direcionadores dos estados de transição exibidos entre as redes de regulação de meninos e meninas, realizamos análises com o pacote MONSTER, no ambiente R. O MONSTER é uma ferramenta para identificar fatores de transcrição responsáveis por mudanças de estado. Estados celulares específicos são frequentemente associados a padrões distintos de expressão gênica, e esses estados são plásticos, mudando na transição da saúde para a doença. Uma extensão relativamente simples desse conceito é reconhecer que podemos classificar diferentes tipos de células pelos seus genes ativos em suas redes reguladoras e que, conseqüentemente, as transições entre estados celulares podem ser modeladas por alterações nessas redes reguladoras. O algoritmo do MONSTER é um método baseado em regressão que, assim como o PANDA, também conta com a integração de dados de TF-motif e expressão gênica de duas condições. O objetivo é gerar redes bipartidas a partir dos dados de expressão gênica que quantificam evidências dos papéis reguladores de cada um dos TFs, para cada um dos genes. Em seguida, os TFs críticos são identificados pelo cálculo de uma matriz de transição, que mapeia a rede de regulação de genes no primeiro estado para a rede de regulação de genes no segundo estado. Finalmente, o algoritmo testa a significância estatística de seus resultados, permutando as amostras n vezes e executando novamente a análise para cada permutação; Essa ferramenta foi utilizada com os mesmos inputs para a análise PANDA.

3.6 Regulação gênica no trofoblasto em desenvolvimento

Para inferir redes regulatórias em células placentárias no início do desenvolvimento, realizamos o sequenciamento dos transcriptomas (single-cell RNA-seq) de células HiPS (*human induced pluripotent stem cells*) que foram submetidas à diferenciação para trofoblasto. O sequenciamento foi gerado no oitavo dia de diferenciação usando o método Drop-Seq (Macosko et al., 2015), no qual permite analisar a expressão de mRNA de milhares de células individualmente.

3.6.1 Pré-processamento, quantificação e caracterização celular

Inicialmente, as reads *paired-end* foram unidas em um único arquivo BAM. A qualidade dos dados de sequenciamento foi acessada utilizando a ferramenta FastQC e as reads que possuíam alguma base com qualidade inferior a 10 no barcode celular (*cellbarcode*) e/ou molecular (*UMIbarcode*) foram removidas. Os adaptadores SMART na extremidade 5' e as caudas polyA na extremidade 3' (6 ou mais bp) foram removidos da read 2 (de cada par), e depois alinhados ao genoma humano (GRCh38) usando o HISAT2 v2.1.0. As reads que apresentaram mapeamento único foram mantidas e agrupadas por barcode celular. UMIs com uma distância de edição = 1 foram mesclados (agrupados em um único UMI), e a quantificação dos transcritos foi definida de acordo com o número total de UMIs distintos para cada gene, em cada célula.

Todas as análises de controle de qualidade das células, agrupamento e expressão diferencial foram realizadas usando o pacote Seurat (Butler et al., 2018) v3.0 R. Os dados foram inicialmente filtrados para remover células de baixa qualidade. As células com menos de 1000 genes detectados e com mais de 20% de expressão de RNA mitocondrial foram descartadas, e os genes expressos em menos de 3 células também foram removidos. Os dados foram normalizados considerando o número de counts e a porcentagem de genes mitocondriais em cada célula, utilizando a abordagem SCTransform (Hafemeister and Satija, 2019).

Para encontrar agrupamentos de células foram utilizados os 30 primeiros componentes principais (PCs), utilizando a abordagem dos K-vizinhos mais próximos (KNN) com base na distância euclidiana no espaço PCA, com subsequente refinamento dos pesos das arestas usando Semelhança de Jacard. Então, os clusters são definidos usando o vizinho mais próximo compartilhado (SNN) e otimizando a modularidade a partir do algoritmo Louvain.

Os genes marcadores de cada cluster foram definidos a partir da análise de expressão diferencial comparando cada cluster contra todos os demais.

3.6.2 Redes de regulação gênica

O pacote PANDA foi usado para construir redes de regulação para cada cluster de células, utilizando como rede inicial o mesmo dado de TF-motif utilizado para a placenta, e a mesma metodologia para construir a rede PPI. As medidas de centralidade das redes foram encontradas utilizando o pacote Igraph v1.2.4 R. Para cada cluster, a significância dos betweenness foi calculada com base na distribuição de probabilidade de 100 redes aleatórias construídas com o mesmo número de arestas e conexões.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados e discussão de acordo com os objetivos propostos. Inicialmente serão apresentados os resultados das análises do imprintoma na estruturação e resposta da placenta de *Mus musculus* e de humanos ao estresse gestacional.

Em seguida serão apresentadas as redes de regulação gênica da placenta de meninos e meninas nascidos com tamanho adequado e inadequado para a idade gestacional, comparando as regulações de cada sexo.

Apresentaremos então análises do perfil transcricional de células iPS diferenciadas em células primitivas do trofoblasto, e genes envolvidos na rede de regulação.

4.1 Resposta ao estresse em placentas de *Mus musculus*

Inicialmente gostaríamos de responder se o imprintoma está envolvido com a resposta da placenta a diversos tipos de estresse durante a gestação. Para isso foram utilizados dados de quatro estudos, e cada um utilizou uma condição estressora diferente sobre as fêmeas grávidas - dieta rica em gorduras, hipóxia, ingestão de Bisfenol A, e depleção de folato - e as respectivas placentas da prole foram utilizadas para medir a expressão gênica. Para cada condição testamos a diferença de expressão comparando caso e controle, utilizando três metodologias diferentes. Utilizamos teste de permutação (SAM), modelo linear (limma), e ranqueamento de fold change (RP), e consideramos diferencialmente expressos os genes que apresentaram p-valor menor que 0,05 nas três análises. As condições apresentaram entre 372 e 2619 genes diferencialmente expressos (**Figura 3**).

Para compreender a especificidade da resposta placentária a cada tipo de estresse, verificamos o número de genes e vias biológicas (GO terms) compartilhadas entre os diferencialmente expressos de cada condição (**Figura 3**).

Figura 3 - Overlap entre os genes diferencialmente expressos de cada condição estressora (esquerda); Overlap entre as categorias funcionais (GO) para cada condição estressora (direita).

Observamos que o *overlap* total (entre todas as condições) foi quase nulo, sugerindo que a resposta placentária deve ser, de forma geral, específica para cada estresse. As top 10 categorias funcionais **específicas** de cada estresse estão descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Top 10 processos biológicos (GO) específicos de cada condição estressora. A condição Dieta sem Folato não apresentou nenhuma categoria funcional específica.

Hipóxia	Dieta rica em Gordura	Bisfenol A	Dieta sem Folato
<i>Oxoacid metabolic process</i>	<i>Regulation of superoxide metabolic process</i>	<i>Organic substance transport</i>	
<i>Defense response to other organism</i>	<i>Reactive oxygen species metabolic process</i>	Figura 4 <i>Intracellular transport</i>	
<i>Cellular response to cytokine stimulus</i>	<i>Superoxide metabolic process</i>	<i>Translation</i>	
<i>Cell junction organization</i>	<i>Response to acid chemical</i>	<i>Peptide biosynthetic process</i>	
<i>Regulation of immune response</i>	<i>Carboxylic acid transmembrane transport</i>	<i>Protein localization</i>	
<i>Regulation of cytokine secretion</i>	<i>Regulation of superoxide anion generation</i>	<i>Protein modification by small protein conjugation or removal</i>	
<i>Taxis</i>	<i>Organic acid transmembrane transport</i>	<i>Cellular respiration</i>	
<i>Cytokine secretion</i>	<i>Superoxide anion generation</i>	<i>Endosomal transport</i>	
<i>Positive regulation of immune response</i>	<i>Positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation</i>	<i>Protein modification by small protein conjugation</i>	
<i>Reproductive process</i>	<i>Trabecula morphogenesis</i>	<i>Protein ubiquitination</i>	

A fim de verificar se os genes do imprintoma estão relacionados com a resposta da placenta ao estresse em *Mus musculus*, construímos para essa espécie a rede que chamamos de imprintoma, já que ela foi inicialmente descrita para humanos. Para a construção da rede utilizamos 124 genes imprintados descritos (<http://geneimprint.com>) para *Mus musculus* e selecionamos o primeiro vizinho de cada gene imprintado no banco de interações proteína-proteína STRINGDB. A rede apresentou 1714 genes, sendo 124 genes imprintados e 1590 genes parceiros do interactoma.

Cada grupo de genes diferencialmente expressos foi testado se estava enriquecido com genes do imprintoma. Para as quatro condições estressoras, observamos hiper-representação de genes do imprintoma (p-valor: Dieta rica em gordura 0,0001; Hipóxia 0,0152; Bisfenol-A 0,004; Dieta sem folato 0,0059). Na **Figura 4** podemos observar o número de genes do imprintoma compartilhados por cada condição estressora. Novamente vemos uma especificidade nos conjuntos de genes de cada resposta. Apesar de as quatro condições apresentarem enriquecimento para genes do imprintoma, esses genes parecem ser específicos para de cada condição

Figura 4 - Overlap entre os genes diferencialmente expressos de cada condição extressora e que fazem parte do imprintoma.

4.2 Regulação gênica da placenta em humanos

Averiguamos também a possível relação do imprintoma com a gestação humana, utilizando diferentes conjuntos de dados da literatura. Dessa vez, utilizamos o imprintoma humano descrito por Sandhu (Sandhu, 2010), composto por 937 genes.

4.2.1 Módulos de co-expressão da placenta e o imprintoma

Verificamos inicialmente se o imprintoma estava presente em módulos de co-expressão da placenta, descritos no estudo de Deyssenroth (Deyssenroth et al., 2017). Nesse estudo, os autores utilizaram transcriptomas de 200 placentas, provenientes de crianças que nasceram com peso adequado (AIG) ou inadequado (pequenas PIG; grandes GIG) para sua idade gestacional, e construíram uma rede de co expressão global utilizando todas as amostras.

Dos 17 módulos de co-expressão apresentados no estudo, obtivemos hiper-representação de genes do imprintoma em 7 deles. O estudo mostra que cada módulo apresentou enriquecimento para categorias funcionais (*GO terms*) específicas, e os sete módulos enriquecidos para genes do imprintoma apresentaram enriquecimento de processos/funções de angiogênese e crescimento (*vasculature development, organ development*), regulação da expressão gênica (*histone modification, helicase activity, protein targeting to ER membrane*), e metabolismo energético (*cellular respiration, macromolecule metabolism*). Esses processos são descritos na literatura como processos críticos para o desenvolvimento e função placentária, e consequentemente para o desenvolvimento fetal normal.

Interessantemente, o estudo mostra também que esses sete módulos apresentaram enriquecimento para genes com variantes (*GWAS-linked genes*) associadas a fenótipos (*Vascular endothelial growth factor levels, IgG glycosylation, Asymmetrical dimethylarginine levels, Blood pressure, Phospholipid levels*), que coerentemente estão relacionados às categorias funcionais enriquecidas nos módulos, e também são associados ao desenvolvimento placentário e fetal normal. Observamos que, dentre os 402 genes *GWAS-linked* enriquecidos nos sete módulos, apenas 29 genes também fazem parte do imprintoma. Analisando os 402 genes *GWAS-linked*, verificamos que estes estão enriquecidos (*Fisher exact test*; $p\text{-valor} < 0.05$) para vias de diferenciação e proliferação celular, resposta a estresse, crescimento, sistema imune, adesão celular, transporte, sinalização, imprinting genômico. Notavelmente, suas funções moleculares estão

especialmente enriquecidas (*Fisher exact test*; p -valor < 0.05) para mecanismos de regulação da expressão gênica e epigenéticos (Por exemplo: *DNA-binding transcription factor activity*, *histone methyltransferase activity*, *cysteine transmembrane transporter activity*), bem como outras importantes funções relacionadas ao desenvolvimento fetal e ambiente materno (*growth factor binding*, *dopamine binding*, *L-DOPA binding*, *catecholamine binding*, *steroid hormone receptor activity*).

Esses resultados sugerem que a reatividade e programação da placenta em resposta à adversidade ambientais, pode estar em parte, organizada em sub-redes gênicas específicas, no qual genes relacionados à homeostase intrauterina e desenvolvimento placentário e fetal (imprintoma), interagem com genes que estão sob influência de um efeito aditivo ou interativo, de variantes e do ambiente. A hiper-representação do imprintoma nessas comunidades reforça a sua relação com a formação, reatividade, e adaptação da placenta nas circunstâncias gestacionais.

Para entender melhor as relações gênicas dentro das sub-redes, investigamos se genes do imprintoma poderiam ser topologicamente impactantes na estrutura dos módulos. Para isso, verificamos se genes do imprintoma seriam genes *hub* em cada módulo de co-expressão. Genes *hub* são aqueles que topologicamente mantêm a estrutura da rede por realizar um número de conexões/correlação altamente superior ao da média dos genes presentes na rede. Pela natureza da rede de co-expressão, estudos que utilizam essa técnica costumam considerar *hubs*, aqueles que apresentam sua expressão altamente correlacionada com o *eigengene* (primeiro componente principal) do módulo, assim, consideramos os genes presentes no percentil 90 (da distribuição de correlação) como sendo *hubs* daquele determinado módulo. Observamos que 15 módulos apresentaram genes do imprintoma entre seus *hubs*. De forma geral, os *hubs* pertencentes ao imprintoma participam de vias que refletem os processos biológicos para qual o módulo está enriquecido, coerentemente mostrando a influência do *hub* no módulo. Por exemplo, 82% (28/34) dos *hubs* do módulo

relacionado à síntese de proteínas fazem parte do imprintoma. São em maior parte genes ribossomais, e estão enriquecidos para processos biológicos relacionados a tradução (*nuclear-transcribed mRNA catabolic process, translational initiation, regulation of translation, ribosome assembly, cytoplasmic translation, rRNA processing*), resposta a estresse (*cellular response to hydrogen peroxide, DNA-damage response, defense response to Gram-negative bacterium*) e morte celular (*cellular response to tumor necrosis factor, positive regulation of apoptotic process, positive regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process*). Outro exemplo é o módulo relacionado ao desenvolvimento vascular que apresentou 32 *hubs* do imprintoma, e estavam enriquecidos para processos regulatórios promotores de angiogênese (*VEGF-activated platelet-derived growth factor receptor signaling pathway; Regulation of hematopoietic progenitor cell differentiation; Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade; Positive regulation of Ras protein signal transduction; Regulation of blood vessel endothelial cell migration; Positive regulation of nitric-oxide synthase biosynthetic process; Positive regulation of MAP kinase activity; Response to follicle-stimulating hormone*), bem como invasão/adesão celular (*Positive regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis; Positive regulation of extracellular matrix disassembly; Microspike assembly; Positive regulation of lamellipodium assembly; Regulation of extracellular matrix constituent secretion; Cell junction assembly; Regulation of microvillus assembly; Cell-matrix adhesion involved in ameboidal cell migration*) e resposta a estresse (*Response to corticosterone; Response to fluid shear stress; Regulation of translation in response to stress; Regulation of DNA-templated transcription in response to stress; Response to wounding; Response to hyperoxia; Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to hypoxia*).

Embora tenhamos encontrado hiper-representação dos genes do imprintoma em sete módulos (dos 17 apresentados no estudo), observamos que 15 módulos apresentaram hubs para o imprintoma, o que significa que a influência exercida por eles se estende em praticamente todas as subredes. Interessantemente, encontramos 35 genes *hub* do imprintoma que estão

altamente correlacionados (correlação acima do percentil 80) para mais de um módulo. Isso sugere que, embora o conceito do imprintoma tenha nascido de uma rede altamente intraconectada, no contexto global placentário essa rede é subdividida em diversos módulos e esses 35 genes fazem a ponte entre essas subredes. Dentre os 35 genes, 12 são regulados pelo fator de transcrição SOX3 (CHD3, ETV6, GNAS, HIPK2, MCM3, MDM4, PLAGL1, RERE, SNRPD2, SPEN, TLE4, TNK2), quatro pelo fator de transcrição SRY (EIF3I, FBN1, GNB4, POLR2B), e cinco por ambos (ATN1, MAGED1, PTPN14, TJP1, TSSC4).

Os resultados iniciais em placentas termo nos mostra que, pelo menos no final da gestação, genes do imprintoma estão localizados em espaços importantes e impactantes para as sub redes gênicas. Investigamos então se o imprintoma poderia estar relacionado a outros momentos gestacionais, e assim verificamos a participação destes genes em módulos temporais da placenta.

4.2.2 Imprintoma em módulos de co-expressão temporais da placenta

No estudo de (Buckberry et al., 2017), os autores construíram módulos de co-expressão de placentas (sem estresse gestacional), utilizando amostras de cada trimestre da gestação, a fim de observar a possível existência de módulos preservados ao longo de toda gestação (**Figura 5**).

Figura 5 - Preservação de módulos de co-expressão da placenta ao longo da gestação.

Extraído de: (Buckberry et al., 2017)

Os dois módulos considerados pelos autores como preservados ao longo da gestação (M3 e M4), apresentaram enriquecimento para genes do imprintoma (M3 $p\text{-valor}=0,009$ $fold\ enrichment=1,31$; M4 $p\text{-valor}=0,0276$ $fold\ enrichment=1,32$). Novamente, os processos/funções biológicas associados a esses módulos (*Cardiovascular system development*; *Cell adhesion*; *Growth-factor binding*; *Response to stimulus*; *Nucleosome assembly at centromere*; *Platelet-derived growth factor binding*; *Extracellular matrix structural constituent*; *Signaling receptor activity*; *Actin binding*; *Adenylate cyclase activity*; *Vasoactive intestinal polypeptide receptor activity*) são conhecidos por estarem na relação entre estresse gestacional e desenvolvimento placentário/fetal. Genes do imprintoma também estiveram entre os *hubs* de diversos módulos (M4, M6, M8, M9, M10, M13). Dentre esses módulos observamos que M6, M9 e M10 apresentaram-se específicos do terceiro trimestre gestacional, e M13 e M8 para segundo e terceiro trimestre. Os autores descrevem também que o módulo M9 apresentou

enriquecimento para genes associados a nascimento prematuro. O enriquecimento do imprintoma nos módulos conservados para toda a gestação nos indica que esses genes são estruturalmente centrais para o desenvolvimento gestacional. Assim como observamos estudo anterior, a rede imprintoma deve se estender a partir de genes que fazem a ponte com outras sub redes, e essas devem realizar funções mais específicas segundo a programação do desenvolvimento.

4.2.3 Redes de regulação gênica de resposta ao estresse sexo-específicas na placenta

Os resultados acima evidenciam que o imprintoma está relacionado a redes fundamentais para desenvolvimento, que conseqüentemente devem ser reorganizadas em resposta às adversidade ambientais. Deste modo, como a literatura já mostrou, a resposta ao ambiente ocorre de forma diferente entre os sexos, e o sexo do feto é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças associadas a estresse pré-natal. Inicialmente verificamos se genes diferencialmente expressos entre meninos e meninas, de placentas sem estresse, estavam enriquecidos para o imprintoma. Não houve enriquecimento como esperado, sugerindo que o imprintoma não está diretamente relacionado ao dimorfismo sexual na expressão gênica placentária.

A literatura mostra que diversos tecidos apresentam expressão gênica sexo específica, e entender as diferenças dessas redes regulatórias entre os sexos pode trazer *insights* a respeito de fenótipos com viés sexual. No caso do presente estudo, enxergar sob uma perspectiva sistêmica pode trazer informações de interações não captáveis quando se observa apenas os níveis de mRNA na célula. Por exemplo, (Chen et al., 2016) mostraram que a expressão de receptores de hormônios sexuais não é diferencialmente expressa entre os sexos em diversos tecidos, implicando que o dimorfismo sexual relacionado a esses fatores deve ocorrer a partir de uma regulação sexo específica.

Assim buscamos investigar como o imprintoma estaria inserido em redes de regulação gênica específicas para cada sexo, quando existe a variável estresse.

Usando a ferramenta PANDA construímos redes de regulação utilizando dados de transcriptoma de 169 amostras de placenta. Como exposto na introdução, o crescimento anormal do concepto pode ser considerado um marcador da resposta placentária à exposição ao estresse gestacional. Sendo que crianças consideradas pequenas para idade gestacional (PIG) ou grandes para idade gestacional (GIG) associam-se à exposição de diferentes fatores de risco com possíveis consequências no desenvolvimento cognitivo e metabólico. Sendo assim, o tamanho do concepto é utilizado como fenótipo associado com a resposta placentária à exposição a diferentes fatores estressores gestacionais.

A metodologia do PANDA integra dados de expressão gênica, TF-motif binding e interação proteína-proteína. Assim o método infere possíveis novas arestas entre fatores de transcrição e genes atribuindo pesos a todas possíveis interações. Resumidamente, o algoritmo da PANDA supõe que os genes alvos pelo mesmo TF têm maior probabilidade de serem coexpressos do que os genes que são regulados por TFs diferentes. Usando um dados motif-TF como modelo inicial de rede, o algoritmo refina e atualiza o modelo calculando a congruência entre duas medidas: 1) Concordância na coexpressão de genes que apresentam ligação para um mesmo TF e 2) Concordância no perfil regulatório de um conjunto de TFs que interagem entre si por meio de dados de interação proteína-proteína. Portanto, a probabilidade de interação entre um TF e um gene alvo é dada pelo peso de sua aresta, que determina a coordenação da expressão dos alvos por um complexo de TFs. O PANDA gera arestas com pesos normalizados (z-score), portanto, pesos positivos e negativos podem ser vistos como interações prováveis e improváveis, respectivamente.

Para comparar a resposta dentro de cada sexo, construímos uma rede caso e uma rede controle para meninos, e o mesmo para meninas. Buscamos os fatores de transcrição direcionadores da resposta de cada sexo ao estresse e módulos diferenciais e funções biológicas das redes obtidas.

4.2.3.1 Fatores de transcrição *drivers* da regulação ao estresse sexo-específica na placenta

Estados celulares específicos são frequentemente associados a padrões distintos de expressão gênica. Esses estados são plásticos, mudando durante o desenvolvimento ou na transição da saúde para a doença. Uma extensão relativamente simples deste conceito é reconhecer que podemos classificar diferentes tipos de células por seus genes ativos em redes de regulação e que, conseqüentemente, as transições entre esses estados podem ser modeladas por alterações nessas redes reguladoras. Aqui usamos a ferramenta MONSTER (Modelando Transições de Estado de Rede a partir de Dados de Expressão e Regulatórios), um método baseado em regressão para inferir fatores de transcrição de drivers em uma mudança de estado (por exemplo saúde/doença). A hipótese por trás do MONSTER é que cada fenótipo possui uma rede única de regulação e que uma mudança no estado fenotípico se reflete nas mudanças de direcionamento dos fatores de transcrição ativos. O MONSTER cria representações da rede do estado inicial (saúde) e final (doença) e estima a mudança nos padrões regulatórios dos fatores de transcrição, estimando uma matriz de transição. Para cada fator de transcrição, uma matriz de transição é calculada, representando o envolvimento diferencial do fator de transcrição (dTFI). Através da ordenação dos maiores valores de dTFI, identificamos os fatores de transcrição mais importantes. Essa hipótese se traduz em uma expectativa de que os fatores de transcrição que impulsionam a mudança no fenótipo terão as maiores pontuações no dTFI, sendo considerados fatores de transcrição indutores da diferença observada nos estados.

Na **Figura 6** podemos verificar a pontuação dTFI dos fatores de transcrição (vermelho), e a distribuição nula de fundo dos valores de dTFI (azul) estimada por 100 permutações aleatórias, dos dados de meninos (caso x controle) e meninas (caso x controle). Apenas a comparação entre caso e controle de meninos apresentou um conjunto de TFs com dTFI acima da distribuição nula estimada.

Figura 6 – Superior: distribuição de dTFI para as comparações caso Vs controle para meninas (esquerda) e menino (direita).

Legenda: Cada ponto vermelho representa um TF e seu valor de dTFI, enquanto que os pontos azuis localizados na mesma coluna (vertical) representam os valores de dTFI obtidos nas permutações aleatórias, para esse determinado TF. Inferior: Boxplot dos valores de dTFI para meninas (rosa) e meninos (azul)

A partir da distribuição do dTFI em ambos os sexos, podemos ver que o impacto das alterações transcricionais como determinante de mudança fenotípica, é visivelmente maior para os meninos. Seleccionamos então os primeiros 50 genes direcionadores para a transição masculina ($dTFI > 2,9$). Comparando com os 50 primeiros genes da lista das meninas, apenas PROX1 e HHEX estavam em ambos os grupos. Ambos pertencem à família HOMEBOX e são fundamentais para o desenvolvimento adequado. Ainda que o resultado nas meninas não tenha

atingido significância estatística, selecionamos os top 10 TFs femininos e buscamos a posição de ranqueamento destes na lista masculina. Na **Tabela 4** podemos ver os 10 primeiros TFs das meninas (top 10 dTFI), e suas posições no ranking dTFI masculino.

Tabela 4 – Ranqueamento dos top 10 TFs femininos (rosa), comparando com o ranqueamento destes genes na rede masculina (azul).

Gene	dTFI Score	Ranking	Gene	dTFI Score	Ranking
GMEB2	2.2153975806	1	GMEB2	0.8897096	395
KDM2B	1.3559956023	2	KDM2B	0.2230171	448
NAIF1	1.1486960807	3	NAIF1	0.302676	444
SP3	0.9410188735	4	SP3	0.4112232	437
SIX5	0.8345022326	5	SIX5	1.3346025	336
LMX1B	0.7750359958	6	LMX1B	0.7656492	408
YY1	0.6507470725	7	YY1	0.6814816	414
FOXO6	0.6428400108	8	FOXO6	0.7274956	410
LHX6	0.5800596277	9	LHX6	2.0449872	211
HOXD9	0.5153565689	10	HOXD9	1.1388892	370

Estes resultados sugerem que o impacto do estresse no programa transcricional masculino é maior que no feminino, mas também que os fatores de transcrição direcionadores da resposta de cada sexo não são os mesmos.

Os dados apresentados acima mostram fatores de transcrição indutores da resposta ao estresse, dentro de cada sexo. Comparamos diretamente também o sexo feminino e masculino (controle menina Vs controle menino), buscando fatores de transcrição indutores das diferenças entre sexos. Para tal, realizamos a análise utilizando primeiro meninas como referência (meninas=sau de e meninos=doença), e depois meninos como referência, gerando duas listas definidas como FxM e MxF respectivamente (**Figura 7**). Como esperado, encontramos diferenças entre meninos e meninas, entretanto na comparação FxM não observamos nenhum TF com valor de dTFI maior que os da distribuição nula, e a média de dTFI é mais alta na comparação MxF. Também é importante notar que os valores de dTFI na transição de meninas para meninos (FxM) são quase

todos negativos, e existe uma correlação negativa entre os valores de dTFI nas duas transições (**Figura 7D**).

Figura 7 - Comparação de fatores de transcrição indutores de diferenças entre sexos (amostras controle).

Legenda: A) Comparação entre Meninas Vs Meninos. B) Comparação entre Meninos Vs Meninas. C) Boxplot com os valores de dTFI das comparações MxF (azul) e FxM (laranja). D) Dispersão dos valores de dTFI dos TFs presentes nas duas comparações. Eixo y = FxM, eixo x = MxF.

Comparamos os fatores de transcrição ranqueados na análise entre MxF e estresse masculino (lista de TFs ranqueados na comparação entre meninos expostos a estresse x controles). Na **Figura 8** podemos ver que a maioria dos TFs está presente nas duas listas, sendo 7 e 17 exclusivos de cada comparação. Também podemos ver que existe uma correlação positiva entre os valores de dTFI nas duas comparações, no entanto a magnitude dos valores é maior na comparação de estresse masculino, sugerindo que exista um efeito aditivo entre sexo e estresse, como publicamos em um trabalho de metilação no sangue de cordão em neonatos (Maschietto et al., 2017).

Figura 8 - Comparação dos TFs e dTFIs entre as análises Menino Vs Menina, e Menino caso Vs controle.

Legenda: Acima vemos um Diagrama de Venn com os TFs utilizados nas duas comparações (MxF e Menino controle X Menino caso), e em cada lado da figura vemos os respectivos TFs exclusivos de cada comparação. Abaixo vemos a dispersão dos valores de dTFI dos TFs em comum às duas listas (regressão linear; p-value < 2.2e-16; Adj. R-squared=0.5433.)

4.2.3.2 Módulos da regulação ao estresse sexo-específico na placenta

Para entender melhor a estrutura de resposta e as diferenças entre homens e mulheres, usamos a ferramenta ALPACA (Altered Partitions Across Community Architectures) (Padi and Quackenbush, 2018), que compara duas redes e identifica os módulos que melhor distinguem as redes. Essa ferramenta se baseia na maximização da modularidade, uma técnica comumente usada para encontrar comunidades em redes. Basicamente, a modularidade é uma medida que avalia o quanto uma rede é dividida em grupos (ou módulos), observando a densidade de

conexões entre conjuntos de nós da rede, e comparando com a densidade esperada de uma rede aleatória (mas com a mesma distribuição de número de conexões - *degree-matched*). Assim, a maximização da modularidade busca modularizar uma rede de forma que seus módulos apresentem a maior densidade possível de arestas intra-módulo (maximizar), e ao mesmo tempo a menor densidade possível de arestas entre os módulos (minimizar). Embora esta técnica seja poderosa, ela apresenta um problema de “limite de resolução”, porque só é possível identificar módulos que sejam maiores do que aqueles encontrados na rede aleatória (Fortunato and Barthélemy, 2007). Esse problema é especialmente desvantajoso ao estudar redes transcricionais, que tendem a ter uma estrutura densa e hierárquica, e no qual as unidades funcionais (genes) só se tornam evidentes sob diferentes condições ambientais (Gerstein et al., 2012).

No ALPACA, o “limite de resolução” é substancialmente diminuído por que em vez de utilizar um modelo de rede aleatória, a modularidade é definida por exemplo, comparando uma rede de “doença” com um modelo nulo baseado em uma rede “saúde”. Após aplicar a modularização nas duas redes, o algoritmo define uma pontuação chamada “modularidade diferencial”, fruto da comparação da densidade dos módulos na rede “perturbada” com a densidade esperada na rede controle (ou baseline), permitindo contrastar e particionar os nós em módulos diferenciais ideais, sem depender de configurações predefinidas, conjuntos de genes ou vias. Ao contrário dos métodos que simplesmente agrupam as arestas mais diferenciais, a comparação do ALPACA envolve o conjunto completo de arestas das redes de cada condição, assim é possível reduzir o ruído (chance de erro individual de cada aresta) ao estimar um modelo nulo agregado. Como o modelo nulo é baseado na estrutura de módulos de uma rede conhecida, e não em uma rede aleatória, o “limite de resolução” é substancialmente menor e o ALPACA pode detectar pequenos módulos de doenças, ocultos em programas regulatórios maiores associados à funções celulares normais.

Em ambas as comparações (Caso Vs Controle) realizadas para os dois sexos, o ALPACA encontrou nove módulos diferenciais. Observando a **Tabela 5** é

possível notar que tanto a composição (proporção de TFs e targets) dos módulos quanto a priorização na inferência destes, é independente ao seu tamanho ou número de TFs apresentados.

Tabela 5 – Composição de TFs e targets nos módulos diferenciais de resposta ao estresse em meninas (acima) e meninos (abaixo).

	Módulo 1		Módulo 2		Módulo 3		Módulo 4		Módulo 5		Módulo 6		Módulo 7		Módulo 8		Módulo 9	
	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.
Tfs	188	5.16	167	3.00	35	2.01	21	2.34	20	1.80	14	2.13	15	4.31	7	1.88	1	2.27
Targets	3452	94.84	5401	97.00	1710	97.99	877	97.66	1092	98.20	643	97.87	333	95.69	370	98.14	43	97.73
Total	3640	100	5568	100	1745	100	898	100	1112	100	657	100	348	100	377	100	44	100
	Módulo 1		Módulo 2		Módulo 3		Módulo 4		Módulo 5		Módulo 6		Módulo 7		Módulo 8		Módulo 9	
	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.	Número	Porcent.
Tfs	321	5.80	27	1.72	11	3.17	51	1.48	21	2.79	24	1.30	7	1.35	1	0.67	1	1.79
Targets	5213	94.20	1540	98.28	336	96.83	3398	98.52	731	97.21	1820	98.70	512	98.65	149	99.33	55	98.21
Total	5534	100	1567	100	347	100	3449	100	752	100	1844	100	519	100	150	100	56	100

Observamos então, que dentre os TFs presentes em cada comparação (de meninos e de meninas) da resposta ao estresse, apenas 4 (0,8% dos TFs da rede masculina) eram exclusivos do sexo masculino (SRY, HESX1, ZFY, MEOX1) e apenas 9 (1,9% dos TFs da rede feminina) eram exclusivos de meninas (ONECUT2, DMRT2, HNF1B, CEBPE, MLXIPL, GLIS1, HOXB5, LHX9, GBX2). Interessantemente, esses TFs apresentaram uma média de ranqueamento (escore do ALPACA para a importância do gene na estrutura do módulo) similar para ambos os sexos (exclusivos de menino = percentil ~60 ; exclusivos de menina = percentil ~65), entretanto observamos uma grande diferença no impacto global atribuído a esses TFs (ranqueamento do MONSTER: exclusivos de menino = percentil ~26; exclusivos de menina = percentil ~72).

Previamente verificamos que a reorganização dos TFs (MONSTER) na resposta feminina ao estresse é bem menos evidente em meninas, comparado à resposta masculina. Uma possível explicação para essa observação é que, uma vez que os genes específicos do sexo feminino estão mais engajados no controle transcricional de resposta ao estresse desse sexo - visto que contribuem tanto para a organização da rede (formação dos módulos) quanto para o impacto na resposta total - podemos sugerir que a integração entre esses TFs (exclusivos de meninas) com aqueles ligados exclusivamente ao estresse (top TFs no MONSTER), controlaria o impacto na resposta das meninas de forma que a programação transcricional seja menos afetada. Em contrapartida, os gene

específicos do sexo masculino apesar de serem relevantes para a rede de resposta, não parecem apresentar diretamente um impacto relevante no contexto global, o que poderia levar à resposta menos estrigente e mais desproporcional apresentada pelos meninos.

Na figura abaixo podemos observar as distribuições dos valores dTFI (MONSTER) para todos os TFs de cada módulo do sexo masculino.

Figura 11 - dTFI dos módulos da resposta ao estresse em meninos

Legenda: Série = Módulo; cada boxplot denominado como Série corresponde aos valores de dTFI dos TFs de seus respectivos módulos.

Continuando a análise de resposta dos sexos, selecionamos para cada sexo os genes targets mais relevantes (top 25% de escores ALPACA) dos módulos de cada rede, com o intuito de verificar os efeitos específicos da reprogramação entre os sexos. Comparando esses dois grupos de genes, obtivemos 359 genes únicos para meninas, 533 únicos para meninos e 34 genes em comum (CENPQ, LGR6, NINL, PIKFYVE, SHQ1, TRIM21, CHMP5, POLR2K, CLASP1, DHX38, CHMP1B, MRPL47, MRPS23, IGSF11, MRPL54, POLDIP3, MRM3, JMJD4, MRPL27, NUP107, MITD1, TLR4, MRPL21, NOP10, MRPS21, MRPL51, ZMPSTE24, BECN1, RIMS1, NR4A3, MRPS18C, MRPS18B, NUDT21, CDCA5). Nesta comparação fica evidente que o efeito do estresse se reflete em impactos diferentes para os sexos, e que essa reestruturação específica das redes deve ser responsável pelas diferentes respostas ao estresse.

Então, utilizando os targets top25% de cada módulo, verificamos os processos biológicos que esses genes estavam enriquecidos. Na **Figura 9** podemos ver uma representação destes módulos e algumas categorias funcionais relacionadas a eles.

Figura 9 - Módulos diferenciais na resposta ao estresse em cada sexo e apresentação de alguns processos biológicos relacionados.

Os módulos das meninas apresentaram enriquecimento para um total de 46 GOs, e os meninos 83, sendo apenas 10 comuns para ambos os sexos. Todos os GOs compartilhados pertencem a um único módulo, o número 5 de meninas e 6 de meninos.

Para o sexo feminino, observamos que o módulo 1 apresentou enriquecimento para regulação positiva do ciclo circadiano, biossíntese de fosfolípidos e fusão de membranas; módulo 2 - processos de metabolismo de ácidos nucleicos e ácidos graxos, mais especificamente catabolismo; módulo 3 - estabilização e catabolismo de mRNA; módulo 5 - processos associados a complexos de ribonucleoproteínas, retículo endoplasmático, expressão gênica mitocondrial, tradução e localização cromossômica; módulo 6 - resposta imune, angiogênese e homeostase térmica; módulo 7 - ancoramento de microtúbulos e o módulo 8 metilação de RNA.

Para o sexo masculino, o módulo 1 mostrou-se associado a regulação vascular, termogênese, processos musculares e diferentes processos biológicos relacionados a sinaptogênese e plasticidade sináptica; módulo 2 - regulação da transição G0 para G1 do ciclo celular; módulo 3 - desenvolvimento do telencéfalo; módulo 4 - transdução de sinal envolvendo regulação de expressão gênica; módulo 6 - idem ao módulo 5 de meninas e também processos de produção energética e diferenciação celular; módulo 7 - processamento de RNA ribossomal.

Mais uma vez com o intuito de verificar o quanto dos achados acima relacionam-se à diferença de resposta ao estresse entre os sexos, e o quanto é produto do dimorfismo sexual, usando o ALPACA fizemos uma comparação direta entre controles masculinos e femininos. Como explicitado anteriormente, para esta análise é necessário utilizarmos um grupo como referência (baseline), assim fizemos tanto a comparação de meninos Vs meninas (MxF), como meninas Vs meninos (FxM). Na comparação MxF foram encontrados 9 módulos, sendo que 8 destes apresentaram enriquecimento para 236 GO terms (FDR < 0.05). Para a comparação FxM foram encontrados 11 módulos, e 9 destes apresentaram enriquecimento para 183 GO terms (FDR < 0.05).

Na **Figura 12** podemos ver a comparação entre os processos biológicos observados entre as quatro análises - menino caso Vs controle, menina caso Vs controle, menino controle Vs menina controle, e menina controle Vs menino controle.

Figura 12 - Overlap entre os processos biológicos relacionados aos módulos do ALPACA, para as comparações de estresse em cada sexo, e dimorfismo sexual.

Legenda: Grupo Laranja (Gofemtoptargets) – GO terms da comparação Menina caso Vs controle. Grupo Verde (Gofemalebaseline) – GO terms da comparação Menina controle Vs Menino controle. Grupo Azul (Gofemtoptargets) – GO terms da comparação Menino caso Vs controle. Grupo Amarelo (Gofemalebaseline) – GO terms da comparação Menino controle Vs Menina controle.

Com o intuito de remover possíveis confundidores (relação ao dimorfismo sexual) da resposta específica de cada sexo, selecionamos então apenas os genes presentes nos processos biológicos exclusivos das comparações de estresse, e agora verificamos para quais processos esses genes são relacionados. Na **Tabela 6** podemos observar esses processos biológicos, específicos da resposta ao estresse em cada sexo.

Tabela 6 – Processos biológicos exclusivos da resposta ao estresse em meninas (esquerda) e meninos (direita).

female				male			
GeneSet	Description	Size	FDR	GeneSet	Description	Size	FDR
GO:0006575	cellular modified amino acid metabolic process	191	0	GO:0051056	regulation of small GTPase mediated signal transduction	331	0
GO:0006644	phospholipid metabolic process	470	1,3221E-06	GO:0097485	neuron projection guidance	260	1,6777E-09
GO:0006631	fatty acid metabolic process	357	0,000058954	GO:0010975	regulation of neuron projection development	475	4,6241E-09
GO:0006397	mRNA processing	487	0,00080052	GO:1902903	regulation of supramolecular fiber organization	329	2,2467E-06
GO:0061025	membrane fusion	148	0,000022381	GO:0010959	regulation of metal ion transport	360	0,0029194
GO:0043631	RNA polyadenylation	48	0,000082245	GO:0051961	negative regulation of nervous system development	297	0,0038512
GO:0071826	ribonucleoprotein complex subunit organization	245	0,00035963	GO:1990845	adaptive thermogenesis	150	0,0053538
GO:0042558	pteridine-containing compound metabolic process	35	0,0010312	GO:0050803	regulation of synapse structure or activity	221	6,4856E-06
GO:0006643	membrane lipid metabolic process	202	0,0019421	GO:0003013	circulatory system process	480	0,000010863
GO:2000027	regulation of animal organ morphogenesis	207	0,0023501	GO:0060491	regulation of cell projection assembly	199	0,000012968
GO:0034404	nucleobase-containing small molecule biosynthetic process	184	0,0028093	GO:0030900	forebrain development	375	0,00001597
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	330	0,0060923	GO:0048638	regulation of developmental growth	314	0,000032224
GO:1990845	adaptive thermogenesis	150	0,006915	GO:0017038	protein import	211	0,000032224
GO:0006605	protein targeting	412	0,0082176	GO:0035249	synaptic transmission, glutamatergic	90	0,00010632
GO:0048732	gland development	434	0,013228	GO:0006836	neurotransmitter transport	268	0,00012726
GO:0051260	protein homooligomerization	330	0,013944	GO:0010256	endomembrane system organization	401	0,00013619
GO:0055094	response to lipoprotein particle	26	0,015489	GO:0007018	microtubule-based movement	271	0,00014662
GO:0002694	regulation of leukocyte activation	481	0,015972	GO:0040013	negative regulation of locomotion	314	0,00051679
GO:0062012	regulation of small molecule metabolic process	344	0,019373	GO:0002694	regulation of leukocyte activation	481	0,00063863
GO:0002791	regulation of peptide secretion	463	0,022618	GO:0018212	peptidyl-tyrosine modification	389	0,00097635
GO:0072593	reactive oxygen species metabolic process	256	0,026938	GO:0099003	vesicle-mediated transport in synapse	203	0,0013189
GO:0019692	deoxyribose phosphate metabolic process	34	0,032291	GO:0001667	ameboid-type cell migration	381	0,0015466
GO:0050673	epithelial cell proliferation	372	0,032291	GO:0050817	coagulation	326	0,0019651
GO:0034504	protein localization to nucleus	267	0,033141	GO:0007162	negative regulation of cell adhesion	257	0,0030851
GO:0002521	leukocyte differentiation	496	0,035425	GO:0051932	synaptic transmission, GABAergic	45	0,0060257
GO:0032259	methylation	346	0,036395	GO:0090150	establishment of protein localization to membrane	313	0,0057327
				GO:0002448	mast cell mediated immunity	49	0,0076941
				GO:0002009	morphogenesis of an epithelium	480	0,0088116
				GO:0060537	muscle tissue development	371	0,0090695
				GO:1904951	positive regulation of establishment of protein localization	437	0,0091262
				GO:1902850	microtubule cytoskeleton organization involved in mitosis	132	0,009265
				GO:0050919	negative chemotaxis	41	0,013136
				GO:0010927	cellular component assembly involved in morphogenesis	106	0,015662
				GO:0042326	negative regulation of phosphorylation	423	0,021033
				GO:0006403	RNA localization	228	0,021467
				GO:0015849	organic acid transport	313	0,039545
				GO:2001057	reactive nitrogen species metabolic process	72	0,045123

Legenda: Colunas de 1 a 4 contém os GO terms para os genes de resposta ao estresse feminino. Colunas de 5 a 8 contém os GO terms para os genes de resposta ao estresse masculino.

Nesse resultado, podemos observar de forma mais clara que as diferenças importantes da resposta ao estresse do sexo feminino - mas não do sexo masculino - relacionam-se principalmente ao metabolismo de ácidos nucléicos e

lipídeos. Para o sexo masculino observamos que mecanismos de transdução de sinal que afetam o sistema vascular, vias de diferenciação e divisão celular relacionadas ao sistema nervoso central, são bem evidentes. Verificamos também se esses genes estariam relacionados a doenças. Na **Figura 13** e **Figura 14** apresentamos às doenças para as quais os genes específicos de resposta ao estresse de cada sexo apresentaram enriquecimento, agrupados por afinidade. É interessante notar que para ambos os sexos observamos enriquecimento de Doenças Não Transmissíveis (DNTs), que apresentam viés sexual.

Figura 13 – Doenças relacionadas aos genes de resposta ao estresse do sexo Feminino

Legenda: No eixo X observamos o *enrichment ratio* (logaritmo na base 2), e no eixo Y o FDR (logaritmo na base 10).

Figura 14 – Doenças relacionadas aos genes de resposta ao estresse do sexo Masculino.

Legenda: No eixo X observamos o *enrichment ratio* (logaritmo na base 2), e no eixo Y o FDR (logaritmo na base 10).

O cérebro dos mamíferos é composto principalmente por lipídios (60% em peso), constituídos por um perfil único de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFAs), e que não podem ser sintetizados endogenamente. As vitaminas lipossolúveis A, D, E e K também desempenham papéis-chave no padrão e diferenciação neural, sinalização celular, sinalização de fator de crescimento, dinâmica populacional neuronal e glial, e biossíntese de esfingolipídeos nas membranas celulares do cérebro, e estas vitaminas requerem a presença de ácidos graxos (gorduras) na alimentação para sua absorção. Assim, a ingestão materna adequada de gordura durante a gravidez é fundamental para apoiar o desenvolvimento neurológico normal do feto. O DHA (ácido docosa-hexanóico; n3 LC-PUFA), é o ácido graxo de maior concentração no cérebro fetal e neonatal, e a diminuição desse ácido graxo é observada no cérebro em desenvolvimento de animais que possuem uma dieta deficiente de n3 LC-PUFAs, e que vem acompanhada de alterações no metabolismo de neurotransmissores e atividades enzimáticas de receptores associadas à membrana.

Esse grupo de ácidos graxos (PUFAs) receberam atenção especial devido à seus múltiplos papéis na função cerebral, incluindo modificação da fluidez da membrana, atividade enzimática da membrana, número e afinidade de receptores, função de canais iônicos da membrana neuronal e produção de neurotransmissores e peptídeos iônicos. Em particular, o ômega-3 DHA é responsável pela alta concentração de fosfolipídios das células neurais, e sua incorporação no cérebro ocorre quase exclusivamente na vida pré-natal e pós-natal precoce. A proporção de DHA nas membranas de células cerebrais, modula a neurotransmissão e neuroinflamação, que são processos-chave na cognição e no humor. A quantidade e/ou qualidade de gordura na dieta pré-natal, interage com a exposição ao estresse pré-natal ou perinatal, para exercer efeitos protetores no desenvolvimento cerebral da prole. Ao contrário do esperado, evidências de estudos em animais sugerem que uma dieta pré-natal com dieta hiperlipídica ou suplementada com gordura, pode exercer um efeito protetor em vários aspectos do desenvolvimento cerebral da prole, e também de resposta afetiva pós-natal. Entretanto, ainda existem inconsistências de se o efeito benéfico da gordura na dieta, é aumentado ou diminuído pela presença de uma exposição pré-natal ao estresse.

Especificamente, (Huang et al., 2015) e (Rincel et al., 2016) observaram que a prole de ratos sob estresse no período pré-natal apresentaram melhores resultados no desenvolvimento cerebral quando foram alimentados com uma dieta rica em gorduras durante a gravidez, em comparação com uma dieta regular. (Borsonelo et al., 2011) relataram que dois tipos de suplementação com gorduras (uma rica em LC-PUFAs e outra rica em gordura saturada) exerceram efeitos mais favoráveis do que a dieta regular, melhorando os níveis de corticosterona na prole (somente no sexo masculino) quando submetidos a testes experimentais de estresse, mas apenas na prole não exposta ao estresse pré-natal.

Assim nossos resultados podem sugerir que alterações metabólicas placentárias principalmente relacionadas a lipídeos e seu metabolismo, podem estar relacionadas às diferentes respostas dos sexos ao estresse intraútero, e com consequências ao longo da vida incluindo alterações cerebrais.

4.2.3.3 Análise de genes do Imprintoma nos Módulos de resposta ao estresse na placenta

Verificamos inicialmente se algum dos módulos (ALPACA) de resposta ao estresse de cada sexo estavam enriquecidos para genes do imprintoma, e se genes do imprintoma estariam altamente ranqueados dentro desses módulos. Na **Tabela 7** podemos observar que os genes do imprintoma estão enriquecidos e bem ranqueados no módulo 2 feminino, e apenas enriquecido no módulo 3 e 5. Para os meninos observamos enriquecimento nos módulos 6 e 8, e altamente ranqueados no módulo 1 e 4.

Tabela 7 – Enriquecimento e ranqueamento dos genes do imprintoma nos módulos de resposta ao estresse de meninos e meninas.

msetfemaleimprintome					
perm.pval	overlap	sizemod	sizeoutlist	lists	padjust
1.00E-04	334	5507	923	module2_imprintome	1.00E-04
0.0198	107	1742	923	module3_imprintome	0.0198
rankingfemaleimprintome					
pval	overlap	sizemod	sizeoutlist	groups	padjust
0.0009	334	5569	923	module2_imprintome	0.01
0.017	48	1112	923	module5_imprintome	0.04
msetmaleimprintome					
perm.pval	overlap	sizemod	sizeoutlist	lists	padjust
1.00E-04	128	1840	923	module6_imprintome	1.00E-04
0.0412	13	149	923	module8_imprintome	0.0412
rankingmaleimprintome					
pval	overlap	sizemod	sizeoutlist	lists	padjust
2.18E-05	267	5534	923	module1_imprintome	0.01
0.0249	154	3449	923	module4_imprintome	0.01

Legenda: Tabelas acima (rosa) apresentam os resultados de enriquecimento e ranqueamento respectivamente, para genes do imprintoma nos módulos de Meninas. Tabelas abaixo (azul) apresentam os resultados de enriquecimento e ranqueamento respectivamente, para genes do imprintoma nos módulos de Meninos.

Os resultados apresentados nos sugerem que meninos e meninas apresentam redes de regulação placentária de resposta ao estresse diferentes quantitativa e qualitativamente. O dimorfismo sexual é parte importante dessas diferenças de regulação ao estresse e provavelmente é a base para diferenças de prevalência em transtornos do neurodesenvolvimento.

4.3 Regulação no início de diferenciação do trofoblasto

Com base na baixa eficiência dos modelos iPS (descritos até o momento) em gerar células diferenciadas em trofoblasto, um dos objetivos atrelados ao nosso estudo, foi o de estabelecer um modelo de iPS humano para diferenciação em células primitivas do trofoblasto, utilizando uma metodologia (TS) recentemente descrita para células-tronco embrionárias. O modelo de iPS proposto em nosso estudo foi também comparado com modelos de iPS anteriormente publicados, e com dados publicados de células placentárias ex-vivo. Por fim, inferimos redes de regulação gênica a partir do transcriptoma das células geradas por nosso modelo, com o intuito de compreender os processos regulatórios que devem guiar a trajetória inicial de desenvolvimento da placenta. Todos os experimentos de bancada realizados na construção do modelo de iPS foram realizados pelos alunos Veronica Euclides e Ethan Tietze, enquanto o presente aluno desenvolveu os pipelines de análise para todos os dados gerados no estudo. O escopo deste capítulo se limita a apresentar e discutir os resultados relacionados ao perfil de transcrição e regulação da expressão gênica, inferido à partir das células diferenciadas em trofoblasto obtidas no presente estudo. Uma breve apresentação dos resultados com relação à confiabilidade do nosso modelo também será realizada.

Para definir o perfil de expressão das células primitivas do trofoblasto geradas, realizamos o sequenciamento dos transcriptomas (single-cell RNA-seq) da população de células submetidas à diferenciação. O sequenciamento foi gerado no oitavo dia de diferenciação usando o método Drop-Seq (Macosko et al., 2015) , no qual permite analisar a expressão de mRNA de milhares de células individualmente. Nesse método, cada célula é encapsulada separadamente em

uma gotícula (escala em nanolitros) de microfluido, que também abriga uma *bead* (microesfera). Cada bead possui milhões de *primers* (sequência de nucleotídeos) anexados a ela, e cada primer (20 pb) possui uma sequência de nucleotídeos específica para identificar a célula (*cell-barcode* - 12 pb) adjacente à outra sequência específica para cada mRNA (UMI barcode - 8 pb). O *cell-barcode* será importante para que possamos reconhecer e separar os transcritos de cada célula, e o UMI barcode será usado para contarmos o número de moléculas mRNA de cada gene. Após o encapsulamento, a célula sofre o processo de lise, e suas moléculas de mRNA são hibridizadas (pela cauda poli A) aos primers anexados a *bead*. Subsequentemente as gotículas são quebradas, todos os mRNAs passam pela transcrição reversa e amplificação por PCR. A etapa de sequenciamento é realizada usando *paired-end reads*, onde a primeira *read* (20 pb) do par reflete o *primer* associado à bead (*cell-barcode* + UMI barcode), e a segunda *read* apresenta a sequência do mRNA que será alinhada ao genoma.

O sequenciamento (Illumina HiSeq 3000) gerou ~ 154 milhões de sequências englobando ~ 18 mil células. Após o pré-processamento dos dados, células com menos de 1000 genes detectados e com porcentagem de RNA mitocondrial superior a 20% foram descartadas, resultando em 587 células que foram utilizadas nas análises posteriores. A porcentagem média RNA mitocondrial nas células aproveitadas foi de 7.9% indicando boa viabilidade, e o número de genes detectados variou entre 1001 e 9296. Seguindo o modelo proposto em (Hafemeister and Satija, 2019), realizamos os passos de normalização e estabilização da variância na matriz de *counts*, com o objetivo de mitigar os artefatos técnicos comumente observados em dados de scRNA-seq.

Para identificar grupos de células transcricionalmente semelhantes, realizamos uma análise de agrupamento baseada no algoritmo dos k-vizinhos mais próximos, usando os 30 primeiros Componentes Principais e distância euclidiana. Assim como o observado visualmente em laboratório, a população foi dividida em dois grupos de células.

Em seguida, procuramos indícios de diferenciação para os dois grupos de células, a partir da expressão de marcadores canônicos de pluripotência e de trofotoderma. Observamos que o gene SOX2 - marcador de pluripotência altamente expresso em iPS - não apresentou expressão em ambos os grupos. Os genes KRT7 (citoqueratina 7), CGA (subunidade alfa da gonadotrofina coriônica humana), GATA3, e TFAP2C - marcadores de citotrofoblastos na placenta in vivo - apresentaram altos níveis de expressão, indicando inicialmente um possível programa de transcrição para trofotoderma.

Verificamos então a semelhança do perfil transcricional de nossas células com células ex vivo de placentas humanas provenientes de dois estudos recentemente publicados, que identificaram tipos celulares presentes na placenta e seus genes marcadores. Para tal, iniciamos identificando os genes preferencialmente expressos nos dois grupos de células, utilizando a ferramenta Cell-Specific Expression Analysis (index de especificidade (pSI); p-valor < 0,05). Em seguida testamos se os genes de cada grupo estavam enriquecidos para os marcadores de tipos celulares específicos (descritos nos estudos utilizados). Descobrimos que o perfil transcricional para os dois grupos foi altamente enriquecido para os tipos celulares sinciotrofoblasto (SCT) e citotrofoblasto viloso (VCT) ($p = \log_{10}32$ e $\log_{10}17$) (FIG). Embora ambos os grupos tenham apresentado perfil transcricional similar às células do trofoblasto, um dos grupos apresentou expressão e enriquecimento mais acentuado, e não apresentou enriquecimento para qualquer outro tipo de célula na interface fetal materna, sugerindo estar mais avançado na trajetória de diferenciação.

Em seguida, comparamos os perfis de expressão com o segundo conjunto de dados de placentas de 8 semanas e 24 semanas. Novamente, encontramos um forte enriquecimento para células citotrofoblasto ($p = \log_{10}9$). Para visualizar padrões de expressão específicos dos tipos celulares de placenta, plotamos heatmaps utilizando os principais marcadores descritos nos estudos, e consistente com a análise de enriquecimento, observamos elevados níveis de expressão para a maioria dos genes marcadores específicos de citotrofoblasto, sinciotrofoblasto,

e trofotoderma polar. Em resumo, as células especificadas no presente estudo apresentaram o perfil transcricional extremamente semelhante aos citotrofoblastos encontrados na placenta humana. Todos as análises descritas acima também foram realizados para células diferenciadas utilizando dois protocolos de iPS previamente descritos. Nenhum dos dois protocolos apresentou células com enriquecimento para tipos celulares específicos da placenta (citotrofoblasto e sincitiotrofoblasto).

Após encontrarmos evidências de confiabilidade do modelo, buscamos identificar genes envolvidos nos processos de regulação gênica em nossa população de células diferenciadas, com o intuito de inferir os genes que seriam importantes no início do desenvolvimento da placenta. Assim, construímos redes de regulação gênica utilizando novamente o PANDA. Uma rede foi criada para cada grupo, utilizando o perfil de expressão de 100 células em cada rede, e genes expressos em pelo menos 10% de células. Para identificar os fatores de transcrição centrais em cada rede, utilizamos a medida de centralidade *Betweenness*. Essa medida calcula o quanto um determinado nó (ou gene), está no caminho entre outros nós, contando o número de caminhos mais curtos (entre dois nós no gráfico) que passam por aquele determinado gene. Assim, os maiores valores de *Betweenness* indicariam os genes que seriam fundamentais para a manutenção da topologia da rede. Os principais reguladores previamente identificados da especificação peri-implantacional TCF12, ARID3A, ETS2 e SMAD1 estiveram entre os top genes de ambos os grupos. Isso é consistente com uma análise de tecidos específicos, do GTEX, que constatou que os genes centrais geralmente não são específicos de tecido, mas seus **genes alvo** mudam em diferentes contextos de tecido. Encontramos os genes *TFAP2A*, *ESRRG*, *PPARG*, *ZBTB7C* como os top genes centrais no grupo de células mais maduras. *TFAP2A* é um fator de transcrição crucial para a supressão da pluripotência e expressão de genes associados aos trofoblastos durante diferenciação com BMP4 (Krendl et al., 2017), o que sugere que o *TFAP2A* não deve estar participando especificamente da especificação com a ausência de BMP4. O *ZBTB7C* é um

regulador transcricional importante das metaloproteinases, e essas proteínas são cruciais para a invasão de trofoblastos na parede uterina. Portanto, a identificação de um fator de transcrição central específico que regula as metaloproteinases apóia ainda mais a autenticidade das células derivadas de iPS, em comparação com a placenta in vivo. Em resumo, descobrimos que a maioria dos genes centrais foi compartilhado para ambos os grupos e a rede de metaloproteinases regulada por ZBTB7C possivelmente está vinculada a complicações gestacionais, como pré-eclâmpsia.

4.0 CONCLUSÃO

Podemos concluir que tipos de exposição tóxica gestacional apresentam tanto conjuntos de genes diferencialmente expressos próprios como processos biológicos, entretanto o imprintoma está presente em todos eles. Além disso, genes do imprintoma participam de módulos de co expressão presentes em toda a gestação e dentro destes módulos estão enriquecidos como hubs.

O estresse durante a gestação leva a diferenças quantitativas e qualitativas nas redes de expressão gênica placentária em meninos e meninas. Em meninos, o ambiente estressor faz com que fatores de transcrição moduladores da diferença de perfis de resposta tenha um impacto maior do que em meninas. Também observamos que genes associados ao dimorfismo sexual também contribuem para as diferentes respostas ao estresse entre sexos.

Um possível papel do metabolismo de lipídeos - diferente entre os sexos - na resposta ao estresse, pode estar relacionado não só a desfechos de nascimento como também diferenças de prevalência em transtornos do neurodesenvolvimento.

5.0 TRABALHOS DESENVOLVIDOS PELO ALUNO

O presente aluno participou ao longo de seu doutorado, no desenvolvimento direto e também em colaboração, de diversos estudos. Abaixo estão relacionados os estudos já publicados ou submetidos para publicação.

Andre Rocha Barbosa¹; Ethan Tietze¹; Veronica Euclydes¹; Hyeon Jin Cho; Yong Kyu Lee; Arthur Feltrin; Joyce van de Leemput; Pasquale Di Carlo; Tomoyo Sawada; Kynon J Benjamin; Helena Brentani; Joel E Kleinman; Thomas M Hyde; Daniel R Weinberger; Gianluca Ursini; Apua C.M. Paquola; Joo Heon Shin; Jennifer Ann Erwin, Ph.D. **Single-cell analysis of human trophoblast stem cell specification reveals activation of fetal cytotrophoblast expression programs including coronavirus associated host factors and human endogenous retroviruses.** Under review in Cell Stem Cell.

¹Shared first authorship

Kynon JM Benjamin, Arthur S Feltrin, **André Rocha Barbosa**, Andrew E Jaffe, Joo Heon Shin, the BrainSeq Consortium, Amy Deep-Soboslay, Thomas M Hyde, Joel E Kleinman, Jennifer A Erwin, Daniel R Weinberger, Apuã CM Paquola. **Comprehensive analysis of genetic and transcriptional landscape in the caudate nucleus implicates decreased control of presynaptic dopamine release as a genetic mechanism of schizophrenia risk.** Under review in Science.

Tahira, Ana Carolina ; **Barbosa, André Rocha** ; Feltrin, Arthur Sant'anna ; Gastaldi, Vinicius Daguano ; Toledo, Victor Hugo Calegari ; Carvalho Pereira, José Geraldo ; Lisboa, Bianca Cristina Garcia ; Souza Reis, Viviane Neri ; Santos, Ana Cecília Feio ; Maschietto, Mariana ; Brentani, Helena . **Putative contributions of the sex chromosome proteins SOX3 and SRY to neurodevelopmental disorders.** American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics, v. 177, p. ajmg.b.32704, 2018.

Tahira AC a,* , Marques F b,c,* , Lisboa, BCG a , Feltrin, AS a,d , **Barbosa, AR** a,e , de Oliveira, KC a , de Bragança Pereira, CA f , Leite RE g , Grinberg LT g , Suemoto CK, de Lucena Ferretti-Rebustini RE g , Pasqualucci CA g , Jacob-Filho W, Brentani H , Palha JA. **Are the 50's, the transition decade in choroid plexus aging?** Under review in Neuropsychopharmacology

Lisboa, Bianca C. G. ; Oliveira, Katia C. ; Tahira, Ana Carolina ; **Barbosa, André Rocha** ; Feltrin, Arthur Sant'Anna ; Gouveia, Gisele ; Lima, Luzia ; Feio Dos Santos, Ana Cecília ; Martins, David Correa ; Puga, Renato David ; Moretto, Ariane Cristine ; De Bragança Pereira, Carlos Alberto ; Lafer, Beny ; Leite, Renata Elaine Paraizo ; Ferretti-Rebustini, Renata Eloah De Lucena ; Farfel, Jose Marcelo ; Grinberg, Lea Tenenholz ; Jacob-Filho, Wilson ; Miguel, Euripedes Constantino ; Hoexter, Marcelo Queiroz ; Brentani, Helena . **Initial findings of striatum tripartite model in OCD brain samples based on transcriptome analysis.** Scientific Reports v. 9, p. 3086, 2019.

Euclides, Verônica Luiza ; **Barbosa, André** ; Bastos, Laura ; Brentani, Alexandra ; Fink, Gunter ; Camilo, Caroline ; Machietto, Mariana ; Brentani, Helena . **Prenatal Stress And Epigenetic Profile In Neonates**. European Neuropsychopharmacology, v. 29, p. S918-S919, **2019**.

Ana Carolina Tahira, Victor Hugo Calegari de Toledo, **André Rocha Barbosa**, Arthur Sant'anna Feltrin, Verônica Luiza Vale Euclides Colovati, Mariana Maschietto and Helena Brentani. **Linking SOX3, SRY and disorders of neurodevelopment**. *In: The Neuroscience of Development* ed. Elsevier. Book Under Production

6.0 REFERÊNCIAS

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick MAK, Polymeropoulos MH, Xiao H, et al. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science* (80-) 1991;252:1651–6. <https://doi.org/10.1126/science.2047873>.

Allen JS, Damasio H, Grabowski TJ, Bruss J, Zhang W. Sexual dimorphism and asymmetries in the gray-white composition of the human cerebrum. *Neuroimage* 2003;18:880–94. [https://doi.org/10.1016/S1053-8119\(03\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S1053-8119(03)00034-X).

Amin N, Tan X, Ren Q, Zhu N, Botchway BOA, Hu Z, et al. Recent advances of induced pluripotent stem cells application in neurodegenerative diseases. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 2019;95:109674. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109674>.

Aplin JD, Myers JE, Timms K, Westwood M. Tracking placental development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2020;1–16. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0372-6>.

Apostolidou S, Abu-Amero S, O'Donoghue K, Frost J, Olafsdottir O, Chavele KM, et al. Elevated placental expression of the imprinted PHLDA2 gene is associated with low birth weight. *J Mol Med* 2007;85:379–87. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0131-8>.

Appiah Adu-Gyamfi E, Wang Y-X, Ding Y-B. The interplay between thyroid hormones and the placenta: a comprehensive review †. *Biol Reprod* 2020;2020:8–17. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz182>.

Atladóttir HÓ, Thorsen P, Østergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2010;40:1423–30. <https://doi.org/10.1007/s10803-010-1006-y>.

Aysondu MH, Ozyurek S. Influences of Maternal Undernutrition on Placental Development and Birth Weight in Sheep. vol. 26. 2020.

Baio J. Prevalence of autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008. *Morb Mortal Wkly Rep* 2012;61:1–19. <https://doi.org/ss6103a1> [pii].

Bale TL. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci* 2015;16:332–44. <https://doi.org/10.1038/nrn3818>.

Bale TL. Sex differences in prenatal epigenetic programming of stress pathways. *Stress* 2011;14:348–56. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.586447>.

Bale TL, Baram TZ, Brown AS, Goldstein JM, Insel TR, McCarthy MM, et al. Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry* 2010;68:314–9.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.028>.

Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.*, vol. 261, John Wiley & Sons, Ltd; 2007, p. 412–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x>.

Barker DJP, Forsén T, Uutela A, Osmond C, Eriksson JG. Size at birth and resilience to effects of poor living conditions in adult life: Longitudinal study. *Br Med J* 2001;323:1273–6. <https://doi.org/10.1136/bmj.323.7324.1273>.

Barker DJP, Godfrey KM, Gluckman PD, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993;341:938–41. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91224-A](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91224-A).

Barker DJP, Lampl M, Roseboom T, Winder N. Resource allocation in utero and health in later life. *Placenta* 2012;33:e30–4. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.06.009>.

Barker DJP, Osmond C. INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. *Lancet* 1986;327:1077–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91340-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91340-1).

Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2013;98:236–8. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>.

Van den Bergh BRH, van den Heuvel MI, Lahti M, Braeken M, de Rooij SR, Entringer S, et al. Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neurosci Biobehav Rev* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.07.003>.

Bergman K, Sarcar P, Glover V, O'Connor TG. Maternal Prenatal Cortisol and Infant Cognitive Development: Moderation by Infant-Mother Attachment. *Biol Psychiatry* 2010;67:1026–32. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.01.002>.Maternal.

Bernardo AS, Faial T, Gardner L, Niakan KK, Ortmann D, Senner CE, et al. BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages. *Cell Stem Cell* 2011;9:144–55. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.06.015>.

Bilbo SD. How cytokines leave their mark: The role of the placenta in developmental programming of brain and behavior. *Brain Behav Immun* 2011;25:602–3. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.01.018>.

Blakeley P, Fogarty NME, Del Valle I, Wamaitha SE, Hu TX, Elder K, et al. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Dev* 2015;142:3151–65. <https://doi.org/10.1242/dev.123547>.

Blakeley PM, Capron LE, Jensen AB, O'Donnell KJ, Glover V. Maternal prenatal symptoms of depression and down regulation of placental monoamine oxidase A

expression. *J Psychosom Res* 2013;75:341–5.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2013.07.002>.

Bonnin A, Goeden N, Chen K, Wilson ML, King J, Shih C, et al. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* 2011;472:347–50.
<https://doi.org/10.1038/nature09972.A>.

Borsonelo EC, Suchecki D, Calil HM, Galduróz JCF. Supplementation with fish oil and coconut fat prevents prenatal stress-induced changes in early postnatal development. *Int J Dev Neurosci* 2011;29:521–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.04.003>.

Broad KD, Curley JP, Keverne EB. Increased apoptosis during neonatal brain development underlies the adult behavioral deficits seen in mice lacking a functional paternally expressed gene 3 (Peg3). *Dev Neurobiol* 2009;69:314–25.
<https://doi.org/10.1002/dneu.20702>.

Broad KD, Keverne EB. Placental protection of the fetal brain during short-term food deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:15237–41.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1106022108>.

Broad KD, Rocha-Ferreira E, Hristova M. Placental, Matrilineal, and Epigenetic Mechanisms Promoting Environmentally Adaptive Development of the Mammalian Brain. *Neural Plast* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6827135>.

Bronson SL, Bale TL. The Placenta as a Mediator of Stress Effects on Neurodevelopmental Reprogramming. *Neuropsychopharmacology* 2015:1–12.
<https://doi.org/10.1038/npp.2015.231>.

Brown AS, van Os J, Driessens C, Hoek HW, Susser ES. Further Evidence of Relation Between Prenatal Famine and Major Affective Disorder. *Am J Psychiatry* 2000;157:190–5.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.2.190>.

Brown AS, Susser ES, Lin SP, Neugebauer R, Gorman JM. Increased risk of affective disorders in males after second trimester prenatal exposure to the Dutch hunger winter of 1944-45. *Br J Psychiatry* 1995;166:601–6.

Bruchova H, Vasikova A, Merkerova M, Milcova A, Topinka J, Balascak I, et al. Effect of Maternal Tobacco Smoke Exposure on the Placental Transcriptome. *Placenta* 2010;31:186–91. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.016>.

Brunton PJ, Russell JA. Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: Sex-specific effects. *J Neuroendocrinol* 2010;22:258–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.01969.x>.

Buckberry S, Bianco-Miotto T, Bent SJ, Clifton V, Shoubridge C, Shankar K, et al. Placental transcriptome co-expression analysis reveals conserved regulatory programs across gestation. *BMC Genomics* 2017;18:10. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3384-9>.

Buss C, Davis EP, Muftuler LT, Head K, Sandman CA. High pregnancy anxiety during mid-gestation is associated with decreased gray matter density in 6-9-year-old children. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35:141–53. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.07.010>.

Buss C, Davis EP, Shahbaba B, Pruessner JC, Head K, Sandman CA. Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201295109>.

Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, Satija R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* 2018;36:411–20. <https://doi.org/10.1038/nbt.4096>.

Chen C-Y, Lopes-Ramos C, Kuijjer M, Paulson J, Sonawane A, Fagny M, et al. Sexual dimorphism in gene expression and regulatory networks across human tissues. *BioRxiv* 2016:082289. <https://doi.org/10.1101/082289>.

Chen Y, Wang K, Chandramouli GVR, Knott JG, Leach R. Trophoblast lineage cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;436:677–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.016>.

Cissé YM, Chan JC, Nugent BM, Banducci C, Bale TL. Brain and placental transcriptional responses as a readout of maternal and paternal preconception stress are fetal sex specific. *Placenta* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.06.019>.

Clark TA, Sugnet CW, Ares M. Genomewide analysis of mRNA processing in yeast using splicing-specific microarrays. *Science* (80-) 2002;296:907–10. <https://doi.org/10.1126/science.1069415>.

Coan PM, Fowden AL, Constancia M, Ferguson-Smith AC, Burton GJ, Sibley CP. Disproportional effects of Igf2 knockout on placental morphology and diffusional exchange characteristics in the mouse. *J Physiol* 2008;586:5023–32. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.157313>.

Colonna M. Innate Lymphoid Cells: Diversity, Plasticity, and Unique Functions in Immunity. *Immunity* 2018;48:1104–17. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.013>.

Cortez D, Marin R, Toledo-Flores D, Froidevaux L, Liechti A, Waters PD, et al. Origins and functional evolution of y chromosomes across mammals. *Nature* 2014;508:488–93. <https://doi.org/10.1038/nature13151>.

Cosgrove K, Mazure C, Staley J. Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biol Psychiatry* 2007;62:847–55. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.03.001>.Evolving.

Cowell W, Deyssenroth M, Chen J, Wright RJ. Maternal stress in relation to sex-specific

expression of placental genes involved in nutrient transport, oxygen tension, immune response, and the glucocorticoid barrier. *Placenta* 2020;96:19–26.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.05.004>.

Davis EP, Pfaff D. Sexually dimorphic responses to early adversity: Implications for affective problems and autism spectrum disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2014;49:11–25. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.06.014>.

de Deungria M, Rao R, Wobken JD, Luciana M, Nelson C a, Georgieff MK. Perinatal iron deficiency decreases cytochrome c oxidase (CytOx) activity in selected regions of neonatal rat brain. *Pediatr Res* 2000;48:169–76. <https://doi.org/10.1203/00006450-200008000-00009>.

Dewing P, Shi T, Horvath S, Vilain E. Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Mol Brain Res* 2003;118:82–90.

[https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(03\)00339-5](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(03)00339-5).

Deyssenroth MA, Peng S, Hao K, Lambertini L, Marsit CJ, Chen J. Whole-transcriptome analysis delineates the human placenta gene network and its associations with fetal growth. *BMC Genomics* 2017;18:520. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3878-0>.

DiPietro JA, Kivlighan KT, Costigan KA, Rubin SE, Shiffler DE, Henderson JL, et al. Prenatal antecedents of newborn neurological maturation. *Child Dev* 2010;81:115–30. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2009.01384.x>.

Drukker M, Tang C, Ardehali R, Rinkevich Y, Seita J, Lee AS, et al. Isolation of primitive endoderm, mesoderm, vascular endothelial and trophoblast progenitors from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2012;30:531–42. <https://doi.org/10.1038/nbt.2239>.

Edwards CA, Ferguson-Smith AC. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:281–9. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.04.013>.

Fang M, Xie H, Dougan SK, Ploegh H, van Oudenaarden A. Stochastic Cytokine Expression Induces Mixed T Helper Cell States. *PLoS Biol* 2013;11:1001618. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001618>.

Fass DM, Schroeder FA, Perlis RH, Haggarty SJ. Epigenetic mechanisms in mood disorders: Targeting neuroplasticity. *Neuroscience* 2014;264:112–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.041>.

Fatemi SH, Folsom TD, Reutiman TJ, Thuras PD. Expression of GABAB Receptors Is Altered in Brains of Subjects with Autism. *The Cerebellum* 2009;8:64–9. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0075-3>.

Feinerman O, Jentsch G, Tkach KE, Coward JW, Hathorn MM, Sneddon MW, et al. Single-cell quantification of IL-2 response by effector and regulatory T cells reveals critical plasticity in immune response. *Mol Syst Biol* 2010;6. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.90>.

- Fink G, Andrews KG, Brentani H, Grisi S, Ferrer APS, Brentani A. Overall and Sex-Specific Associations between Fetal Adversity and Child Development at Age 1 Year: Evidence from Brazil. *Am J Epidemiol* 2018;187:2324–31. <https://doi.org/10.1093/aje/kwy141>.
- Fortunato S, Barthélemy M. Resolution limit in community detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:36–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605965104>.
- Fowden a L, Ward JW, Wooding FPB, Forhead a J, Constancia M. Programming placental nutrient transport capacity. *J Physiol* 2006;572:5–15. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.104141>.
- Fowden AL, Coan PM, Angiolini E, Burton GJ, Constancia M. Imprinted genes and the epigenetic regulation of placental phenotype. *Prog Biophys Mol Biol* 2011;106:281–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.11.005>.
- Frank D, Fortino W, Clark L, Musalo R, Wang W, Saxena A, et al. Placental overgrowth in mice lacking the imprinted gene *Ipl*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7490–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220399999>.
- Fumagalli F, Molteni R, Racagni G, Riva MA. Stress during development: Impact on neuroplasticity and relevance to psychopathology. *Prog Neurobiol* 2007;81:197–217. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.01.002>.
- Gabory A, Ferry L, Fajardy I, Jouneau L, Gothié JD, Vigé A, et al. Maternal Diets Trigger Sex-Specific Divergent Trajectories of Gene Expression and Epigenetic Systems in Mouse Placenta. *PLoS One* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047986>.
- Gabory A, Roseboom TJ, Moore T, Moore LG, Junien C. Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. *Biol Sex Differ* 2013;4:5. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-4-5>.
- Galler JR, Bryce CP, Zichlin ML, Fitzmaurice G, Eaglesfield GD, Waber DP. Infant malnutrition is associated with persisting attention deficits in middle adulthood. *J Nutr* 2012;142:788–94. <https://doi.org/10.3945/jn.111.145441>.
- Gallou-Kabani C, Gabory A, Tost J, Karimi M, Mayeur S, Lesage J, et al. Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and dna methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS One* 2010;5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014398>.
- Gerardin P, Wendland J, Bodeau N, Galin A, Bialobos S, Tordjman S, et al. Depression during pregnancy: Is the developmental impact earlier in boys? A prospective case-control study. *J Clin Psychiatry* 2011;72:378–87. <https://doi.org/10.4088/JCP.09m05724blu>.
- Gerstein MB, Kundaje A, Hariharan M, Landt SG, Yan KK, Cheng C, et al. Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. *Nature* 2012;489:91–100. <https://doi.org/10.1038/nature11245>.

Gheorghe CP, Mohan S, Oberg KC, Longo LD. Gene expression patterns in the hypoxic murine placenta: a role in epigenesis? *Reprod Sci* 2007;14:223–33. <https://doi.org/10.1177/1933719107302860>.

Gilmore JH, Knickmeyer RC, Gao W. Imaging structural and functional brain development in early childhood. *Nat Rev Neurosci* 2018;19:123–37. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.1>.

Giovanoli S, Engler H, Engler A, Richetto J, Voget M, Willi R, et al. Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. *Science* (80-) 2013;339:1100–2. <https://doi.org/10.1126/science.1228261>.

Giudice Q Lo, Leleu M, Manno G La, Fabre PJ. Single-cell transcriptional logic of cell-fate specification and axon guidance in early-born retinal neurons. *Dev* 2019;146. <https://doi.org/10.1242/dev.178103>.

Glass K, Huttenhower C, Quackenbush J, Yuan G-C. Passing Messages between Biological Networks to Refine Predicted Interactions. *PLoS One* 2013;8:e64832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064832>.

Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of In Utero and Early Life Conditions on Adult Health and Disease. *N Engl J Med* 2008;359:61–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708473>.Effect.

Gluckman PD, Hanson MA, Mitchell MD. Developmental origins of health and disease: Reducing the burden of chronic disease in the next generation. *Genome Med* 2010;2. <https://doi.org/10.1186/gm135>.

Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG. Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends Ecol Evol* 2005;20:527–33. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.08.001>.

Goldman DC, Bailey AS, Pfaffle DL, Al Masri A, Christian JL, Fleming WH. BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 2009;114:4393–401. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206433>.

Goldstein JM, Holsen L, Huang G, Hammond BD, James-Todd T, Cherkerzian S, et al. Prenatal stress-immune programming of sex differences in comorbidity of depression and obesity/metabolic syndrome. *Dialogues Clin Neurosci* 2016;18:425–36.

Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016;17:333–51. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>.

Grayson BE, Himel AR, Lawson WJ, Spann RA. Altered hormone receptor expression in rat placenta following maternal vertical sleeve gastrectomy. *FASEB J* 2018;32:lb344–lb344. https://doi.org/10.1096/FASEBJ.2018.32.1_SUPPLEMENT.LB344.

Habermann AC, Gutierrez AJ, Bui LT, Yahn SL, Winters NI, Calvi CL, et al. Single-cell RNA sequencing reveals profibrotic roles of distinct epithelial and mesenchymal lineages

in pulmonary fibrosis. *Sci Adv* 2020;6:eaba1972. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1972>.

Hafemeister C, Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol* 2019;20:296. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1874-1>.

Hammond TR, Dufort C, Dissing-Olesen L, Giera S, Young A, Wysoker A, et al. Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity* 2019;50:253-271.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.004>.

Haram K, Mortensen JH, Myking O, Roald B, Magann EF, Morrison JC. Early development of the human placenta and pregnancy complications. *J Matern Neonatal Med* 2019;1–8. <https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1578745>.

Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav* 2011a;59:279–89. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.007>.

Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav* 2011b;59:279–89. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.007>.

Harville E, Xiong X, Buekens P. Disasters and perinatal health: A systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 2010;65:713–28. <https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e31820eddbb>.

Haycock PC, Ramsay M. Exposure of mouse embryos to ethanol during preimplantation development: effect on DNA methylation in the h19 imprinting control region. *Biol Reprod* 2009;81:618–27. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074682>.

He H, Kim J. Regulation and function of the *peg3* imprinted domain. *Genomics Inf* 2014;12:105–13. <https://doi.org/10.5808/gi.2014.12.3.105>.

Herbert MR, Ziegler DA, Deutsch CK, O'Brien LM, Lange N, Bakardjiev A, et al. Dissociations of cerebral cortex, subcortical and cerebral white matter volumes in autistic boys. *Brain* 2003;126:1182–92.

Hidden U, Glitzner E, Hartmann M, Desoye G. Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. *J. Anat.*, vol. 215, Wiley-Blackwell; 2009, p. 60–8. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.01035.x>.

Hockley JRF, Taylor TS, Callejo G, Wilbrey AL, Gutteridge A, Bach K, et al. Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron. *Gut* 2019;68:633–44. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315631>.

Horii M, Li Y, Wakeland AK, Pizzo DP, Nelson KK, Sabatini K, et al. Human pluripotent stem cells as a model of trophoblast differentiation in both normal development and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E3882–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604747113>.

Howerton CL, Morgan CP, Fischer DB, Bale TL. O-GlcNAc transferase (OGT) as a placental biomarker of maternal stress and reprogramming of CNS gene transcription in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:5169–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300065110>.

Hsiao EY, Patterson PH. Placental regulation of maternal-fetal interactions and brain development. *Dev Neurobiol* 2012;72:1317–26. <https://doi.org/10.1002/dneu.22045>.

Huang CF, Du JX, Deng W, Cheng XC, Zhang SY, Zhao SJ, et al. Effect of prenatal exposure to LPS combined with pre- and post-natal high-fat diet on hippocampus in rat offspring. *Neuroscience* 2015;286:364–70. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.002>.

Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med* 2018;50:96. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0071-8>.

Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:459–66. <https://doi.org/10.1038/nrn2632>.

Kalisch-Smith JI, Simmons DG, Dickinson H, Moritz KM. Review: Sexual dimorphism in the formation, function and adaptation of the placenta. *Placenta* 2017;54:10–6. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.008>.

Kang HJ, Kawasaki YI, Cheng F, Zhu Y, Xu X, Li M, et al. Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 2011a;478:483–9. <https://doi.org/10.1038/nature10523>.

Kang HJ, Kawasaki YI, Cheng F, Zhu Y, Xu X, Li M, et al. Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 2011b;478:483–9. <https://doi.org/10.1038/nature10523>.

Kapoor A, Matthews SG. Short periods of prenatal stress affect growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in male guinea pig offspring. *J Physiol* 2005;566:967–77. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.090191>.

Kenworthy CA, Sengupta A, Luz SM, Ver Hoeve ES, Meda K, Bhatnagar S, et al. Social defeat induces changes in histone acetylation and expression of histone modifying enzymes in the ventral hippocampus, prefrontal cortex, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 2014;264:88–98. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.024>.

Kerac M, Postels DG, Mallewa M, Alusine Jalloh A, Voskuil WP, Groce N, et al. The interaction of malnutrition and neurologic disability in Africa. *Semin Pediatr Neurol* 2014;21:42–9. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2014.01.003>.

Keverne EB. Genomic imprinting, action, and interaction of maternal and fetal genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:6834–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411253111>.

Keverne EB. Mammalian viviparity: a complex niche in the evolution of genomic imprinting. *Hered* 2014;113:138–44. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.8>.

Keverne EB. Importance of the matriline for genomic imprinting, brain development and behaviour. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013;368:20110327. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0327>.

Khalife N, Glover V, Hartikainen A-L, Taanila A, Ebeling H, Järvelin M-R, et al. Placental size is associated with mental health in children and adolescents. *PLoS One* 2012;7:e40534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040534>.

Khundrakpam BS, Lewis JD, Zhao L, Chouinard-Decorte F, Evans AC. Brain connectivity in normally developing children and adolescents. *Neuroimage* 2016;134:192–203. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.03.062>.

Kim J, Frey WD, He H, Kim H, Ekram MB, Bakshi A, et al. Peg3 Mutational Effects on Reproduction and Placenta-Specific Gene Families. *PLoS One* 2013;8:e83359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083359>.

Kinsella MT, Monk C. Impact of maternal stress, depression and anxiety on fetal neurobehavioral development. *Clin Obstet Gynecol* 2009;52:425–40. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e3181b52df1>.

Kojima J, Fukuda A, Taira H, Kawasaki T, Ito H, Kuji N, et al. Efficient production of trophoblast lineage cells from human induced pluripotent stem cells. *Lab Invest* 2017;97:1188–200. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.159>.

Kopsida E, Stergiakouli E, Lynn PM, Wilkinson LS, Davies W. The Role of the Y Chromosome in Brain Function. *Open Neuroendocrinol J* 2009;2:20–30. <https://doi.org/10.2174/1876528900902010020>.

Kouichi I, Kenichi M, Kousaku O. Identification of an active gene by using large-scale cDNA sequencing. *Gene* 1994;140:295–6. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90563-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90563-0).

Krakowiak P, Walker CK, Bremer AA, Baker AS, Ozonoff S, Hansen RL, et al. Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediatrics* 2012;129:e1121-8. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-2583>.

Kumari S, Colin-York H, Irvine DJ, Fritzsche M. Not All T Cell Synapses Are Built the Same Way. *Trends Immunol* 2019;40:977–80. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.09.009>.

Kuwajima T, Nishimura I, Yoshikawa K. Necdin Promotes GABAergic Neuron Differentiation in Cooperation with Dlx Homeodomain Proteins. *J Neurosci* 2006;26:5383–92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1262-06.2006>.

Laloux C, Mairesse J, Van Camp G, Giovine A, Branchi I, Bouret S, et al. Anxiety-like behaviour and associated neurochemical and endocrinological alterations in male pups exposed to prenatal stress. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37:1646–58. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.02.010>.

Lane RH, Ramirez RJ, Tsirka AE, Kloesz JL, McLaughlin MK, Gruetzmacher EM, et al.

Uteroplacental insufficiency lowers the threshold towards hypoxia-induced cerebral apoptosis in growth-retarded fetal rats. *Brain Res* 2001;895:186–93. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02074-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02074-1).

Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract* 2010;19:87–98. <https://doi.org/10.1159/000273066>.

Laplante DP, Brunet A, Schmitz N, Ciampi A, King S. Project Ice Storm: prenatal maternal stress affects cognitive and linguistic functioning in 5 1/2-year-old children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2008;47:1063–72. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e31817eec80>.

Larkin J, Sadovsky Y. GEO accession GSE46381. Eff NDRG1 Deletion Hypoxia Mouse Placenta 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE46381>.

Lefebvre L, Viville S, Barton SC, Ishino F, Keverne EB, Surani M a. Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest. *Nat Genet* 1998;20:163–9. <https://doi.org/10.1038/2464>.

Lewis RM, Cleal JK, Hanson MA. Review: Placenta, evolution and lifelong health. *Placenta* 2012;33:S28–32. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.12.003>.

Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH, et al. Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis. *Cell* 2008;133:523–36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.029>.

Liu Y, Fan X, Wang R, Lu X, Dang YL, Wang Huiying, et al. Single-cell RNA-seq reveals the diversity of trophoblast subtypes and patterns of differentiation in the human placenta. *Cell Res* 2018;28:819–32. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0066-y>.

Longtine MSL, Michael ND. Placental Dysfunction and Fetal Programming: The importance of Placental Size, Shape, Histopathology, and Molecular Composition. *Semin Reprod* 2011;29:187–96. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1275515>.Placental.

Lopes-Ramos CM, Chen CY, Kuijjer ML, Paulson JN, Sonawane AR, Fagny M, et al. Sex Differences in Gene Expression and Regulatory Networks across 29 Human Tissues. *Cell Rep* 2020;31:107795. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107795>.

Luecken MD, Theis FJ. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol Syst Biol* 2019;15. <https://doi.org/10.15252/msb.20188746>.

Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* 2015;161:1202–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.002>.

Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, Li H, Fernandes S, Quang D, et al. An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol* 2018;36:432–41. <https://doi.org/10.1038/nbt.4127>.

Mao J, Jain A, Denslow ND, Nouri MZ, Chen S, Wang T, et al. Bisphenol A and bisphenol S disruptions of the mouse placenta and potential effects on the placenta-brain axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117:4642–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919563117>.

Mao J, Zhang X, Sieli PT, Falduto MT, Torres KE, Rosenfeld CS. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:5557–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000440107>.

Marrocco J, Mairesse J, Ngomba RT, Silletti V, Van Camp G, Bouwalerh H, et al. Anxiety-like behavior of prenatally stressed rats is associated with a selective reduction of glutamate release in the ventral hippocampus. *J Neurosci* 2012;32:17143–54. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1040-12.2012>.

Maschietto M, Bastos LC, Tahira AC, Bastos EP, Euclides VLV, Brentani A, et al. Sex differences in DNA methylation of the cord blood are related to sex-bias psychiatric diseases. *Sci Rep* 2017;7:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep44547>.

McKay JA, Xie L, Adriaens M, Evelo CT, Ford D, Mathers JC. Organ-specific gene expression changes in the fetal liver and placenta in response to maternal folate depletion. *Nutrients* 2016;8. <https://doi.org/10.3390/nu8100661>.

McMinn J, Wei M, Schupf N, Cusmai J, Johnson EB, Smith AC, et al. Unbalanced Placental Expression of Imprinted Genes in Human Intrauterine Growth Restriction. *Placenta* 2006;27:540–9. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.07.004>.

McNamara GI, Isles AR. Dosage-sensitivity of imprinted genes expressed in the brain: 15q11-q13 and neuropsychiatric illness. *Biochem Soc Trans* 2013;41:721–6. <https://doi.org/10.1042/bst20130008>.

Moog NK, Entringer S, Rasmussen JM, Styner M, Gilmore JH, Kathmann N, et al. Intergenerational Effect of Maternal Exposure to Childhood Maltreatment on Newborn Brain Anatomy. *Biol Psychiatry* 2018;83:120–7. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.07.009>.

Moore SE. Early life nutritional programming of health and disease in the Gambia. *J Dev Orig Health Dis* 2015;7:123–31. <https://doi.org/10.1017/S2040174415007199>.

Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 2008;5:621–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1226>.

Mueller BR, Bale TL. Sex-Specific Programming of Offspring Emotionality Following Stress Early in Pregnancy. *J Neurosci* 2008;28:9055–65. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1424-08.2008>.Sex-Specific.

Murphy SK, Huang Z, Hoyo C. Differentially methylated regions of imprinted genes in prenatal, perinatal and postnatal human tissues. *PLoS One* 2012;7.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040924>.

Muscatelli F, Abrous DN, Massacrier A, Boccacio I, Moal M Le, Cau P, et al. Disruption of the mouse *Necdin* gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome 2000;9:3101–10.

Napso T, Yong HEJ, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN. The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. *Front Physiol* 2018;9:1091. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01091>.

O'Donnell K, O'Connor TG, Glover V. Prenatal stress and neurodevelopment of the child: Focus on the HPA axis and role of the placenta. *Dev Neurosci* 2009;31:285–92. <https://doi.org/10.1159/000216539>.

O'Donnell KJ, Bugge Jensen A, Freeman L, Khalife N, O'Connor TG, Glover V. Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11 β -HSD2. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37:818–26. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.014>.

Okae H, Toh H, Sato T, Hiura H, Takahashi S, Shirane K, et al. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2018;22:50-63.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.11.004>.

Okoniewski MJ, Miller CJ. Hybridization interactions between probesets in short oligo microarrays lead to spurious correlations. *BMC Bioinformatics* 2006;7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-276>.

Ono R, Nakamura K, Inoue K, Naruse M, Usami T, Wakisaka-Saito N, et al. Deletion of *Peg10*, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet* 2006;38:101–6. <https://doi.org/10.1038/ng1699>.

Osmond C, Barker DJP, Winter PD, Fall CHD, Simmonds SJ. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *Br Med J* 1993;307:1519–24. <https://doi.org/10.1136/bmj.307.6918.1519>.

Padi M, Quackenbush J. Detecting phenotype-driven transitions in regulatory network structure. *Npj Syst Biol Appl* 2018;4:16. <https://doi.org/10.1038/s41540-018-0052-5>.

Papalexi E, Satija R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2018;18:35–45. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.76>.

Petropoulos S, Edsgård D, Reinius B, Deng Q, Panula SP, Codeluppi S, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell* 2016;165:1012–26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.023>.

Pinares-Garcia P, Stratikopoulos M, Zagato A, Loke H, Lee J. Sex: A Significant Risk Factor for Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Brain Sci* 2018;8:154. <https://doi.org/10.3390/brainsci8080154>.

Plasschaert RN, Bartolomei MS. Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells. *Development* 2014;141:1805–13. <https://doi.org/10.1242/dev.101428>.

Poelmans G, Pauls DLD, Buitelaar JK, Franke B. Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. *Am J ...* 2011;168:365–77. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10070948>.

Ponder KL, Salisbury A, McGonnigal B, Laliberte A, Lester B, Padbury JF. Maternal depression and anxiety are associated with altered gene expression in the human placenta without modification by antidepressant use: Implications for fetal programming. *Dev Psychobiol* 2011;53:711–23. <https://doi.org/10.1002/dev.20549>.

Prieto-Vila M, Usuba W, Takahashi RU, Shimomura I, Sasaki H, Ochiya T, et al. Single-cell analysis reveals a preexisting drug-resistant subpopulation in the luminal breast cancer subtype. *Cancer Res* 2019;79:4412–25. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0122>.

Printzlau F, Wolstencroft J, Skuse DH. Cognitive, behavioral, and neural consequences of sex chromosome aneuploidy. *J Neurosci Res* 2017;95:311–9. <https://doi.org/10.1002/jnr.23951>.

Qi F, Qian S, Zhang S, Zhang Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;526:135–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.044>.

Raj A, Van Oudenaarden A. Single-molecule approaches to stochastic gene expression. *Annu Rev Biophys* 2009;38:255–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125928>.

Ratnu VS, Emami MR, Bredy TW. Genetic and epigenetic factors underlying sex differences in the regulation of gene expression in the brain. *J Neurosci Res* 2017;95:301–10. <https://doi.org/10.1002/jnr.23886>.

Reid M V., Murray KA, Marsh ED, Golden JA, Simmons RA, Grinspan JB. Delayed myelination in an intrauterine growth retardation model is mediated by oxidative stress upregulating bone morphogenetic protein 4. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012;71:640–53. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825cfa81>.

Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001;2:21–32. <https://doi.org/10.1038/35047554>.

Riccio O, Potter G, Walzer C, Vallet P, Szabó G, Vutskits L, et al. Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. *Mol Psychiatry* 2009;14:280–90. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.89>.

Richetto J, Riva MA. Prenatal maternal factors in the development of cognitive

impairments in the offspring. *J Reprod Immunol* 2014;104–105:20–5.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.03.005>.

Rincel M, Lépinay AL, Delage P, Fioramonti J, Théodorou VS, Layé S, et al. Maternal high-fat diet prevents developmental programming by early-life stress. *Transl Psychiatry* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.235>.

Roh CR, Budhreja V, Kim HS, Nelson DM, Sadovsky Y. Microarray-based identification of differentially expressed genes in hypoxic term human trophoblasts and in placental villi of pregnancies with growth restricted fetuses. *Placenta* 2005;26:319–28.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.06.013>.

de Rooij SR, Wouters H, Yonker JE, Painter RC, Roseboom TJ. Prenatal undernutrition and cognitive function in late adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:16881–6.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1009459107>.

Rosales Nieto CA, Mantey A, Makela B, Byrem T, Ehrhardt R, Veiga-Lopez A. Shearing during late pregnancy increases size at birth but does not alter placental endocrine responses in sheep. *Animal* 2020;14:799–806.
<https://doi.org/10.1017/S1751731119002696>.

Rosenfeld CS. The placenta-brain-axis. *J Neurosci Res* 2020.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24603>.

Rossant J. Genetic control of early cell lineages in the mammalian embryo. *Annu Rev Genet* 2018;52:185–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024544>.

Royce TE, Rozowsky JS, Gerstein MB. Toward a universal microarray: Prediction of gene expression through nearest-neighbor probe sequence identification. *Nucleic Acids Res* 2007;35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm549>.

Rutherford JN. Fetal signaling through placental structure and endocrine function: Illustrations and implications from a nonhuman primate model. *Am. J. Hum. Biol.*, vol. 21, NIH Public Access; 2009, p. 745–53. <https://doi.org/10.1002/ajhb.20923>.

Salafia CM, Shah RG, Misra DP, Straughen JK, Roberts DJ, Troxler L, et al. Chorionic vascular “fit” in the human placenta: Relationship to fetoplacental outcomes. *Placenta* 2017;59:13–8. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.08.008>.

Sandhu KS. Systems properties of proteins encoded by imprinted genes. *Epigenetics* 2010;5:627–36. <https://doi.org/10.4161/epi.5.7.12883>.

Sandovici I, Hoelle K, Angiolini E, Constância M. Placental adaptations to the maternal-fetal environment: Implications for fetal growth and developmental programming. *Reprod Biomed Online* 2012;25:68–89. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.03.017>.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* (80-) 1995;270:467–70.

<https://doi.org/10.1126/science.270.5235.467>.

Schlauch D, Paulson JN, Young A, Glass K, Quackenbush J. Estimating gene regulatory networks with pandaR. *Bioinformatics*, vol. 33, Oxford University Press; 2017, p. 2232–4. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx139>.

Schroeder DI, Blair JD, Lott P, Yu HOK, Hong D, Crary F, et al. The human placenta methylome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:6037–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215145110>.

Seckl JR, Meaney MJ. Glucocorticoid “programming” and PTSD risk. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1071:351–78. <https://doi.org/10.1196/annals.1364.027>.

Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K, Ono R, Kagami M, Wakisaka N, et al. Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nat Genet* 2008;40:243–8. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.51>.

Shi L, Zhang Z, Su B. Sex Biased Gene Expression Profiling of Human Brains at Major Developmental Stages. *Sci Rep* 2016;6:21181. <https://doi.org/10.1038/srep21181>.

Shiraki T, Kondo S, Katayama S, Waki K, Kasukawa T, Kawaji H, et al. Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15776–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136655100>.

Skaar DA, Li Y, Bernal AJ, Hoyo C, Murphy SK, Jirtle RL. The human imprintome: regulatory mechanisms, methods of ascertainment, and roles in disease susceptibility. *Ilar J* 2012;53:341–58. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.3-4.341>.

Slack MD, Martinez ED, Wu LF, Altschuler SJ. Characterizing heterogeneous cellular responses to perturbations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19306–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807038105>.

Solé-Boldo L, Raddatz G, Schütz S, Mallm JP, Rippe K, Lonsdorf AS, et al. Single-cell transcriptomes of the human skin reveal age-related loss of fibroblast priming. *Commun Biol* 2020;3:1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0922-4>.

Sonawane AR, Platig J, Fagny M, Chen CY, Paulson JN, Lopes-Ramos CM, et al. Understanding Tissue-Specific Gene Regulation. *Cell Rep* 2017;21:1077–88. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.001>.

Sood R, Zehnder JL, Druzin ML, Brown PO. Gene expression patterns in human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5478–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508035103>.

Stévant I, Kühne F, Greenfield A, Chaboissier MC, Dermitzakis ET, Nef S. Dissecting Cell Lineage Specification and Sex Fate Determination in Gonadal Somatic Cells Using Single-Cell Transcriptomics. *Cell Rep* 2019;26:3272–3283.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.069>.

Stirparo GG, Boroviak T, Guo G, Nichols J, Smith A, Bertone P. Integrated analysis of single-cell embryo data yields a unified transcriptome signature for the human pre-implantation epiblast. *Dev* 2018;145. <https://doi.org/10.1242/dev.158501>.

Stuart T, Satija R. Integrative single-cell analysis. *Nat Rev Genet* 2019;20:257–72. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0093-7>.

Sturm G, Finotello F, Petitprez F, Zhang JD, Baumbach J, Fridman WH, et al. Comprehensive evaluation of transcriptome-based cell-type quantification methods for immuno-oncology. *Bioinformatics*, vol. 35, Oxford University Press; 2019, p. i436–45. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz363>.

Tahira AC, Barbosa AR, Feltrin ASA, Gastaldi VD, de Toledo VHC, de Carvalho Pereira JG, et al. Putative contributions of the sex chromosome proteins SOX3 and SRY to neurodevelopmental disorders. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 2019;180:390–414. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32704>.

Tait S, Tassinari R, Maranghi F, Mantovani A. Toxicogenomic analysis of placenta samples from mice exposed to different doses of BPA Article in *Genomics Data* · April 2015 different doses of BPA. *Genomics Data* 2015:109–11. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.04.004>.

Tarrade A, Panchenko P, Junien C, Gabory A. Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. *J Exp Biol* 2015;218:50–8. <https://doi.org/10.1242/jeb.110320>.

Tarry-Adkins JL, Chen J, Jones RH, Smith NH, Ozanne SE. Poor maternal nutrition leads to alterations in oxidative stress, antioxidant defense capacity, and markers of fibrosis in rat islets: potential underlying mechanisms for development of the diabetic phenotype in later life. *FASEB J* 2010;24:2762–71. <https://doi.org/10.1096/fj.10-156075>.

Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, et al. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci* 2016;19:335–46. <https://doi.org/10.1038/nn.4216>.

Tay S, Hughey JJ, Lee TK, Lipniacki T, Quake SR, Covert MW. Single-cell NF- κ B dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature* 2010;466:267–71. <https://doi.org/10.1038/nature09145>.

Tsuchida N, Kojima J, Fukuda A, Oda M, Kawasaki T, Ito H, et al. Transcriptomic features of trophoblast lineage cells derived from human induced pluripotent stem cells treated with BMP 4. *Placenta* 2020;89:20–32. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.10.006>.

Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Dev* 2019;146. <https://doi.org/10.1242/dev.163428>.

Unlugedik E, Alfaidy N, Holloway A, Lye S, Bocking A, Challis J, et al. Expression and

regulation of prostaglandin receptors in the human placenta and fetal membranes at term and preterm. *Reprod Fertil Dev* 2010;22:796–807. <https://doi.org/10.1071/RD09148>.

Ursini G, Punzi G, Chen Q, Marengo S, Robinson JF, Porcelli A, et al. Convergence of placenta biology and genetic risk for schizophrenia article. *Nat Med* 2018;24:792–801. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0021-y>.

Veening JW, Smits WK, Kuipers OP. Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2008;62:193–210. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163002>.

Velasquez JC, Goeden N, Bonnin A. Placental serotonin: Implications for the developmental effects of SSRIs and maternal depression. *Front Cell Neurosci* 2013;7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00047>.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* (80-) 1995;270:484–7. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.484>.

Vento-Tormo R, Efremova M, Botting RA, Turco MY, Vento-Tormo M, Meyer KB, et al. Single-cell reconstruction of the early maternal–fetal interface in humans. *Nature* 2018;563:347–53. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0698-6>.

Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2000;279. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.1.e83>.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;10:57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>.

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002;420:520–62. <https://doi.org/10.1038/nature01262>.

Weber APM. Discovering new biology through sequencing of RNA. *Plant Physiol* 2015;169:1524–31. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01081>.

Weinstock M, Matlina E, Maor GI, Rosen H, McEwen BS. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. *Brain Res* 1992;595:195–200.

Wen DJ, Poh JS, Ni SN, Chong YS, Chen H, Kwek K, et al. Influences of prenatal and postnatal maternal depression on amygdala volume and microstructure in young children. *Transl Psychiatry* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.74>.

Werling DMDM, Geschwind DHDH. Sex differences in autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol* 2013;26:146–53. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32835ee548>.Sex.

WHO. World Health Organization. Preventing chronic diseases: a vital investment. WHO 2015.

WHO. World Health Organization. Global Status Report on noncommunicable diseases. WHO 2014.

Wieczorek A, Perani C V., Nixon M, Constancia M, Sandovici I, Zazara DE, et al. Sex-specific regulation of stress-induced fetal glucocorticoid surge by the mouse placenta. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2019;317:E109–20. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00551.2018>.

Wills QF, Livak KJ, Tipping AJ, Enver T, Goldson AJ, Sexton DW, et al. Single-cell gene expression analysis reveals genetic associations masked in whole-tissue experiments. *Nat Biotechnol* 2013;31:748–52. <https://doi.org/10.1038/nbt.2642>.

Wolf JB, Hager R. A maternal-offspring coadaptation theory for the evolution of genomic imprinting. *PLoS Biol* 2006;4:2238–43. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040380>.

Wolstenholme JT, Rissman EF, Bekiranov S. Sexual differentiation in the developing mouse brain: contributions of sex chromosome genes. *Genes, Brain Behav* 2013;12:166–80. <https://doi.org/10.1111/gbb.12010>.

Xu M-Q, Sun W-S, Liu B-X, Feng G-Y, Yu L, Yang L, et al. Prenatal malnutrition and adult schizophrenia: further evidence from the 1959-1961 Chinese famine. *Schizophr Bull* 2009;35:568–76. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn168>.

Yabe S, Alexenko AP, Amita M, Yang Y, Schust DJ, Sadovsky Y, et al. Comparison of syncytiotrophoblast generated from human embryonic stem cells and from term placentas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E2598–607. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601630113>.

Zannas AS, West AE. Epigenetics and the regulation of stress vulnerability and resilience. *Neuroscience* 2014;264:157–70. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.12.003>.

Zhang F, Yuan S, Shao F, Wang W. Adolescent social defeat induced alterations in social behavior and cognitive flexibility in adult mice: Effects of developmental stage and social condition. *Front Behav Neurosci* 2016;10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00149>.

Ziats MN, Rennert OM. Sex-biased gene expression in the developing brain: implications for autism spectrum disorders. *Mol Autism* 2013;4:10. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-10>.

Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, Reinius B, Guillaumet-Adkins A, Smets M, et al. Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. *Mol Cell* 2017;65:631-643.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.023>.