

Algoritmo computacional integrativo de regiões diferencialmente metiladas polimórficas específicas da placenta humana revela regiões com assimetrias gamética e somática da metilação

Pedro Thyago Mozer Rodrigues

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

FEVEREIRO – 2018

Algoritmo computacional integrativo de regiões diferencialmente metiladas polimórficas específicas da placenta humana revela regiões com assimetrias gamética e somática da metilação

Pedro Thyago Mozer Rodrigues

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Curso: Biociências e Biotecnologia.”

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

FEVEREIRO – 2018

Algoritmo computacional integrativo de regiões diferencialmente metiladas polimórficas específicas da placenta humana revela regiões com assimetrias gamética e somática da metilação

Pedro Thyago Mozer Rodrigues

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Curso: Biociências e Biotecnologia.”

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Ana Beatriz Garcia, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense

Dr. Fabricio Moreira de Almeida, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense

Prof. Dr. Filipe Bruma Machado, D.Sc., Universidade do Estado de Minas Gerais

Coorientador

Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta, Ph.D., Universidade Estadual do Norte Fluminense

Orientador

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABELAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 - Imprinting genômico.....	1
1.2 - Elementos regulatórios do imprinting genômico	2
1.3 - A placenta no imprinting genômico	7
3 – OBJETIVOS	10
3.1 – Objetivo geral	10
3.2 - Objetivos específicos	10
4 - MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 - Análise integrativa de dados secundários.....	11
4.2 - Identificação de regiões controladoras do imprinting	11
4.3 - Teste de expressão monoalélica utilizando dados de RNA-seq.....	13
4.4 - Estudo de polimorfismo de metilação presente em regiões diferencialmente metiladas relacionadas ao imprinting e identificação de alterações das DMRs associadas às trissomias 21, 18 e 13.	14
5 - RESULTADOS	15
5.1 - Análise integrativa de dados secundários.....	15
5.2 - Identificação de regiões controladoras do imprinting	16
5.3 - Avaliação de expressão monoalélica	17
5.4 - Estudo de polimorfismo de metilação presente em regiões diferencialmente metiladas relacionadas ao imprinting e identificação de alterações das DMRs associadas às trissomias 21, 18 e 13.	17
6 - Dados suplementares	107
7 - DISCUSSÃO	108
8 - CONCLUSÕES	121
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de manutenção de <i>imprinting</i> direto proposto para o gene KCNQ1.	5
Figura 2. Mecanismos de manutenção de <i>imprinting</i> indireta proposta para o gene H19.	6
Figura 3. Status de metilação da DMR sabidamente imprintada do gene <i>PRMT2</i>	19
Figura 4. Distribuição dos sinais obtidos pelo algoritmo de identificação de possíveis genes imprintados.	20
Figura 5. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs sabidamente imprintadas constitutivas.	21
Figura 6. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias sabidamente imprintadas.	22
Figura 7. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias sabidamente imprintadas.	23
Figura 8. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias sabidamente imprintadas.	24
Figura 9. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias sabidamente imprintadas.	25
Figura 10. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias sabidamente imprintadas.	26
Figura 11. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias sabidamente imprintadas.	27
Figura 12. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs sabidamente imprintadas específicas da placenta e controle negativo utilizando housekeeping genes placentários.	28
Figura 13. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias específicas da placenta sabidamente imprintadas.	29
Figura 14. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias específicas da placenta sabidamente imprintadas.	30
Figura 15. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias específicas da placenta sabidamente imprintadas.	31
Figura 16. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias específicas da placenta sabidamente imprintadas.	32

Figura 17. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias específicas da placenta sabidamente imprintadas.	33
Figura 18. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.	34
Figura 19. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.	35
Figura 20. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.	36
Figura 21. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.	37
Figura 22. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.	38
Figura 23. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.	39
Figura 24. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.	40
Figura 25. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.	41
Figura 26. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.	42
Figura 27. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs candidatas primárias encontradas pelo algoritmo.	43
Figura 28. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias candidatas.	44
Figura 29. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias candidatas.	45
Figura 30. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias candidatas.	46
Figura 31. Comparação das DMRs primárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.	47
Figura 32. Comparação das DMRs primárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.	48
Figura 33. Comparação das DMRs primárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.	49
Figura 34. Comparação das DMRs primárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.	50
Figura 35. Frações alélicas de genes candidatos ao <i>imprinting</i> primário.	51
Figura 36. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs candidatas secundárias encontradas pelo algoritmo (grupo 2).	53
Figura 37. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs candidatas secundárias encontradas pelo algoritmo (grupo 2).	54
Figura 38. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs candidatas secundárias encontradas pelo algoritmo (grupo 3).	55
Figura 39. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs candidatas secundárias encontradas pelo algoritmo (grupo 4).	56
Figura 40. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	57

Figura 41. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	58
Figura 42. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	59
Figura 43. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	60
Figura 44. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	61
Figura 45. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	62
Figura 46. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	63
Figura 47. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	64
Figura 48. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	65
Figura 49. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	66
Figura 50. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	67
Figura 51. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	68
Figura 52. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	69
Figura 53. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	70
Figura 54. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	71
Figura 55. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	72
Figura 56. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	73
Figura 57. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	74
Figura 58. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	75
Figura 59. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	76
Figura 60. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	77
Figura 61. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas. .	78
Figura 62. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.....	79
Figura 63. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.....	80
Figura 64. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.....	81
Figura 65. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.....	82
Figura 66. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.....	83
Figura 67. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.....	84

Figura 68.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	85
Figura 69.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	86
Figura 70.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	87
Figura 71. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	88
Figura 72.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	89
Figura 73. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	90
Figura 74.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	91
Figura 75.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	92
Figura 76.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	93
Figura 77.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	94
Figura 78.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	95
Figura 79.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	96
Figura 80.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	97
Figura 81.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	98
Figura 82.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	99
Figura 83.Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaveis e trissômicas.....	100
Figura 84.Frações alélicas de genes candidatos sujeitos ao <i>imprinting</i> genômico.	101

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. <i>Cross-reference</i> de DMRs primárias candidatas ao <i>imprinting</i> com dados de expressão alélica presentes no artigo de Hamada 2016.....	52
Tabela 2. <i>Cross-reference</i> de DMRs candidatas secundárias com dados de expressão alélica presentes no artigo de Hamada 2016.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMRs – Regiões diferencialmente metiladas

ICRs – Regiões controladoras do imprinting

SNPs – Polimorfismos de base única

AMR – Regiões alelo-específicas

HMR – Regiões hipometiladas

RESUMO

A impressão genômica (*imprinting* genômico) refere-se à expressão monoalélica dependente da origem de certos genes, que é acoplada a modificações epigenéticas que estão presentes nos cromossomos maternos ou paternos herdados. A modificação epigenética mais proeminente subjacente à impressão genômica é a metilação de DNA alelo-específica. A metilação alelo-específica, dependente da origem parental representa regiões de DNA com assimetria de metilação conhecidas como regiões diferencialmente metiladas (DMRs). A assimetria de metilação dos alelos nas DMRs pode originar-se nos gametas (DMRs primários) ou pós-fertilização (DMRs secundárias). O perfil de expressão monoalélica dependente de origem parental está relacionado à formação saudável do feto e a manutenção do padrão de expressão monoalélica e que é essencial para o desenvolvimento saudável dos seres humanos. Um pequeno subconjunto de genes que estão sujeitos à impressão genômica é expresso de forma monoalélica exclusivamente na placenta humana. Curiosamente, esse conjunto de genes exibe na placenta as modificações epigenéticas que estão presentes nos genes imprintados em outros tecidos somáticos. Estudos recentes mostraram que em algumas placentas saudáveis, a característica de assimetria de metilação das DMRs está ausente em algumas DMR primárias, resultando na expressão bialélica desses loci. A metilação nesses DMRs é então polimórfica. Se DMR secundárias polimórficas existem na placenta não está claro. Nesta dissertação, nós identificamos novas DMR primárias e secundárias polimórficas e placenta-específicas. Para realizar isso, usei metilomas públicos e um algoritmo baseado em uma interseção de regiões que exibem metilação alelo-específicas e regiões hipometiladas, simulando o fenômeno de polimorfismo específico da placenta. Foram encontrados 63 DMRs provavelmente polimórficas. Duas dessas DMRs parecem controlar a impressão genômica dos genes subjacentes. Além disso, descrevo 69 regiões genômicas que apresentam metilação diferencial em placentas trissômicas quando comparadas à placentas saudáveis aumentando a informação sobre a fenomenologia das trissomias viáveis.

Palavras-chave: Imprinting, metilação, polimorfismo, trissomia 21, trissomia 18, trissomia 13.

ABSTRACT

Genomic imprinting is a parent-of-origin dependent monoallelic expression profile that is coupled with epigenetic modifications that are either present in the maternal or paternal chromosome. The most prominent epigenetic modification related to genomic imprinting is DNA methylation, that can have its origin from the gametes and is called a primary differentially methylated region, or post-fertilization being called a secondary differentially methylated region. This expression profile is related to the healthy formation of the fetus and the maintenance of this monoallelic expression is essential to the healthy formation of humans. Within the classes of genomic imprinting, there is a small subset of genes that are almost exclusively monoallelically expressed in the human placenta, showing only in the human placenta epigenetic modifications that are generally present in all tissues of imprinted genes. Recently studies have shown that healthy placentas can lose its imprinted methylation, demonstrating a biallelic expression and loss of imprinting. However so far only primary placenta differentially methylated regions were explored. In this work we identify new polymorphic primary and secondary differentially methylated regions. To accomplish this, we used public methylomes and an algorithm based on an intersection of allelic specific regions and hypomethylated regions simulating the placenta specific polymorphism phenomenon. We found in this work 63 polymorphic differentially methylated regions being that two of those are extremely probable of being subject of genomic imprinting. Besides that, we found in this work 69 regions that show differential methylation in trisomy samples when compared to healthy placentas increasing the information about the viable trisomies.

Keywords: Imprinting, methylation, polymorphism, trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13.

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Imprinting genômico

Em organismos diploides a expressão bialélica, ou seja, a expressão do cromossomo paterno e materno minimiza a ocorrência de doenças genéticas recessivas (Kaneko-Ishino *et al.*, 2006). No entanto nem todos os genes apresentam perfil de expressão bialélica, em um grupo de genes apenas a cópia do cromossomo materno ou paterno é expressa, tal perfil de expressão é denominada expressão monoalélica. Existem três tipos de expressão monoalélica onde cada tipo apresenta um mecanismo epigenético distinto para regular sua expressão dos 2 alelos (Raissig *et al.*, 2013). Esses tipos são denominados: Expressão monoalélica aleatória, inativação do cromossomo X, e *imprinting* genômico (Savova *et al.*, 2013).

A expressão monoalélica aleatória consiste na inativação epigenética aleatória do cromossomo materno ou paterno em determinados genes. As marcas e os processos epigenéticos que regulam esse perfil de expressão não foram totalmente descobertos ainda, no entanto já foi descrito que os genes desse perfil de expressão apresentam marcas de histona específicas (Nag *et al.*, 2013; Savova *et al.*, 2013).

A inativação do cromossomo X é um processo que ocorre em fêmeas de mamíferos onde um dos cromossomos X presente em determinados indivíduos é inativo. Esse processo de silenciamento acontece através da expressão de um RNA longo não codificante chamado *XIST*. Após a expressão o *XIST* silencia em *cis* todo o cromossomo em que foi expresso. O cromossomo X que foi inativo se mantém silenciado por toda a vida daquele indivíduo (Lessing *et al.*, 2013).

O *imprinting* genômico é um tipo de expressão monoalélica parental dependente presente em mamíferos placentários e angiospermas onde apenas a cópia materna ou paterna de determinados genes é expresso. O perfil de expressão monoalélica do *imprinting* é mantido através de ICR (regiões controladoras do *imprinting*, do inglês *Imprinting control regions*), que são regiões que possuem marcas epigenéticas e elementos regulatórios que controlam o processo de transcrição (Raissig *et al.*, 2013; Hanna e Kelsey, 2014; Weaver e Bartolomei, 2014).

Das marcas epigenéticas relacionadas ao *imprinting* a mais proeminente é a metilação do DNA cromossomo específica, onde apenas parte do cromossomo materno ou paterno possui metilação. Essas regiões possuem valores de metilação

intermediários e são chamadas de regiões diferencialmente metiladas. (DMRs, do inglês: *Differentially methylated regions*) (Abramowitz e Bartolomei, 2012). A característica de valor intermediário de metilação nas DMRs é bastante utilizada para identificação de novos genes sujeitos a *imprinting*. Onde os métodos já explorados abrangem desde comparar vários tecidos normais que possuem valor intermediário de metilação entre diversos tecidos, entre tecidos saudáveis e tecidos trissômicos e até comparando placentas saudáveis com molas hidatidiformes (Court *et al.*, 2014; Sanchez-Delgado *et al.*, 2015).

As DMRs relacionadas ao *imprinting* são divididas em 2 tipos referente a sua origem: são elas as DMRs germinativas (gDMRs) e as DMRs secundárias (sDMR). As gDMRs possuem como origem os gametas e são obtidas durante a espermatogênese ou oogênese enquanto as sDMRs são adquiridas após a fecundação. As gDMRs possuem como característica a assimetria de metilação nos gametas, enquanto as sDMRs não apresentam assimetria de metilação nos gametas. As DMRs podem ser constitutivas ou específicas da placenta. As DMRs constitutivas são encontradas em todos os tecidos somáticos mantendo o domínio de metilação intermediário consistente entre elas, enquanto as DMRs específicas da placenta apresentam metilação alelo específica em sua maioria apenas na placenta e ausência de metilação em tecidos somáticos, algumas DMRs placentárias possuem hipermetilação ou metilação intermediária nos tecidos somáticos em vez de ausência de metilação. As DMRs placentárias possuem como característica peculiar o fenômeno de polimorfismo de metilação, onde em algumas placentas as DMRs relacionadas ao *imprinting* perdem o domínio de metilação intermediário e a capacidade de manter expressão monoalélica. (Ferguson-Smith, 2011; Court *et al.*, 2014; Sanchez-Delgado *et al.*, 2015; Pervjakova *et al.*, 2016; Sanchez-Delgado *et al.*, 2016).

1.2 – Regiões regulatórias do imprinting genômico

A metilação de DNA consiste em uma marca epigenética presente na citosina e está relacionado com expressão gênica. Existem múltiplas formas de metilação de DNA, sendo que a mais proeminente é a 5-metilcitosina. A adição do grupo metil na citosina é feito por um grupo de enzimas denominadas DNA metiltransferases. A 5-metilcitosina possui uma variação estável chamada 5-hidroximetilcitosina que é formada através da adição de um grupo hidroxila feito por um grupo de enzimas de

translocação dez-onze (Meng *et al.*, 2015). A quantificação e identificação das citosinas que apresentam o grupo metil podem ser feitas de diversas maneiras, sendo que os grandes estudos feitos recentemente que identificaram novas DMRs relacionadas ao *imprinting* utilizaram técnicas com base no tratamento de bissulfito de sódio. Dentre as abordagens utilizando bissulfito de sódio duas se destacam, sendo elas quantificação da metilação genoma abrangente ou quantificação utilizando o chip comercial *Infinium HumanMethylation450*.

As técnicas de bissulfito utilizaram as características químicas do bissulfito de sódio de converter as citosinas não metiladas em uracilas mantendo as citosinas metiladas não alteradas. Logo após a reação de bissulfito é feito um conjunto de reações em cadeia da polimerase convertendo a uracila em timina e depois é feito um cálculo comparando quantas vezes a citosina em determinado ponto é convertido em timina. O chip *illumina 450k* possui como base de sua arquitetura dois tipos de sondas que interpretam os valores das citosinas transformadas ou não pelo processo de conversão de bissulfito, o chip *illumina 450K* possui como limitação o número máximo de citosinas em posições fixas estudáveis de 485, 577 sendo que parte dessas citosinas podem apresentar valores errôneos devido a reações cruzadas entre as sondas sendo recomendando não utilizar os pontos onde acontece tal reação, reduzindo a cobertura do processo (Shen e Waterland, 2007; Chen *et al.*, 2013).

Nos humanos a metilação acontece predominantemente nos dinucleotídeos CpG, a metilação restante acontece em um contexto CpH onde H pode ser um dos nucleotídeos restantes. A presença de metilação CpH já foi demonstrada em diversos tecidos humanos e a presença desse tipo de metilação no corpo gênico apresenta uma correlação negativa com a expressão, enquanto a metilação CpG apresenta uma correlação positiva com a expressão em diversos tecidos inclusive em ovócitos (Varley *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014; Okae *et al.*, 2014; Schultz *et al.*, 2015). No contexto global os dinucleotídeos CpG estão dispersos em intervalos entre si, no entanto existem pontos em que grandes concentrações de CpGs se concentram, essas regiões são denominadas ilhas CpG (CGI, do inglês CpG islands).

As CGI são predominantemente não metiladas e estão relacionadas com regiões promotoras de genes, ainda assim essas CGI podem ser metiladas e tal metilação está relacionada com silenciamento da região promotora (Deaton e Bird, 2011). As CGI podem ou não estar relacionadas com HMRs (Regiões hipometiladas, do inglês *hypomethylated regions*) ou AMRs (Regiões de metilação alelo específica,

do inglês *allele-specific methylation*). HMRs são regiões do genoma que não apresentam metilação enquanto as AMRs são regiões do genoma que dependendo do alelo presente em sua região o nível de metilação é alterado, AMRs podem estar relacionadas com metilação parente dependente ou não. As gDMRs maternas e paternas se encontram em CGI sendo que as gDMRs maternas se concentram mais em regiões promotoras enquanto as gDMRs paternas se concentram em regiões intrônicas (Kelsey e Feil, 2013; Song *et al.*, 2013).

Em mamíferos o perfil global de metilação é estável e em dois momentos tal perfil é alterado bruscamente por um processo onde as marcas epigenéticas são apagadas, fenômeno conhecido como onda de desmetilação. A primeira onda de desmetilação acontece na formação de células germinativas primordiais com intuito de facilitar a gametogênese enquanto a segunda onda de desmetilação acontece quando os gametas se unem para formar o zigoto com intuito de oferecer um estado de totipotência para o zigoto (Cantone e Fisher, 2013; Tang *et al.*, 2016). Em camundongos, as DMRs relacionadas ao imprinting são apagadas na primeira onda de desmetilação e resistem a segunda onda. As DMRs constitutivas e específicas da placenta humanas presentes em genes imprintados são apagadas na primeira onda de desmetilação enquanto as DMRs constitutivas e específicas da placenta resistem a perda de metilação na segunda onda (Smallwood e Kelsey, 2012; Court *et al.*, 2014; Sanchez-Delgado *et al.*, 2016).

A metilação nas DMRs presentes nas ICR mantém o perfil de expressão monoalélica de suas regiões através de diversos mecanismos. Esta metilação pode diretamente silenciar uma região promotora de um gene ou servir como parte de um mecanismo regulatório maior. Um exemplo de regulação direta pela metilação seria a DMR dos genes *KCNQ1/KCNQ1OT1* enquanto um exemplo de regulação com mais elementos seria a DMR do gene *H19*. A DMR presente nos genes *KCNQ1/KCNQ1OT1* possui metilação no cromossomo materno e coincide com a região promotora do RNA não codificante *KCNQ1OT1*, tal metilação silencia sua expressão. O *KCNQ1OT1* tem como função silenciar os genes ao redor de sua região logo a metilação na fita materna evita que tal gene seja transcrito possibilitando a expressão do gene *KCNQ1* em ao menos um cromossomo (**Figura 1**).

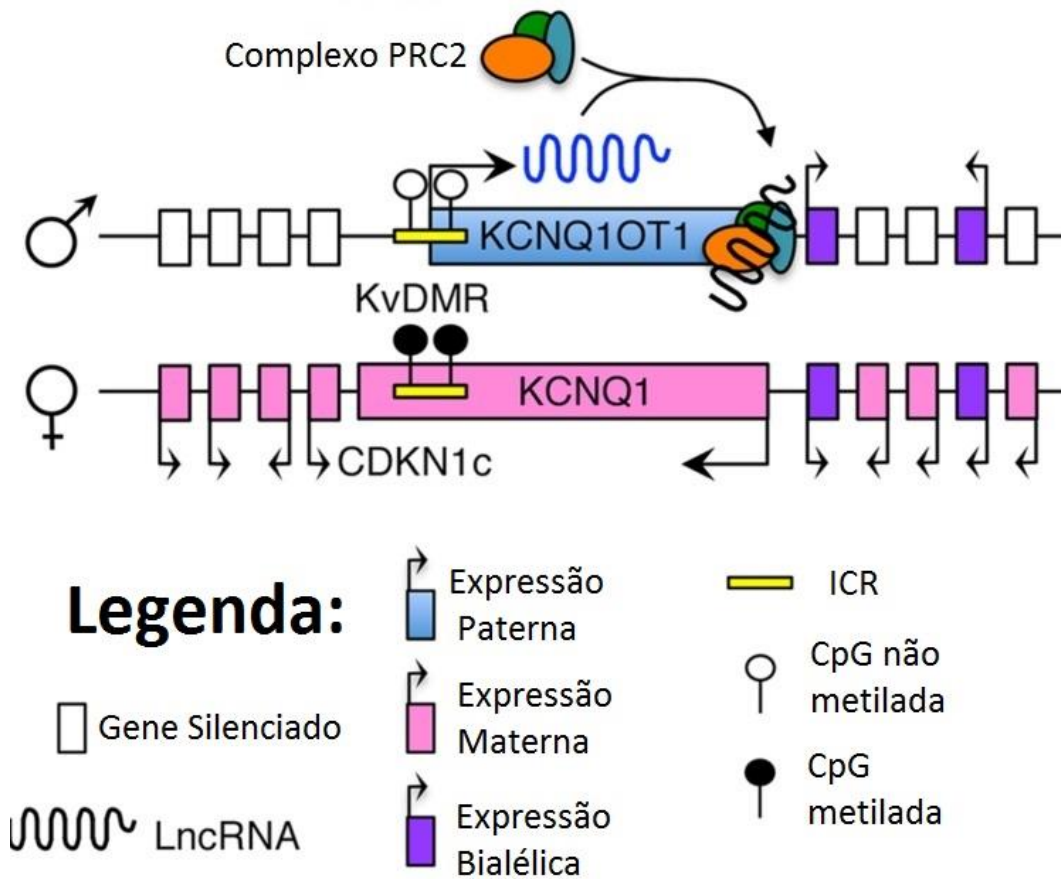


Figura 1. Mecanismo de manutenção de *imprinting* direto proposto para o gene KCNQ1.

Na imagem cada quadrado representa um gene distinto, sendo que a ICR materna está presente no gene KCNQ1 coincidindo com a região promotora do RNA longo não codificante KCNQ1OT1. O mecanismo de imprinting proposto se baseia no complexo PRC2 se que liga ao RNA não codificante expresso na cópia paterna não silenciada do gene KCNQ1OT1 e silencia *in cis* a expressão do gene KCNQ1 e de genes próximos. Figura adaptada de (Kameswaran e Kaestner, 2014).

Já a DMR do gene *H19* possui metilação na fita paterna e o que determina a expressão do gene *H19* é uma proteína CTCF que se liga no cromossomo não metilado. A proteína CTCF atua como um limitador de um *enhancer* que naturalmente possibilita a expressão do gene *IGF2*, com a presença da proteína CTCF tal *enhancer* deixa de possibilitar a expressão do *IGF2* e o gene *H19* é expresso em seu lugar (Kameswaran e Kaestner, 2014) (**Figura 2**).

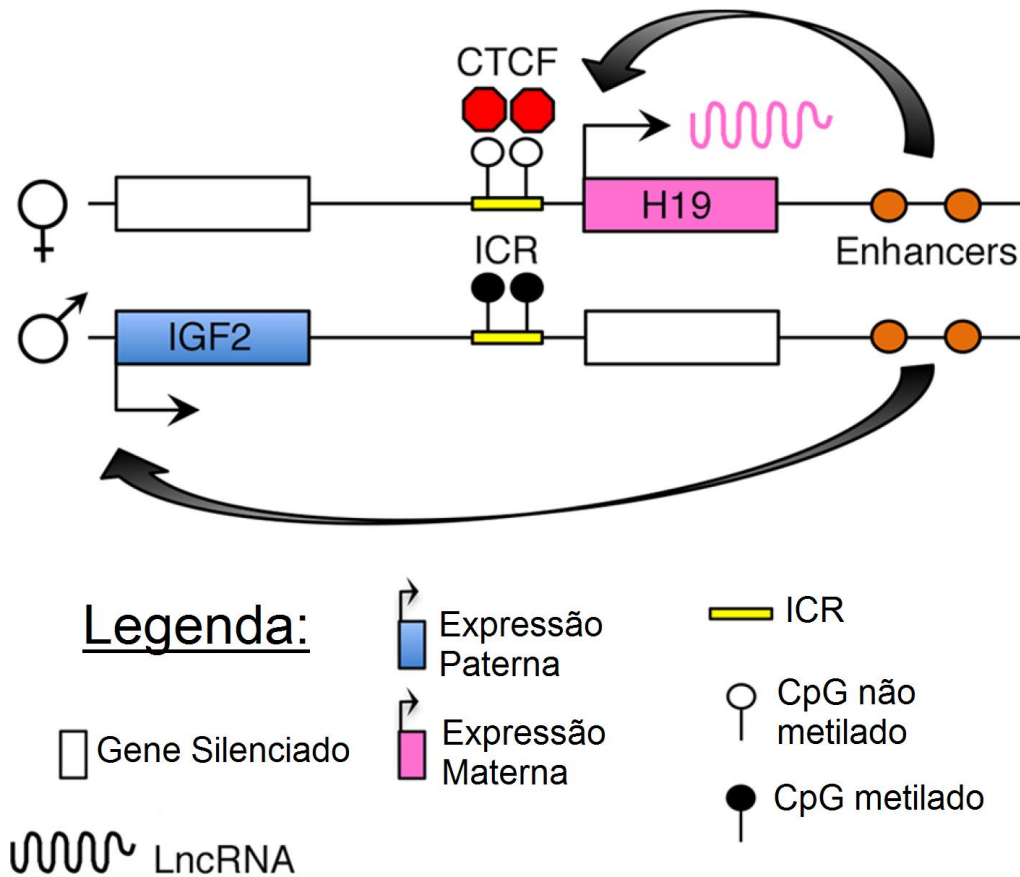


Figura 2. Mecanismos de manutenção de *imprinting* indireta proposta para o gene H19.

Na imagem cada quadrado representa um gene distinto, sendo que a ICR está próxima ao gene H19, coincidindo com ICR paterna que se encontra um sítio CTCF que se liga em regiões não metiladas. O mecanismo de *imprinting* proposto se baseia na competição de um enhancer que se liga naturalmente ao gene *IGF2*, no entanto a proteína CTCF se liga ao domínio não metilado impedindo que o enhancers se ligue em CIS a região promotora do gene *IGF2*, atuando como promotor do gene H19. Figura adaptada de (Kameswaran e Kaestner, 2014).

Uma DMR com metilação origem parental dependente não necessariamente controla o perfil de expressão monoalélica de ICRs presentes em genes sujeitos a *imprinting*. Tal dinâmica acontece em humanos na DMR presente no gene *GRB10* que possui domínio de metilação intermediária em pelo menos linfócito, fígado e cérebro e, no entanto seu perfil de expressão monoalélico se encontra apenas no cérebro (Court *et al.*, 2014; Baran *et al.*, 2015). A evidência para explicar esse fenômeno foi descrita em uma linhagem de camundongos que possui a DMR do gene *GRB10* como a de humanos e está relacionada com marcas específicas de histonas. As histonas são proteínas que fazem parte do nucleossomo que possui como função envolver o DNA. A estrutura básica de um nucleossomo consiste de um octâmero que possui duas cópias de cada uma das proteínas de histona sendo elas denominadas H3, H4, H2A e H2B e uma histona H1/H5 que une a estrutura. As proteínas de histonas podem

sofrer modificações pós-transcricionais modificando o estado da cromatina entre eucromatina e heterocromatina.

Em camundongos o gene *GRB10* possui uma isoforma específica do cérebro com expressão de origem exclusiva paterna e duas isoformas com expressão de origem preferencialmente materna na placenta. Na placenta é observado um estado bivalência nas marcas de histona na DMR com a presença das marcas de histona H3K4me2 que estão relacionadas a expressão genica e H3K27me3 que estão relacionadas com a repressão genica. Enquanto no cérebro de camundongos não é visto a bivalência e é encontrado na DMR apenas a marca H3K4me2 e no cromossomo não metilado a marca H3K9ac, tais marcas estão relacionadas com expressão gênica e estão presumidamente ligados com a expressão paterna específica do cérebro (Monk *et al.*, 2009; Venkatesh e Workman, 2015).

No contexto de DMRs específicas da placenta uma marca de histona característica e presente em todas as DMRs não foram identificados ainda, e quanto à metilação da DMRs existem evidências que elas fazem parte das ICRs visto que os genes das DMRs que apresentaram perda de metilação apresentavam perfil de expressão bialélico e não monoalélico (Sanchez-Delgado *et al.*, 2016). Além da metilação de DNA e marcas de histonas um terceiro elemento pode participar de uma ICR, tal elemento seria os RNAs longos não codificantes. Um RNA longo não codificante pode silenciar em cis os genes alvos como o caso do *KCNQ10T1* ou potencializando a expressão de genes vizinhos. Em camundongos existe evidência de que a deleção de regiões promotoras do *linc1319* reduz a expressão do gene vizinho *Sfmbt2* a níveis críticos, sendo necessária a presença dessa região para a ativação do gene *Sfmbt2*. O gene *Sfmbt2* é imprintado em camundongos e sua expressão monoalélica é essencial para o desenvolvimento de placentas saudáveis (Miri *et al.*, 2013; Engreitz *et al.*, 2016).

1.3 - A placenta no imprinting genômico

A placenta é o um órgão temporário que é formado nos humanos e tem como função criar uma interface entre a mãe e o feto durante os nove meses da vida fetal com intuito de oferecer sobrevivência ao feto, seja através da nutrição ou através de mecanismos imunoreguladores que proporcionam ao feto uma resistência contra ao sistema imune materno. Tal órgão é composto de diferentes tipos celulares e diferentes camadas e tem como origem um grupo de células presente no blastocisto.

A placenta é dividida em âmnio, córion, decídua e miométrio. A maior parte da placenta consiste em vilosidades presentes entre o âmnio e a decídua que possuem como função transportar oxigênio e nutrientes para o feto. Tais vilosidades possuem uma composição de origem fetal, composição misturada e composição de origem materna sendo que dependendo do sexo do feto o perfil de expressão das distintas partes da placenta muda, demonstrando que o desenvolvimento da placenta ao longo dos 9 meses não é estagnado e depende diretamente de uma interação feto/placenta. (Sood *et al.*, 2006; Maltepe e Fisher, 2015).

A placenta possui um nível de metilação global inferior aos outros tecidos humanos sendo que seu perfil de metilação apresenta um padrão bimodal com grandes regiões hipermetiladas e regiões hemimetiladas. As regiões hipermetiladas são conservadas em outros tecidos humanos enquanto as regiões hemimetiladas aparentam ser uma característica intrínseca da placenta, tais domínios são conservados durante os 9 meses da placenta e apresentam genes com uma expressão genica reduzida quando se comparado com os genes fora de tais domínios (Schroeder *et al.*, 2013).

A manutenção da *imprinting* na placenta é essencial para o seu desenvolvimento, a perda de imprinting em certos genes chave causa vários problemas tanto para o feto quanto para a formação da placenta. Em camundongos as perdas de imprinting em genes específicos causam desde má formação da placenta a inviabilização do crescimento fetal, quando a perda de imprinting é viável a vida os fenótipos comuns apresentados vão desde supercrescimento placentário e fetal a retardo de crescimento fetal e placentário. Em Humanos várias doenças relacionadas ao ganho ou perda de metilação das DMRs já foram documentadas e apresentam fenótipos parecidos com a perda de *imprinting* nos camundongos. Um exemplo de doença humana que apresenta o retardo do crescimento fetal é a diabetes mellitus neonatal transitório tipo 1, tal doença é associada com a superexpressão do gene imprintado *PLAG1* presente no cromossomo 6. Outra síndrome com fenótipo semelhante a perda de imprinting em camundongos é a Beckwith-Wiedemann, tal síndrome possui como fenótipo gigantismo do feto, tal doença está relacionada com perda de metilação em várias DMRs presentes no cromossomo 11, estando na lista os genes *H19* e *KCNQ1OT1* (Eggermann *et al.*, 2015).

2 - JUSTIFICATIVA

O imprintoma, isto é o complemento total de genes sujeitos ao *imprinting* na placenta não está totalmente caracterizado, recentemente foram feitos dois estudos por Hamada (2015) e Delgado (2016) com intuito de se identificar genes imprintados na placenta, tais estudos geraram aproximadamente mais de 5600 possíveis DMRs relacionadas ao *imprinting*. No entanto o estudo realizado por Delgado utilizou apenas um estudo de bissulfito do genoma abrangente de uma placenta não considerando a possibilidade de regiões não serem identificadas devido ao polimorfismo. O estudo de Hamada fez análise de transcriptoma e de metilação de diversas placentas em distintos trimestres calculando a expressão alélica de SNPs em mais de 9000 genes, identificando diversos genes com expressão tendendo para expressão materna e paterna, no entanto nem todos os genes que apresentaram expressão tendendo para o alelo paterno ou materno apresentaram DMRs identificáveis devido a restringência do algoritmo utilizado pelo autor. Ambos os estudos conseguiram identificar evidência de *imprinting* apenas para DMRs primarias.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Caracterizar genes com expressão parental dependente na placenta assim como suas regiões diferencialmente metiladas.

3.2 - Objetivos específicos

Criar janelas personalizadas no browser genômico da Universidade de California Santa Cruz que agregam o maior número possível de estudos de metiloma, transcriptoma, sítios de proteínas controladoras de expressão e enhancers.

Criar algoritmo que detecta o maior número possível de regiões diferencialmente metiladas primárias e secundárias utilizando a característica de polimorfismo de metilação presente nas DMRs como base.

Observar os níveis de metilação utilizando o maior número possível de estudos de metiloma oriundos do chip comercial *Infinium HumanMethylation450* para determinar o estado de polimorfismo regiões diferencialmente metiladas conhecidas e candidatas.

Identificar o impacto das trissomias 21, 18 e 13 no nível de metilação de DMRs em *cis* e *trans* utilizando estudos de metiloma oriundos do chip comercial *Infinium HumanMethylation450* comparando placentas saudáveis com placentas trissômicas .

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Análise integrativa de dados secundários

Janelas personalizadas foram criadas na plataforma *UCSC (University of California Santa Cruz) genome browser (Kent et al., 2002)* tendo como base o genoma de referência versão GRCh37/hg19, integrando o maior número possível de dados secundários em pistas de informações, quando possível dados presentes nos public hubs foram integrados (*Raney et al., 2014*). Public hubs são centros que possuem várias pistas de informação prontas vindas de uma fonte externa à plataforma UCSC, os dados presentes em tais hubs em sua maioria vêm de grandes grupos colaborativos como *ROADMAP* e *ENCODE*. As pistas de informações que foram adicionadas estão divididas em dois grandes grupos: interface básica e metilomas.

No grupo de interface básica foram adicionadas 2 pistas de informações básicas que possibilitam a navegação e interpretação dos dados presentes sendo elas uma pista referente aos genes (*UCSC genes 2017*) e outro referente a ilha CpG (*CpG islands masked*). No grupo de metilomas 98 pistas customizáveis foram adicionadas sendo 8 pistas de metilação genoma abrangente (os tecidos de metilação genoma abrangente correspondem a: 2 amostras de oócito, espermatozoide, blastocisto, 3 placentas e sangue) e 82 pistas de metilação oriundas do chip *Illumina 450k* (os tecidos de metilação oriundos do chip *Illumina 450k* correspondem a: 16 placentas presumidamente saudáveis do terceiro trimestre gestacional, 24 placentas presumidamente saudáveis onde não se sabe a idade fetal exata, 12 placentas presumidamente saudáveis do primeiro trimestre gestacional, 12 placentas do primeiro trimestre de gestação com trissomias 21, 12 placentas do primeiro trimestre com trissomias do 18 e 6 placentas do primeiro trimestre com trissomias do 13). Após a montagem das janelas customizáveis, foi feita uma análise de genes sabidamente sujeitos a *imprinting* em tais janelas, com intuito de provar a eficiência da plataforma para identificar DMRs e *loci* possivelmente relacionadas ao *imprinting*.

4.2 - Identificação de regiões controladoras do imprinting

Foi criado um algoritmo utilizando o *table browser (Karolchik et al., 2004)* da plataforma *UCSC*, utilizando como base as características dos genes sujeitos a *imprinting* apenas na placenta. Foi feita uma interseção de domínios HMR, que

representam possíveis locais onde ocorre polimorfismo na placenta, com domínios de AMR que representam a característica de metilação específica de um alelo, ambos os domínios serão de origem do artigo de 2013 (Song *et al.*, 2013). As seguintes etapas foram feitas para gerar os sinais necessários: Acessar o *table browser* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>) -> em “*group*” selecionar “*DNA methylation*” -> em “*track*” selecionar “[Pub] Schroeder 2013” -> em “*table*” selecionar “hub_8415_SchroederHuman2013_HumanPlacentaAMR” -> na “*region*” selecionar “*genome*” -> selecionar “*intersection*” -> na nova janela selecionar “*group*” e inserir “*DNA methylation*” -> selecionar em “*track*”: [Pub] Roadmap 2015 -> em *table* selecionar “..._HumanPlacentaHMR)” -> selecionar apenas “All hub_8415_SchroederHuman2013_HumanPlacentaAMR recordsthathaveanyoverlapwith [Pub] Roadmap 2015” e submeter os dados -> na próxima janela gerada selecionar “*get output*”. Tais etapas foram realizadas e os valores gerados foram salvos.

Os locais gerados pela interseção foram abertos nas janelas da plataforma UCSC criadas anteriormente e os locais que apresentaram CpGs únicas (*CpGislandmasked*) foram explorados. Devido a irregularidade da extensão dos domínios AMR e HMR a partir dessa etapa a extensão inicial e final das ilhas CpGs que convergiram com as posições geradas pelo algoritmo serão consideradas como DMRs candidatas.

As DMRs candidatas passaram por três etapas com intuito de determinar seu tipo (DMR constitutiva primária, DMR constitutiva secundária e DMR específica da placenta) sendo que a primeira etapa considerou o nível de metilação presente no blastocisto. As DMRs candidatas que apresentaram $\geq 20\%$ de metilação no blastocisto foram consideradas DMRs candidatas primárias, enquanto as regiões que apresentaram metilação $\leq 12\%$ no blastocisto foram consideradas DMRs candidatas secundárias. Para validar o estado de DMR primária e secundária as metilações dos gametas nas DMRs candidatas foram conferidas, utilizando metilação dos gametas (Regiões que apresentaram assimetria de metilação gamética com metilação intermediária no blastocisto foram consideradas DMRs primárias e regiões que apresentaram ausência de assimetria gamética sem metilação no blastocisto foram consideradas DMRs secundárias).

Devido a originalidade do algoritmo de considerar a metilação do blastocisto, primeiro foi possível identificar as regiões com ausência de assimetria gamética com

metilação intermediária no blastocisto, essas regiões foram consideradas como DMRs primárias candidatas. Como etapa final do algoritmo a metilação das placentas e do sangue das DMRs primárias e secundárias foram calculadas, as DMRs que apresentaram metilação intermediária (entre 0.2 e 0.8) no sangue e/ou na placenta foram consideradas DMRs candidatas constitutivas, enquanto as DMRs candidatas que apresentaram ausência de metilação no sangue (entre 0 e 0.2) ou hipermetilação no sangue (entre 0.8 e 1) e metilação intermediária em ao menos 1 placenta foram consideradas DMRs candidatas específicas da placenta. DMRs candidatas que falharam em ser categorizadas em alguma das 3 etapas segundo os critérios pré-determinados pelo algoritmo não foram exploradas.

4.3 - Teste de expressão monoalélica utilizando dados de RNA-seq

Estudos de RNA-Seq de placenta humana e de células pré-implantação (2 células, 4 células, 8 células, 16 células) e implantadas (32 células, blastocisto inicial ao final) foram utilizados na plataforma *SRA* (Leinonen et al., 2011) do *NCBI* com intuito de identificar possível expressão monoalélica dos genes presentes nas DMRs candidatas identificadas anteriormente. Foram selecionados polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) utilizando o banco de SNPs do *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) com frequência alélica mínima maior que 0,3 presentes em regiões exóticas, regiões não traduzidas 5', regiões não traduzidas 3' dos genes presentes na DMR.

Quatrocentos e treze sequências de 29pb foram feitas contendo 14 nucleotídeos à esquerda e a direita do *SNP* selecionado anteriormente. O *SNP* no centro foi substituído segundo os códigos de ambiguidade IUPAC para os alelos possivelmente presentes em tal ponto. As sequências de 29pb com código IUPAC no centro serão utilizadas na plataforma *SRA*, a plataforma fornecerá o número de vezes que a sequência é encontrada em experimentos de RNA-Seq do tecido escolhido, os *reads* obtidos serão filtrados e o desequilíbrio alélico será calculado para o alelo 1 e 2 das sequências contendo o *SNP*. O cálculo do desequilíbrio alélico será feito da seguinte forma: $DESEQUILIBRIO\ ALELO\ A = \frac{READS\ OBTIDOS\ NO\ ALELO\ A}{READS\ TOTAIS}$. $DESEQUILIBRIO\ ALELO\ B = \frac{READS\ OBTIDOS\ NO\ ALELO\ B}{READS\ TOTAIS}$.

Os valores de desequilíbrio alélico serão interpretados da seguinte forma: Se o valor do desequilíbrio estiver entre 0,35 e 0,65 o perfil de expressão em tal amostra

será considerado consistente com expressão bialélica, se o valor do desequilíbrio for $\geq 0,85$ ou $\leq 0,15$ o perfil de expressão de tal amostra será considerado consistente com expressão monoalélica. As amostras com os valores de desequilíbrio entre 0,15 e 0,35 ou entre 0,65 e 0,85 serão consideradas expressão bialélica enviesada para um alelo.

Só foram estudadas sequências de 29pb que são únicas no genoma de referência GRCh37/hg19 e apenas serão consideradas sequências que apresentarem ≥ 20 reads para amostras de RNA-Seq placentário e ≥ 10 reads para amostras de RNA-Seq de células pré-implantadas ou implantadas. A sequência de 29pb explorada só será considerada informativa se ao menos 10 placentas distintas apresentarem mais de 20 reads ou mais de 5 estudos distintos relacionados a um mesmo período de desenvolvimento (2 células, 4 células, 8 células, 16 células e 32 células).

Devido à característica de polimorfismo na placenta será aceito até 10% de expressão bialélica dentro do conjunto de placentas e 32 células estudadas. Serão utilizadas para extrair os “reads” 296 entradas de experimentos de RNA-Seq de placenta, 13 entradas de experimentos referentes ao estágio de 2 células, 13 entradas referentes a 4 células, 13 entradas referentes a 8 células, 20 entradas referentes a 16 células e 31 entradas referentes a 32 células, disponíveis no NCBI previamente selecionadas pelo grupo de pesquisa. Para determinar se a sequência é única será utilizado um script do R utilizando o pacote *BSgenome.Hsapiens.UCSC.hg19*.

4.4 - Estudo de polimorfismo de metilação presente em regiões diferencialmente metiladas relacionadas ao imprinting e identificação de alterações das DMRs associadas às trissomias 21, 18 e 13.

Foi feito um estudo onde se calcula a média de metilação em DMRs candidatas com intuito de determinar presença de polimorfismo ou ausência de polimorfismo de metilação placentária. Para isso 52 amostras de placenta saudáveis distintas e 30 amostras de placentas trissômicas, oriundas do chip comercial Illumina 450k foram utilizadas. As 52 amostras de placentas foram utilizadas para identificar polimorfismo de metilação em iDMRs constitutivas enquanto para identificação de polimorfismo em DMRs específicas da placenta apenas as amostras em que se sabe a idade gestacional foram utilizadas. Com intuito de evitar possíveis modificações de metilação devido à idade gestacional apenas as placentas oriundas do primeiro trimestre foram utilizadas no teste de identificação de possível marcador molecular.

As sondas que apresentam hibridização cruzada e com polimorfismo relacionado a SNPs descobertas pelo estudo de Chen e colaboradores (2013) não serão consideradas. As médias de metilação das sondas presentes nas DMRs em tais estudos serão calculadas sendo que amostras que apresentaram sondas com valor de $p > 0.01$ não serão consideradas para a DMR estudada. Teste de T não pareado bicaudal foi utilizado para identificar diferença entre a média das placentas trissômicas e saudáveis sendo que diferenças menores ou iguais a $p < 0.05$ foram consideradas diferenças estatisticamente significativas.

5 - RESULTADOS

5.1 - Análise integrativa de dados secundários

Janelas customizáveis com intuito de oferecer rápida visualização de dados secundários foram criadas na plataforma UCSC, as pistas de informação adicionadas foram dos 2 primeiros grupos: interface básica e metilomas. Quanto a interface básica, foram utilizadas pistas de informações fornecidas pelo browser UCSC de genes codificantes e não codificantes possibilitando a rápida visualização de transcritos e transcritos alternativos e seus sentidos de transcrição 5' -> 3'. Informações de ilhas CpG (*UCSC MaskedCpG*, ilhas CpGs serão consideradas como reais em situações onde a densidade de um domínio de 200pb com sua concentração de CG iguala ou ultrapassa 50% do conteúdo dos nucleotídeos presentes na sequência) possibilitando saber os pontos de transcrição de determinados genes e sua possível relação com metilação. Quanto aos metilomas, dados de metilação dos 22 autossomos de ovócitos (n=2), esperma (n=1) e blastocisto(n=1) do artigo publicado em 2014 (Okae *et al.*, 2014) presente no banco de dados do JGA com o seguinte número de acesso JGAS0000000006 foram integrados possibilitando a rápida diferenciação de DMRs primárias e DMRs secundárias. Para determinar o estado de metilação das DMRs já descobertas e dos futuros alvos, três metilomas de diversos tecidos foram escolhidos através do public hub *DNA methylation* (Song *et al.*, 2013), sendo que dois desses estudos são metilomas placentários dos artigos de 2013 e 2015 (Schroeder *et al.*, 2013; Roadmap Epigenomics *et al.*, 2015) e um desses estudos é de tecido não placentário (sangue). Para aumentar o número de metilomas placentários disponíveis, os dados de metilação de bissulfito genoma abrangente do artigo de 2014 (Court *et*

al., 2014) presentes no banco de dados do GEO com o seguinte número de acesso GSM1134682 foram integrados. As placentas de genoma abrangente integradas foram denominadas Placenta 1 (Court *et al.*, 2014), Placenta 2 (Schroeder *et al.*, 2013) e Placenta 3 (Roadmap Epigenomics *et al.*, 2015). Além disso, domínios HMR da placenta *Roadmap 2015* e domínios AMR da placenta *Schroeder 2013* foram integrados. Um exemplo da janela pronta pode ser observado na Figura 3. Para determinar a capacidade das janelas criadas de discernir os perfis de DMRs sabidamente imprintados a média de metilação de 22 DMRs constitutivas primárias, 11 DMRs constitutivas secundárias (Figura 5) e 27 DMRs específicas da placenta foram feitas (Figura 12) utilizando os dados de metilação integrados anteriormente. Além disso, três genes *housekeeping* específicos da placenta foram utilizados como controle negativo (Figura 12). Para complementação e facilitação do *cross-referenced* dados de expressão alélica específica da placenta de mais de 9000 genes publicadas recentemente foram integradas no browser em uma janela separada. Tais dados vieram do artigo de (Hamada *et al.*, 2016) e demonstram se determinados genes possuem expressão enviesada para o alelo materno ou para o alelo paterno.

5.2 - Identificação de regiões controladoras do imprinting

A interseção de domínios AMR e HMR gerou 694 posições ao longo dos 22 autossomos humanos sendo que o cromossomo 19 apresentou o maior número de sinais (Figura 4). Das 694 posições, 334 apresentaram ilhas CpG (*CpG island. Masked*). 31 das 334 regiões apresentaram características de iDMRs primárias (assimetria de metilação gamética com presença de metilação no blastocisto) sendo que 9 dessas posições seguiram perfis de metilação gamética não descritas até então (ausência de assimetria gamética e metilação no blastocisto). 7 das 31 posições apresentaram metilação intermediária no sangue (entre 0.2 e 0.8) e conseqüentemente foram caracterizadas como DMRs primárias constitutivas, enquanto as 24 posições restantes apresentaram amostras de sangue hipometiladas (entre 0 e 0.2) ou hipermetiladas (entre 0.8 e 1) e conseqüentemente foram caracterizadas como DMRs primárias específicas da placenta (Figura 27). 208 das 303 posições restantes foram enquadradas como DMRs secundárias, sendo 45 dessas posições DMRs candidatas secundárias constitutivas e 163 DMRs candidatas específicas da placenta (Figura 36, 37, 38, 39) enquanto as 93 posições restantes

foram impossíveis de discernir entre DMRs primárias e secundárias, não sendo exploradas.

5.3 - Avaliação de expressão monoalélica

A busca por SNPs com $MAF \geq 0.3$ dentre os genes controles, utilizados com intuito de provar a efetividade da metodologia para provar expressão monoalélica, encontrou 135 SNPs dentre as regiões exônicas, regiões não traduzidas 5', regiões não traduzidas 3' dos genes sabidamente imprintados descritos anteriormente na literatura. Dentre os 135 SNPs apenas 13 SNPs apresentaram os reads mínimos para que a análise seja efetuada em amostras de Placenta (Figura 18, 19, 26), enquanto para 2 células, 4 células, 8 células, 16 células e 32 células foi possível observar respectivamente 13 SNPs informativos (Figura 20, 21, 26), 18 SNPs informativos (Figura 21, 22, 23, 26), 9 SNPs informativos (Figura 23, Figura 24, 26), 6 SNPs informativos (Figura 24, 26) e 8 SNPs informativos (Figura 25, 26). Com intuito de identificar possível expressão monoalélica dentre os genes presentes nas DMRs primárias candidatas ao imprinting identificamos nesse estudo 221 sequências (SNPs) de 29pb foram desenhadas sendo que três dessas sequências foram informativas aplicando os critérios de qualidade determinados anteriormente. Dos três SNPs informativos dois apresentaram reads necessários em estudos de 32 células enquanto um apresentou reads necessários em estudos de 16 células, 32 células e placenta (Figura 35). Já as DMRs candidatas secundárias apresentaram 192 sequências (SNPs) viáveis de 29pb, sendo que dessas sequências apenas 18 apresentaram reads mínimos para análise. Dos 18 SNPs dois apresentaram reads em estudos de 16 células (Figura 84), seis apresentaram reads necessários em estudos de 32 células (Figura 84) e 10 SNPs apresentaram reads necessários para análise em estudos de transcriptoma de placenta (Figura 85, 86).

5.4 - Estudo de polimorfismo de metilação presente em regiões diferencialmente metiladas relacionadas ao imprinting e identificação de alterações das DMRs associadas às trissomias 21, 18 e 13.

A média de 52 placentas oriundas do chip comercial Illumina 450 foi feita para iDMRs sabidamente imprintadas sendo que foi utilizado como base a posição presente no artigo de (Okoe *et al.*, 2014). A média da metilação foi feita para 30 DMRs primárias (Figuras 6, 7, 8, 9) e 10 DMRs secundárias (Figuras 10, 11) considerando toda

amostra que obtiver média de metilação abaixo de 0.1 como polimórfica. Com intuito de validar os resultados obtidos anteriormente e provar a efetividade de identificar polimorfismo em DMRs candidatas ao imprinting específicas da placenta a média de metilação de 35 iDMRs sabidamente imprintadas apenas na placenta foram feitas (Figura 13, 14, 15, 16, 17). A média da metilação de 21 DMRs primárias candidatas (Figura 28, 29, 30) e a média de 171 DMRs secundárias (Figura 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61) candidatas ao imprinting foram feitas e foi possível identificar em diversas regiões evidências de polimorfismo em diversas DMRs primárias e secundárias candidatas. As análises comparando amostras saudáveis e trissômicas em DMRs primárias candidatas podem ser encontradas nas Figuras 31, 32, 33, 34 enquanto as análises das DMRs secundárias em amostras saudáveis e trissômicas podem ser encontradas nas figuras 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83.

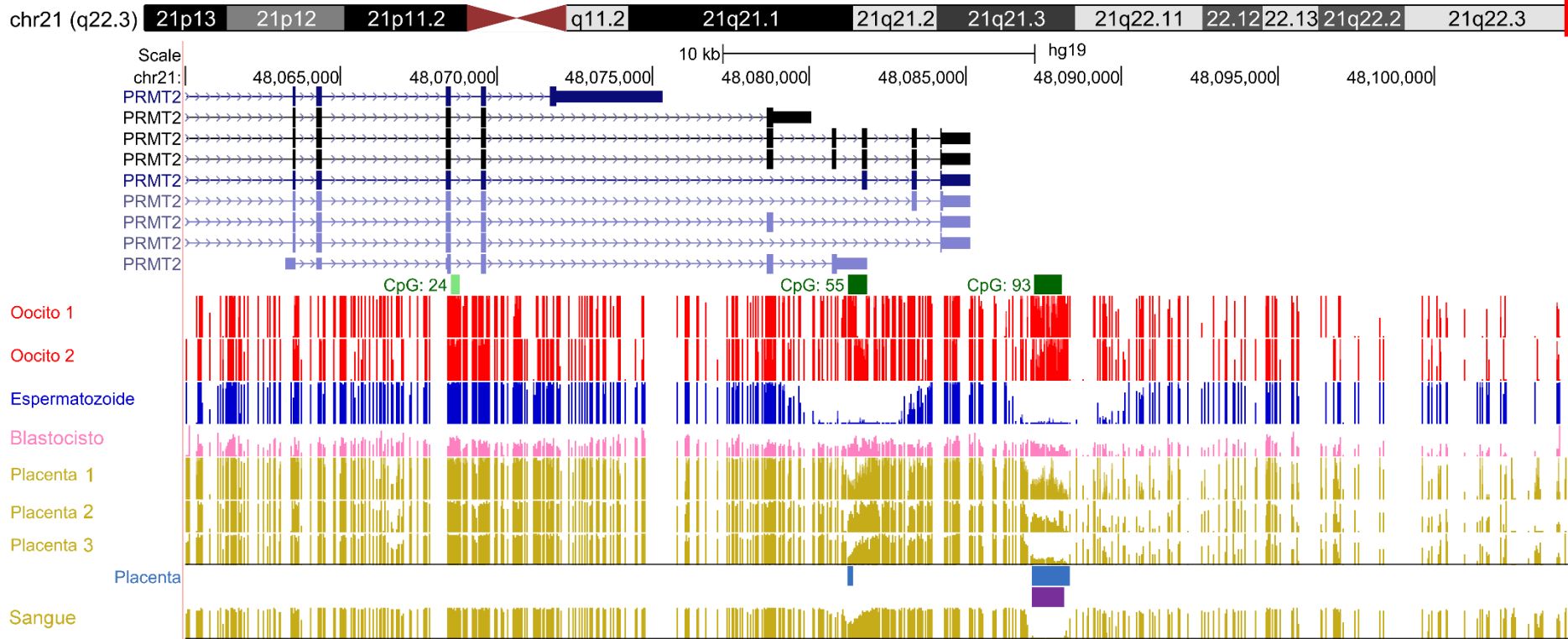


Figura 3. Níveis de metilação da DMR sabidamente imprintada do gene *PRMT2*.

Cromossomo, mapa físico, e características do gene *PRMT2* no sentido 5'→3' em uma extensão de 40 mil pares de base ao redor do gene com uma DMR sabidamente imprintada específica da placenta. A DMR está localizada no cromossomo 21 na ilha CpG 93. No sentido vertical encontra-se a interface básica que permite visualizar o gene e suas isoformas e as ilhas CpGs (barras verdes). Logo após as ilhas CpGs encontra-se o grupo demetilomas de gametas, tecidos embrionários e extraembrionários. Cada traço vertical representa o nível de metilação em uma escala entre zero e um, sendo 0 (zero) a ausência de metilação e 1 (um) estado hipermetilado. HMR (barra azul) representa estado hipometilado. AMR (barra lilás) representa estado intermediário de metilação (hemimetilado), possibilitando discernir o tipo de DMR e seu status na placenta. A interface criada possibilita discernir características presentes em DMRs imprintadas apenas na placenta, sendo elas: Polimorfismo de metilação na placenta, assimetria de metilação gamética e perfil global hipometilado em tecidos somáticos.

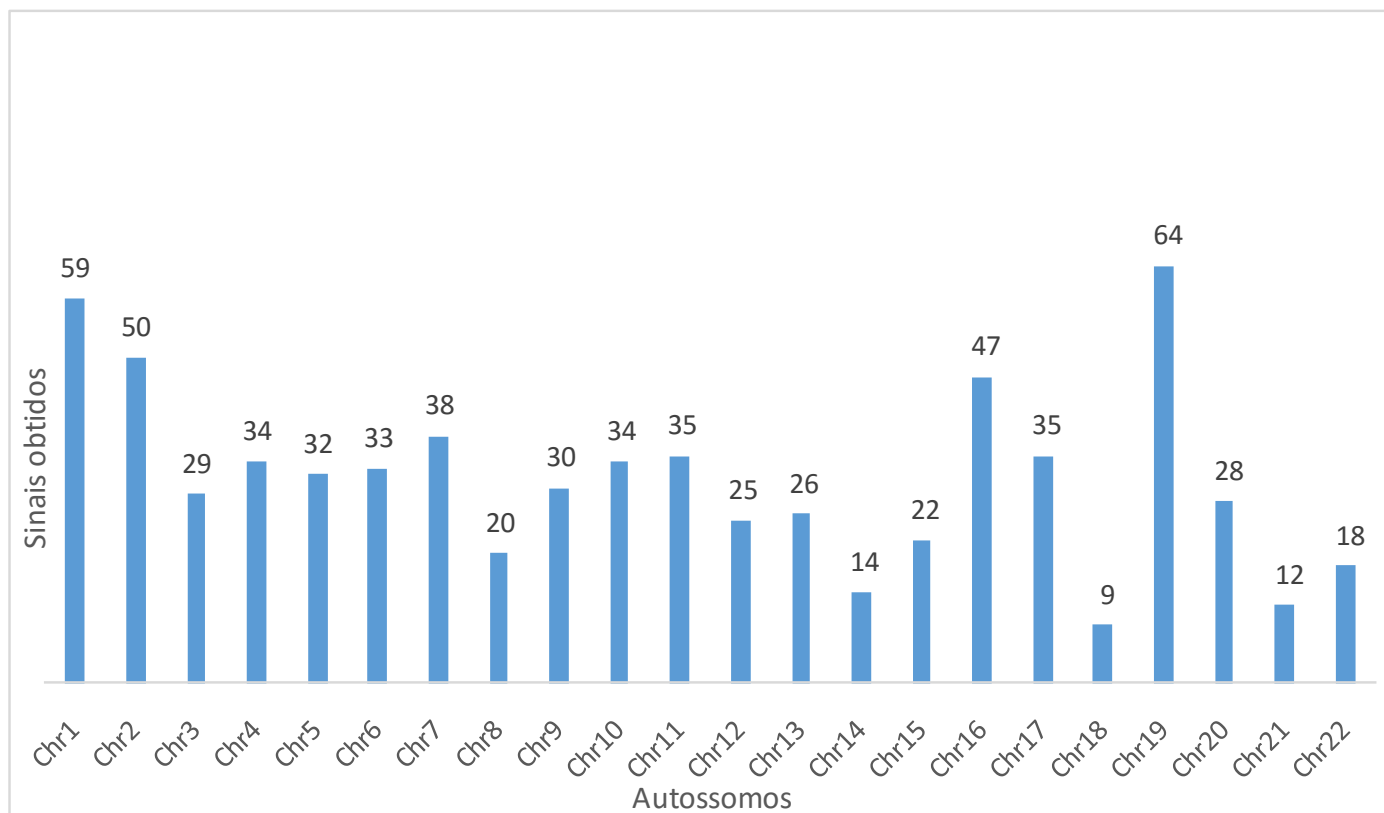


Figura 4. Distribuição dos sinais obtidos pelo algoritmo de identificação de possíveis genes imprintados.

Sinais gerados pela interseção de domínios hipometilados (HMR) com domínios com metilação alelo-específica (AMR) ao longo dos 22 autossomos humanos. Houve presença de sinais em todos os autossomos sendo que o cromossomo 19 apresentou o maior número de sinais.

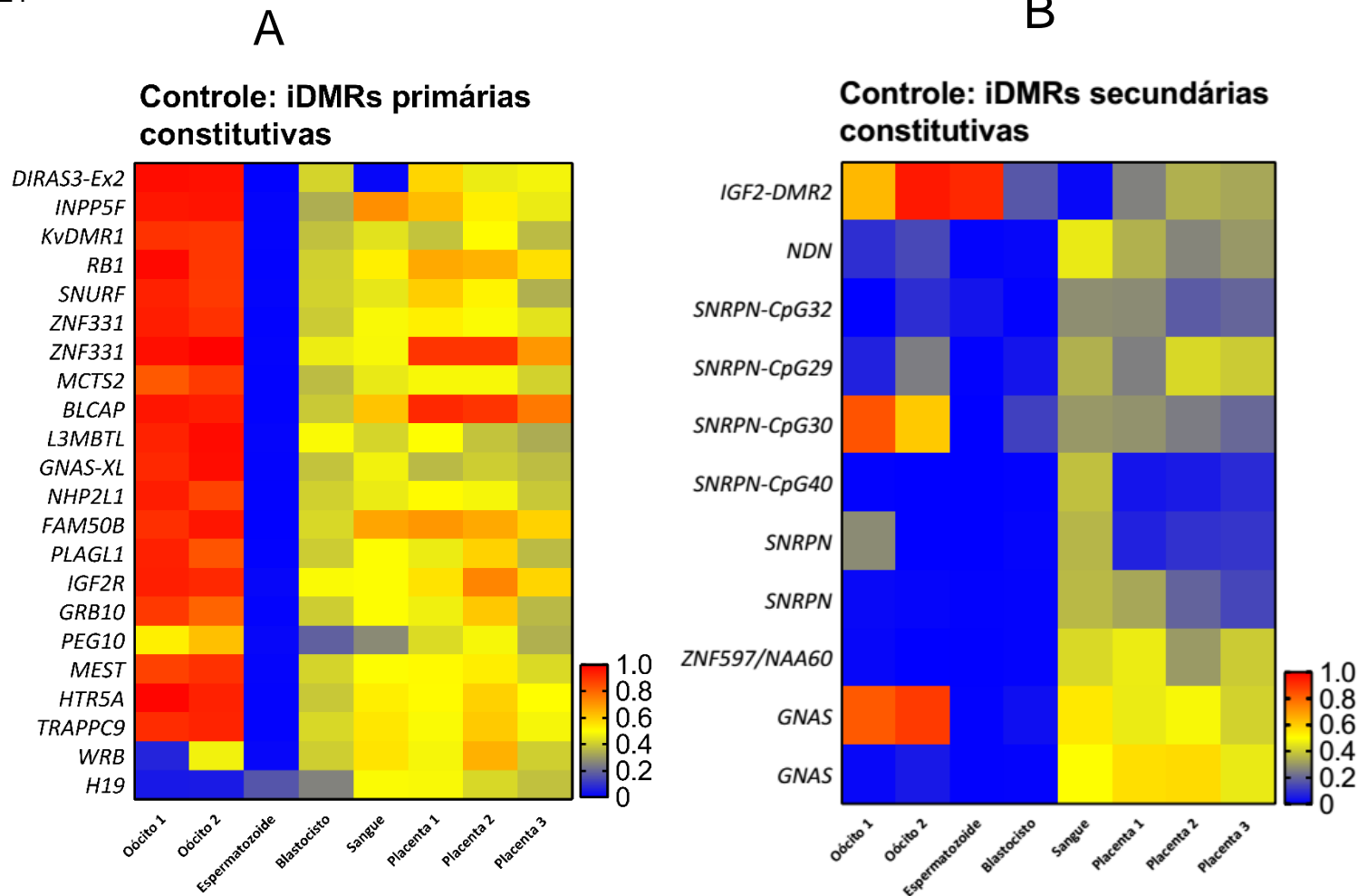


Figura 5. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs sabidamente imprintadas constitutivas.

No eixo X na parte inferior se encontram os tipos de tecidos utilizados para calcular a média de metilação, no eixo Y a esquerda se encontram os nomes dos genes que apresentam DMRs sabidamente imprintadas, apresentados em em uma escala de variação entre 0 e 1 sendo 1 a cor vermelha representando perfil hipermetilado, e 0 a cor azul representando o perfil hipometilado. Em (A) se encontra a media das DMRs constitutivas primárias e (B) a média de metilação de DMRs constitutivas secundárias. As DMRs constitutivas apresentaram quase que exclusivamente perfil global hemimetilado entre os tecidos sómicos e assimetria de metilação gámetica com metilação intermediária no blastocisto, enquanto as DMRs secundárias apresentaram hemi-metilação variada entre os tecidos sómicos e em sua maioria ausencia de assimetria de metilação gamética, sendo que quando presente a assimetria gamética vem acoplada a ausencia de metilação intermediária no blastocisto.

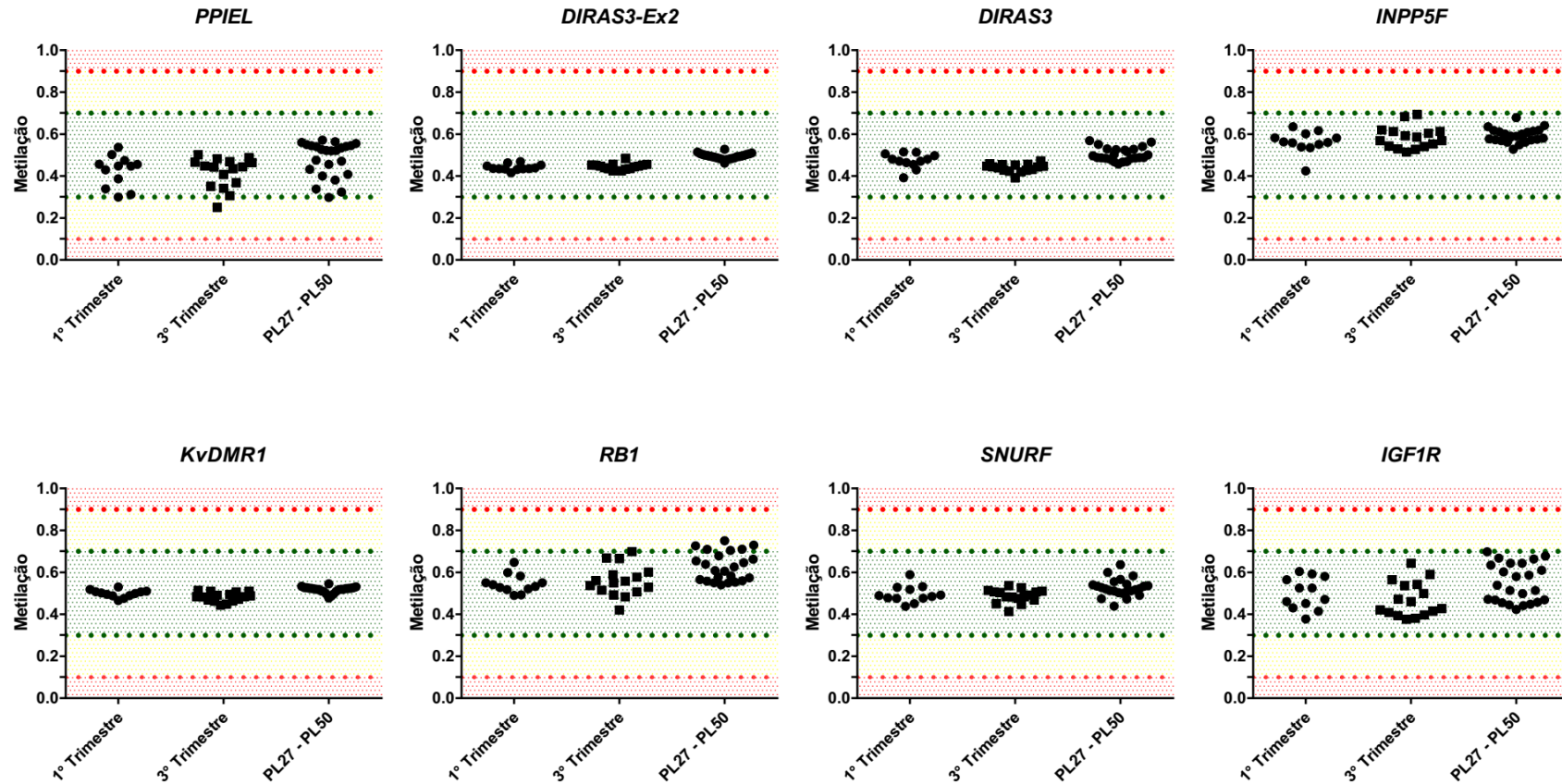


Figura 6. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias sabidamente imprintadas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta, PL27 – 57 representa um grupo de placentas onde não se sabe a idade exata. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os 8 genes não apresentaram presença de polimorfismo de metilação apresentando placentas em sua maioria no intervalo de metilação intermediária.

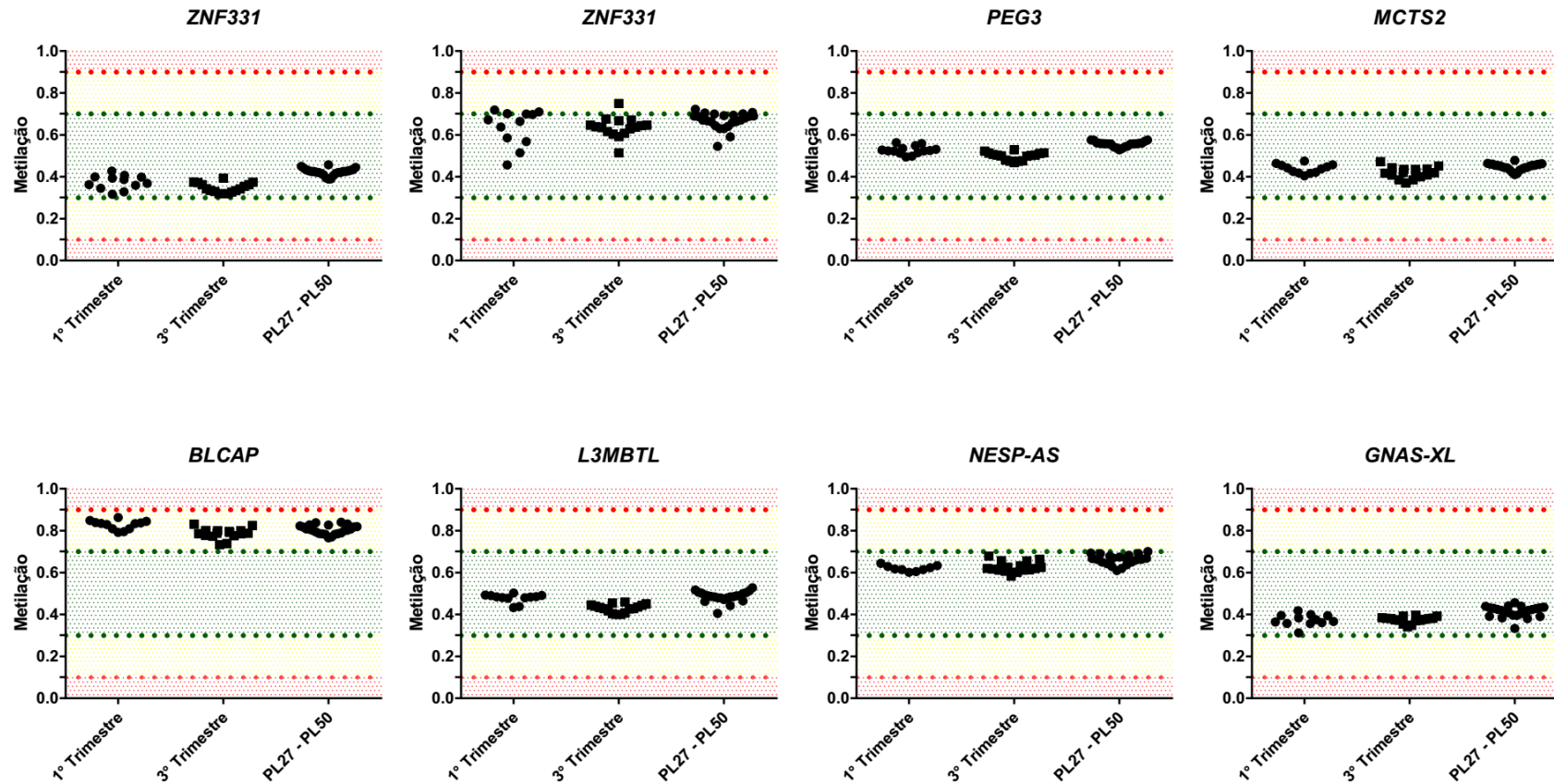


Figura 7. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias sabidamente imprintadas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em 8 genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta, PL27 – 57 representa um grupo de placentas onde não se sabe a idade exata. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os 8 genes não apresentaram presença de polimorfismo de metilação apresentando placentas em sua maioria no intervalo de metilação intermediária.

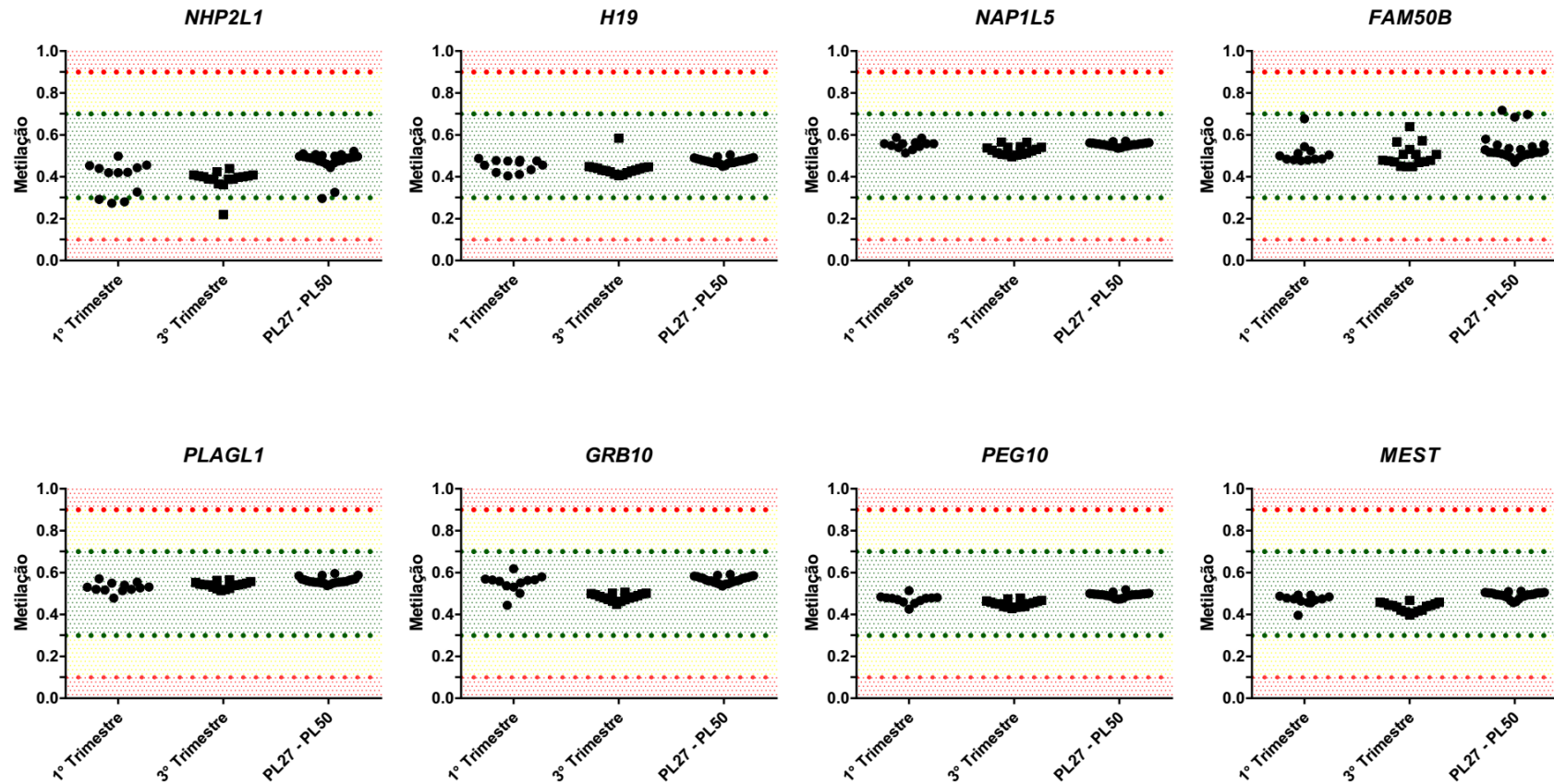


Figura 8. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias sabidamente imprintadas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta, PL27 – 57 representa um grupo de placentas onde não se sabe a idade exata. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os 8 genes não apresentaram presença de polimorfismo de metilação apresentando placentas em sua maioria no intervalo de metilação intermediária.

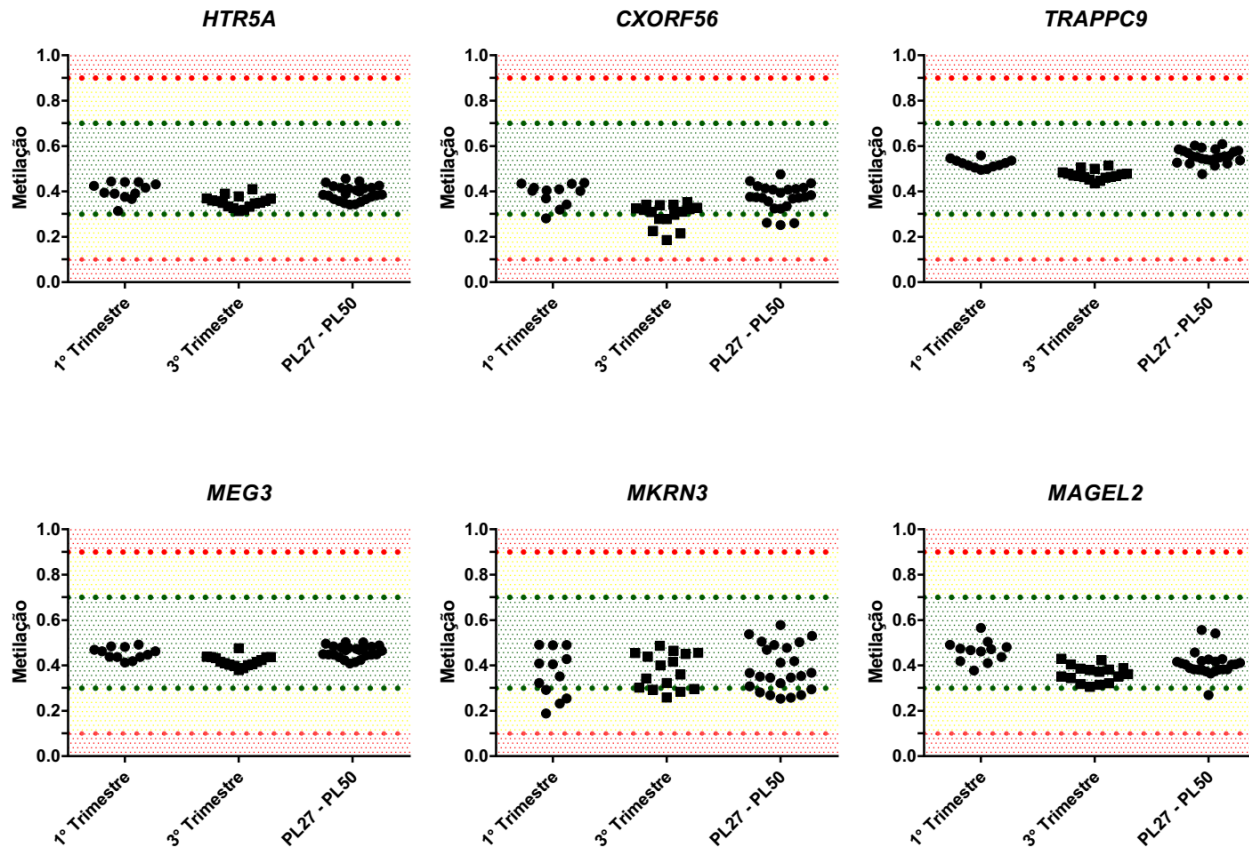


Figura 9. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias sabidamente imprintadas.

Teste de polimorfismo de metilação placentaria em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta, PL27 – 57 representa um grupo de placentas onde não se sabe a idade exata. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediaria (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediaria perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os 6 genes não apresentaram presença de polimorfismo de metilação apresentando placentas em sua maioria no intervalo de metilação intermediaria.

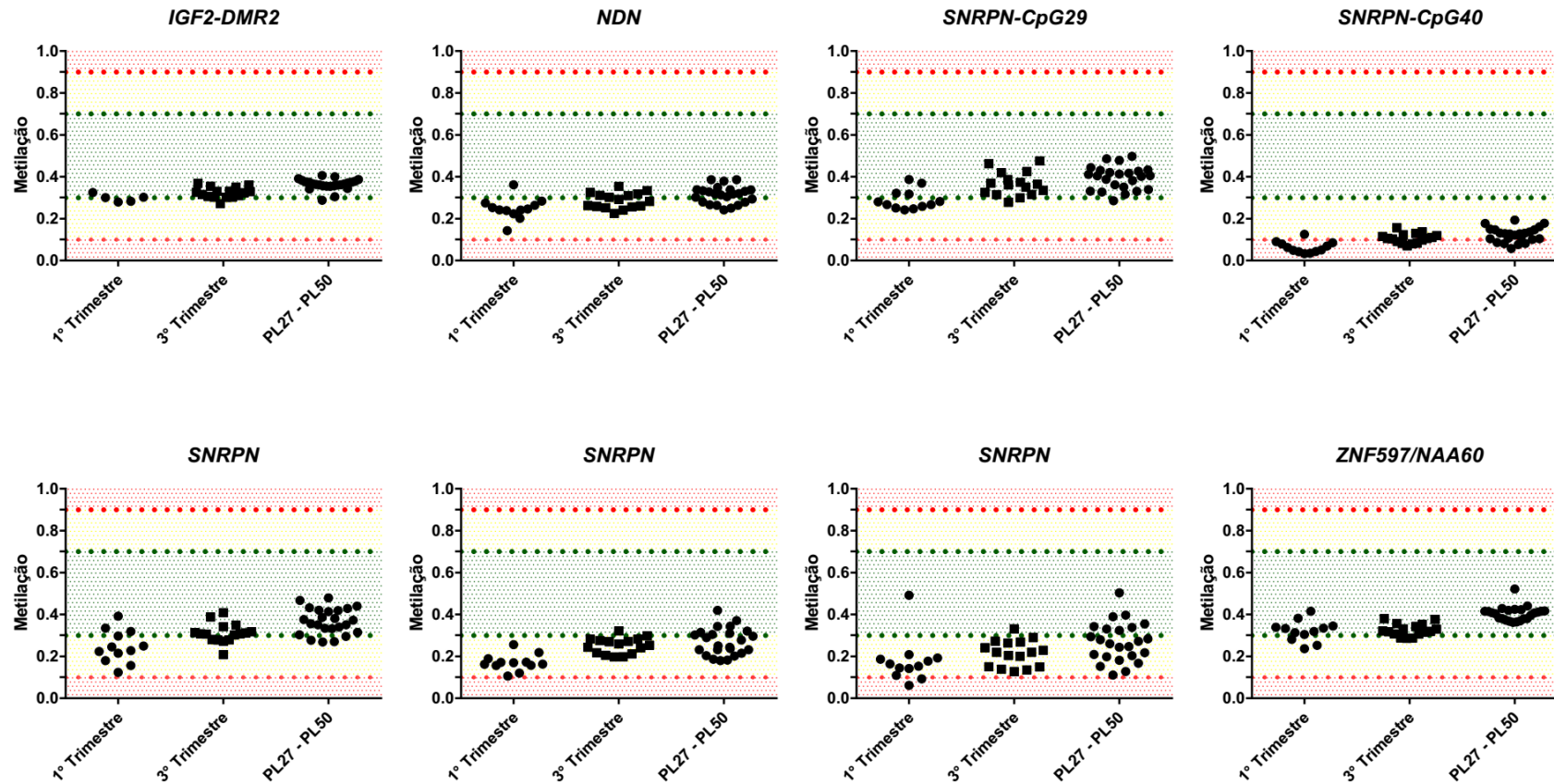


Figura 10. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias sabidamente imprintadas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta, PL27 – 57 representa um grupo de placentas onde não se sabe a idade exata. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Dois dos oito genes apresentaram polimorfismo de metilação (*SNRPN* e *SNRPN-CpG40*) enquanto os genes restantes não apresentaram presença de polimorfismo apresentando placentas em sua maioria no intervalo de metilação intermediária.

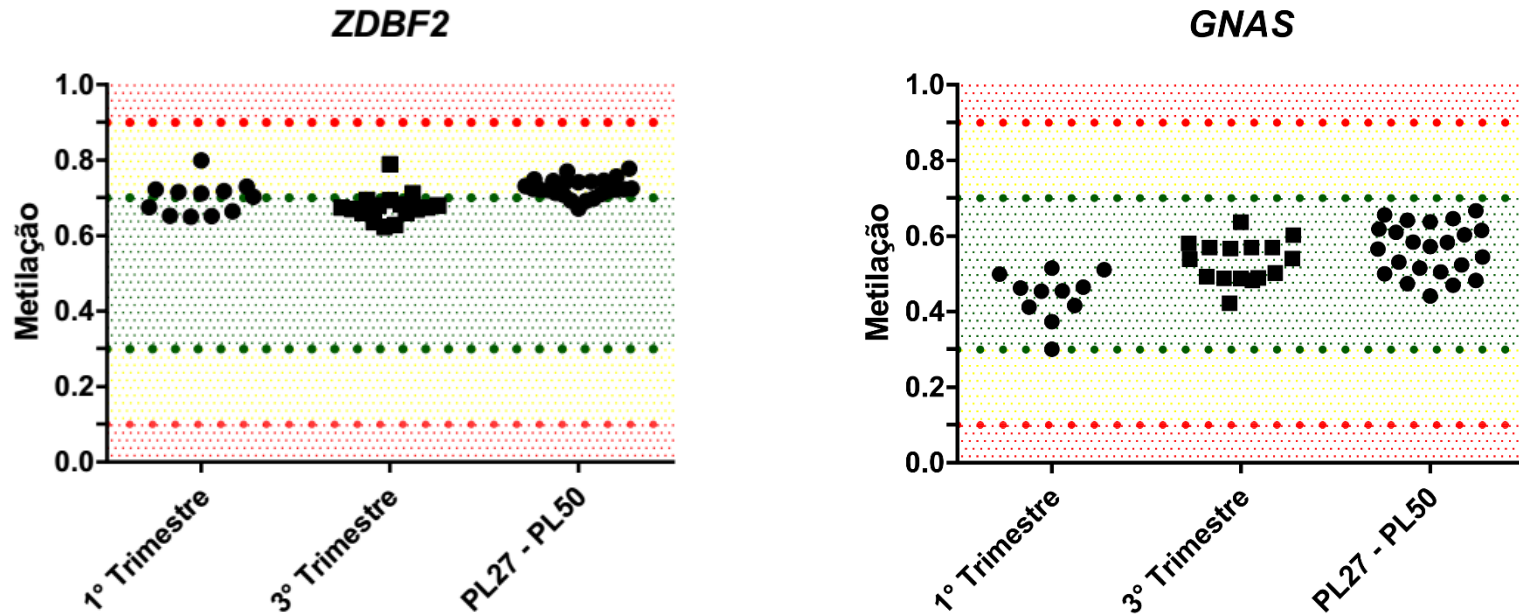


Figura 11. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias sabidamente imprintadas.

Teste de polimorfismo de metilação placentaria em dois genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta, PL27 – 57 representa um grupo de placentas onde não se sabe a idade exata. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediaria (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediaria perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). O gene *ZDBF2* e o gene *GNAS* não apresentam evidência de polimorfismo.

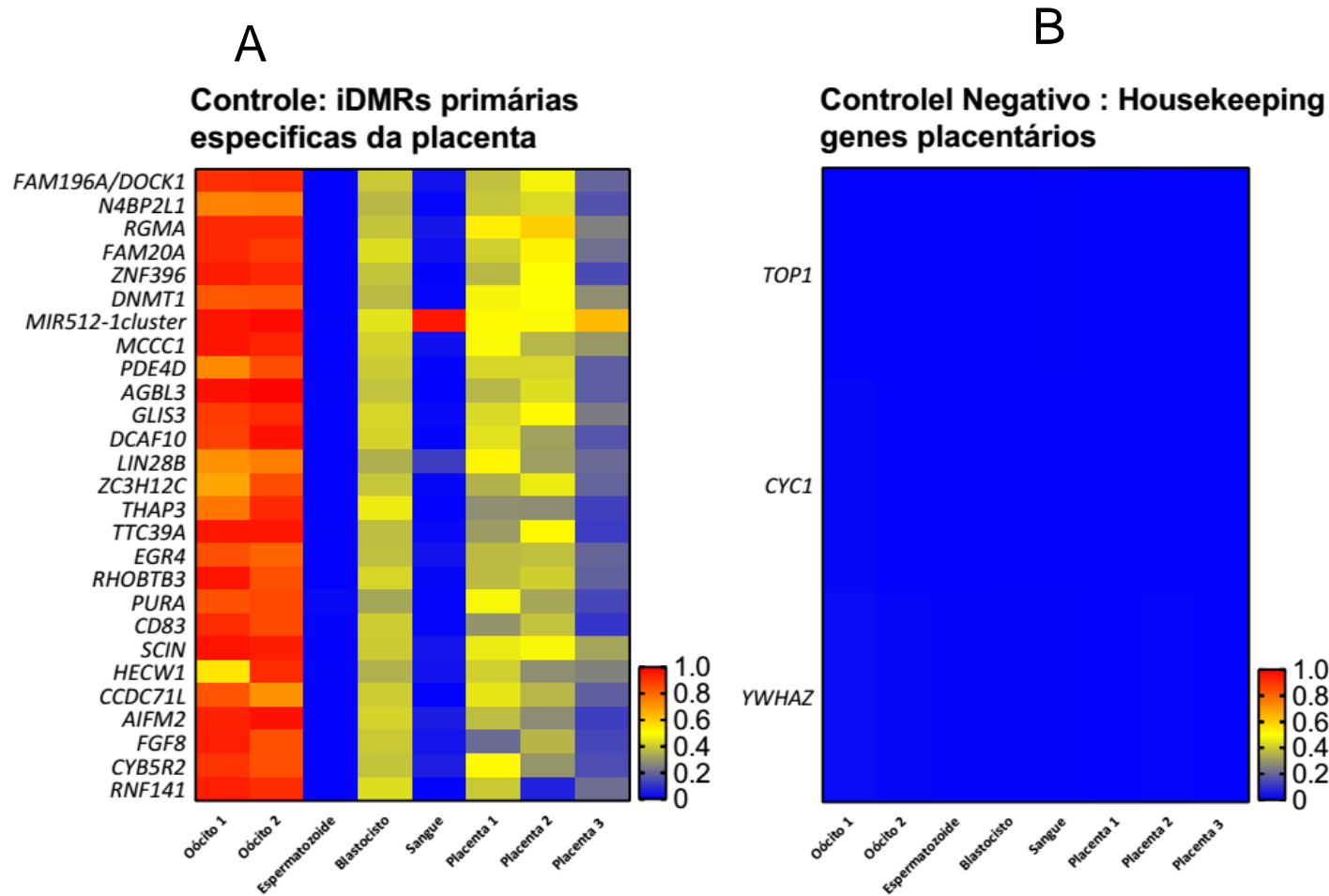


Figura 12. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs sabidamente imprintadas específicas da placenta e controle negativo utilizando housekeeping genes placentários.

No eixo X na parte inferior se encontram os tipos de tecidos utilizados para calcular a média de metilação, no eixo Y a esquerda se encontram os nomes dos genes que apresentados em uma escala de variação entre 0 e 1 sendo 1 a cor vermelha representando perfil hipermetilado, e 0 a cor azul representando o perfil hipometilado. Em (A) se encontra a média das DMRs constitutivas primárias e (B) a média de metilação dos housekeeping genes específicos da placenta utilizados como controle negativo. As DMRs constitutivas apresentaram perfil global hemimetilado entre os tecidos placentários e assimetria de metilação gâmetica com metilação intermediária no blastocisto e ausência de metilação no sangue, enquanto os housekeeping genes placentários apresentaram ausência de metilação em todos os tecidos testados.

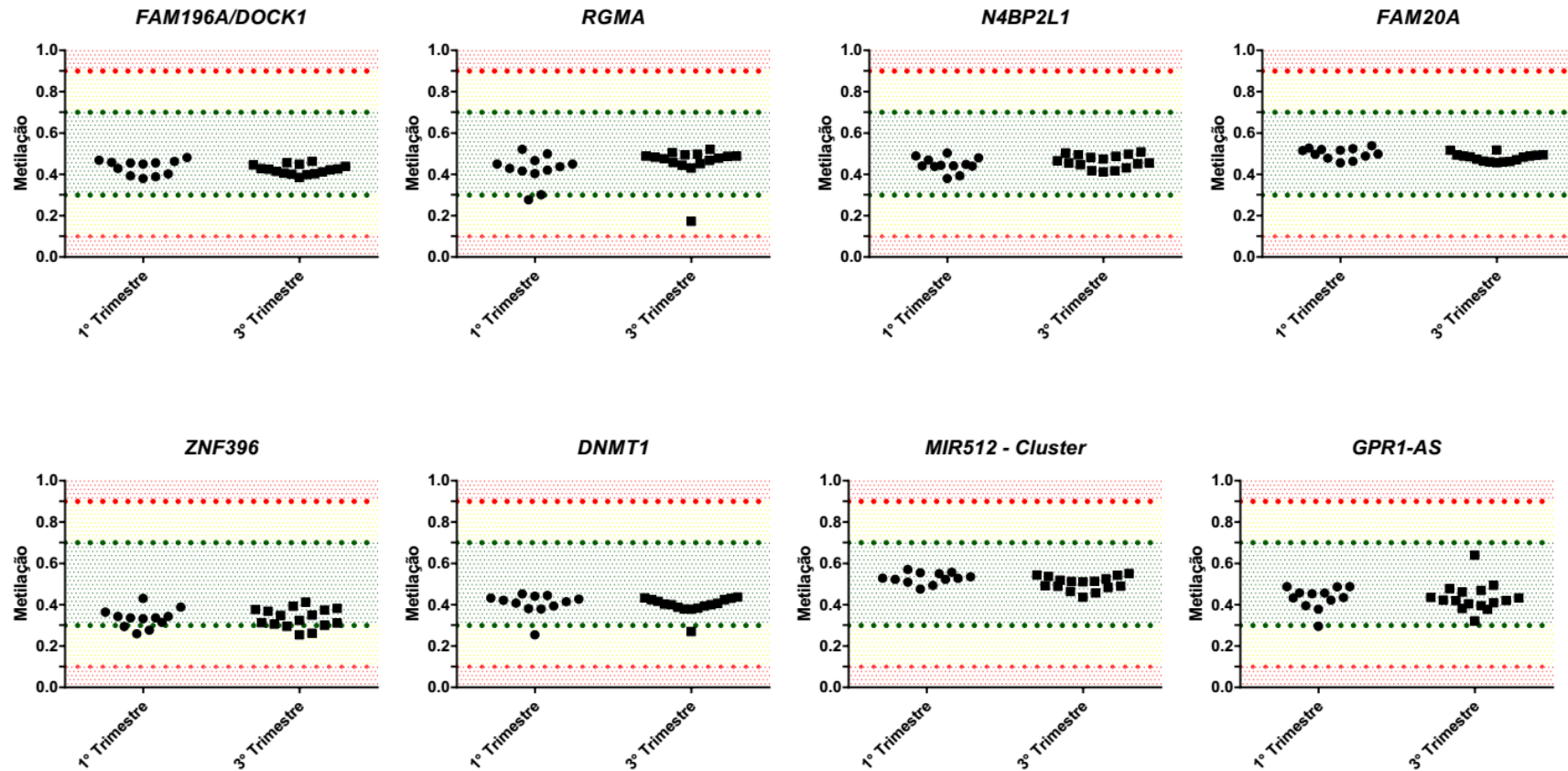


Figura 13. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias específicas da placenta sabidamente imprintadas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta, PL27 – 57 representa um grupo de placentas onde não se sabe a idade exata. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os oito genes não apresentaram presença de polimorfismo de metilação apresentando placentas em sua maioria no intervalo de metilação intermediária.

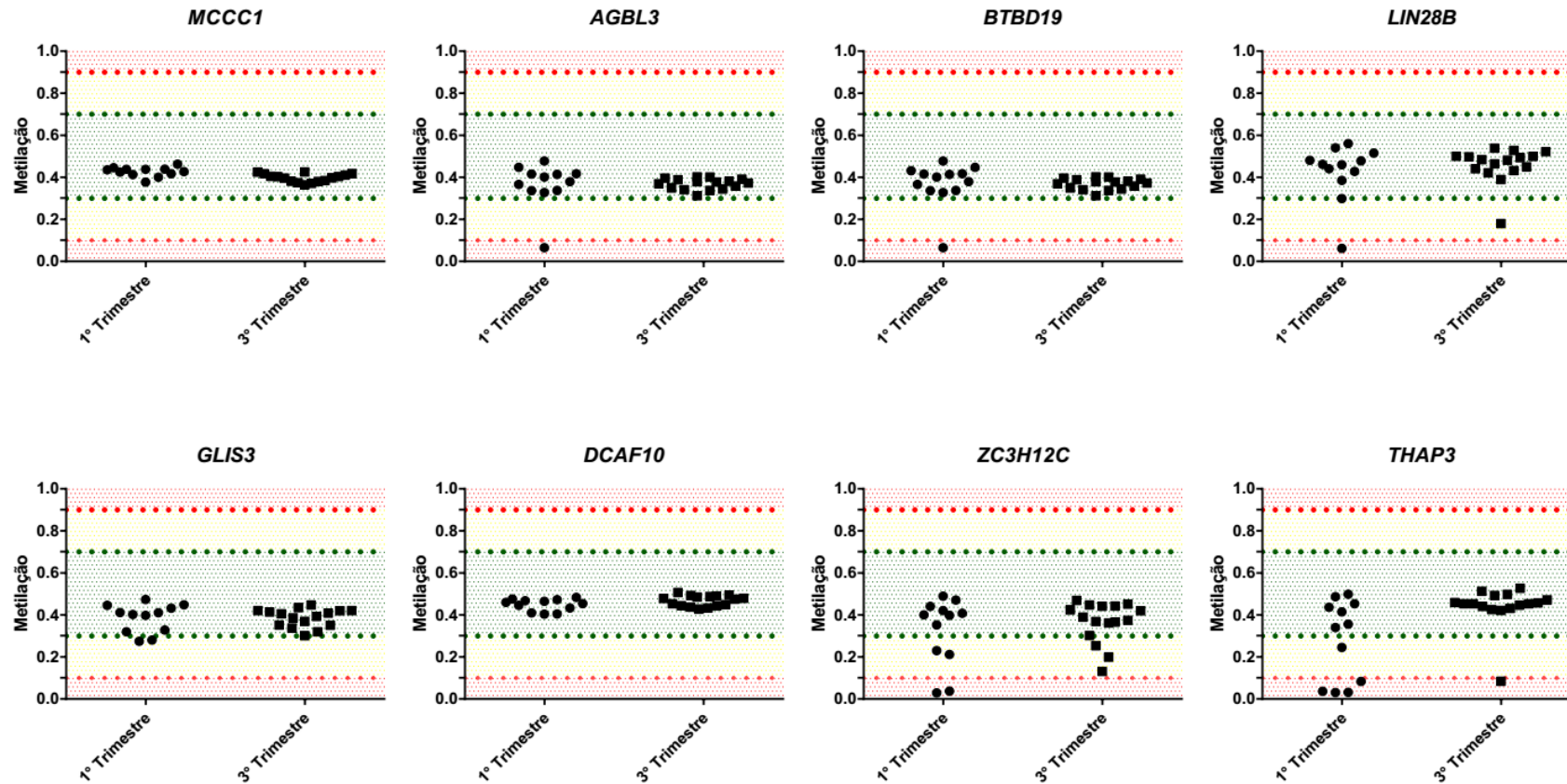


Figura 14. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias específicas da placenta sabidamente imprintadas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta, PL27 – 57 representa um grupo de placentas onde não se sabe a idade exata. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os genes *AGL3*, *BTBD19*, *LIN28B*, *ZC3H12C* e *THAP3* apresentaram polimorfismo de metilação sendo que o gene *THAP3* apresentou a maior taxa de polimorfismo dos cinco genes.

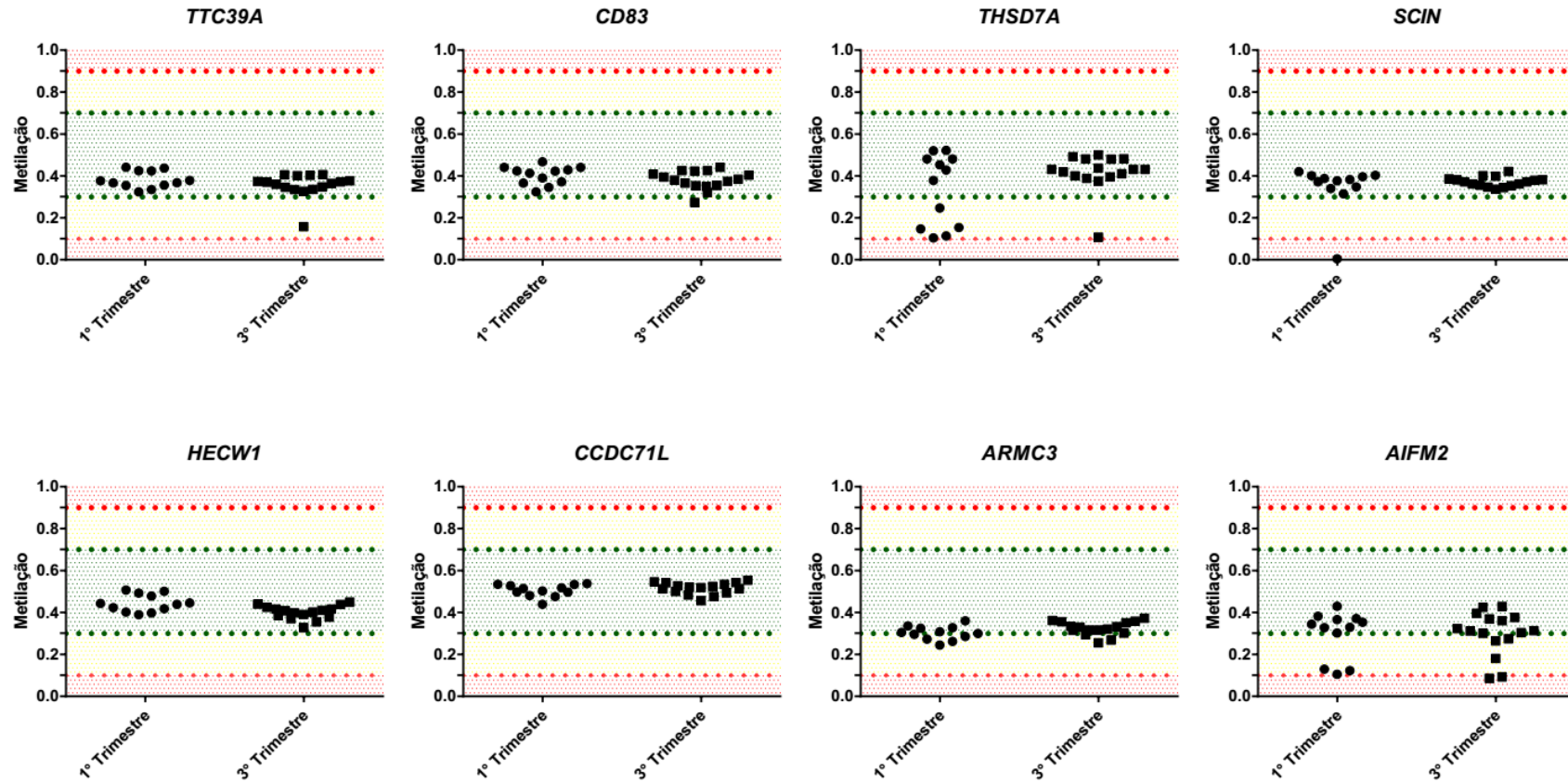


Figura 15. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias específicas da placenta sabidamente imprintadas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta, PL27 – 57 representa um grupo de placentas onde não se sabe a idade exata. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os genes *SCIN* e *AIFM2* apresentaram polimorfismo de metilação com o gene *THSD7A* apresentou amostras no ponto de quebra entre hemimetilação perturbada e polimorfismo.

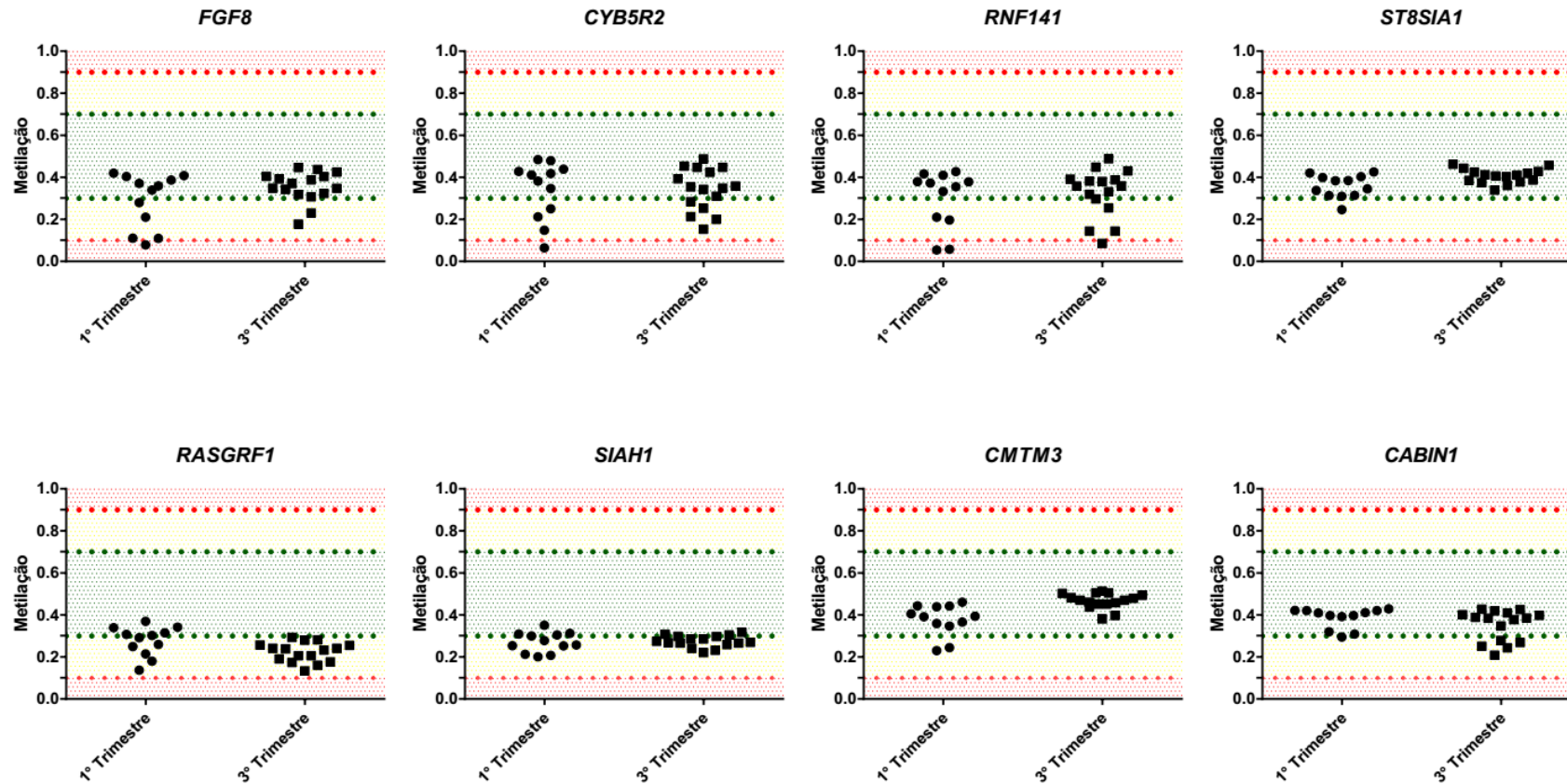


Figura 16. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias específicas da placenta sabidamente imprintadas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta, PL27 – 57 representa um grupo de placentas onde não se sabe a idade exata. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). OS genes *RNF141* e *FGF8* apresentaram evidência de polimorfismo de metilação dentro as amostras placentárias utilizadas.

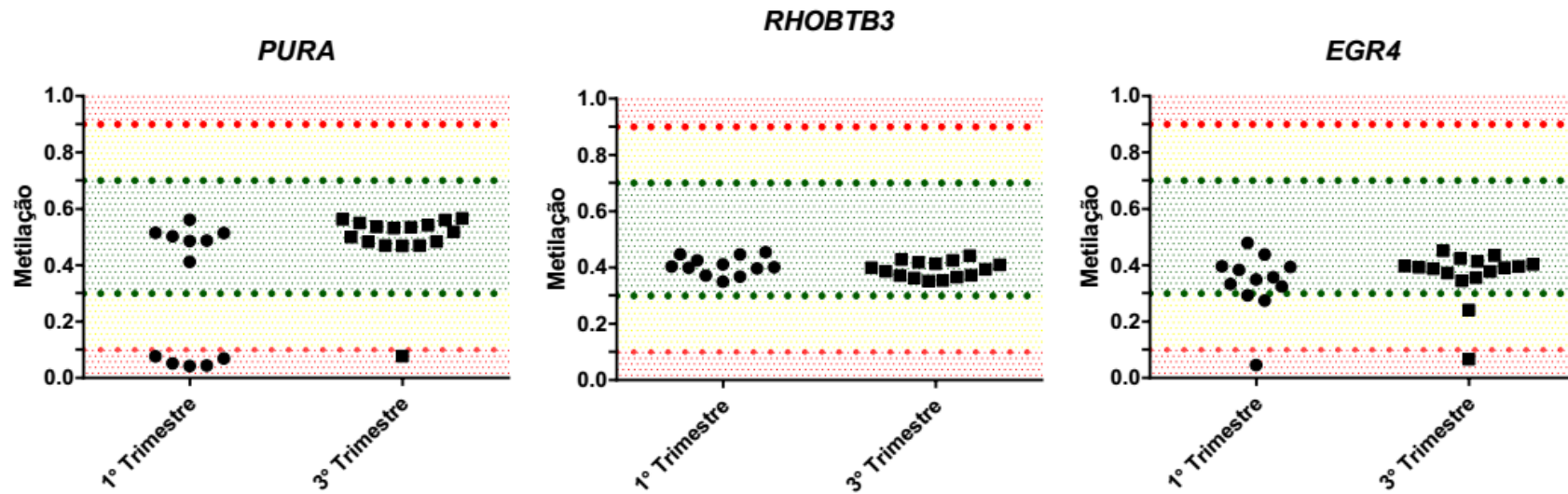


Figura 17. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias específicas da placenta sabidamente imprintadas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em três genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta, PL27 – 57 representa um grupo de placentas onde não se sabe a idade exata. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os genes *PURA* e *EGR4* apresentaram evidência de polimorfismo de metilação dentro as amostras placentárias utilizadas enquanto o gene *RHOBTB3* apresentou ausência de evidência de polimorfismo.

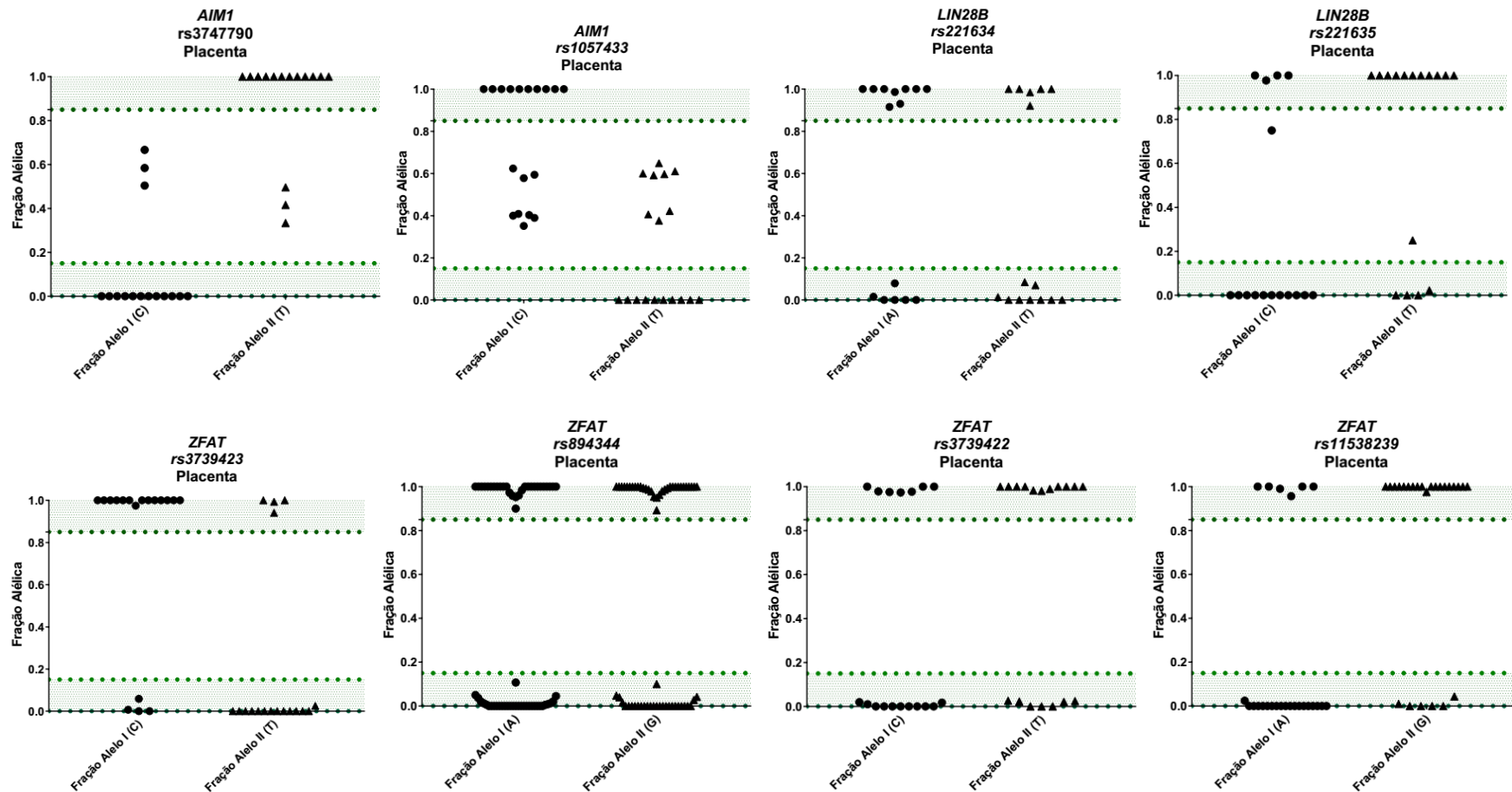


Figura 18. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula “READS ALELO I/ READS TOTAIS” para a fração alélica I e “READS ALELO II/READS TOTAIS” para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condiscentes como expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condiscentes como bialélico. O gene *AIM1* demonstrou evidência de expressão bialélica para os SNPs rs3747790 e rs1057433 em amostras de transcriptoma de placenta enquanto os SNPs restantes apresentaram expressão condiscente como monoalélica em amostras de placenta.

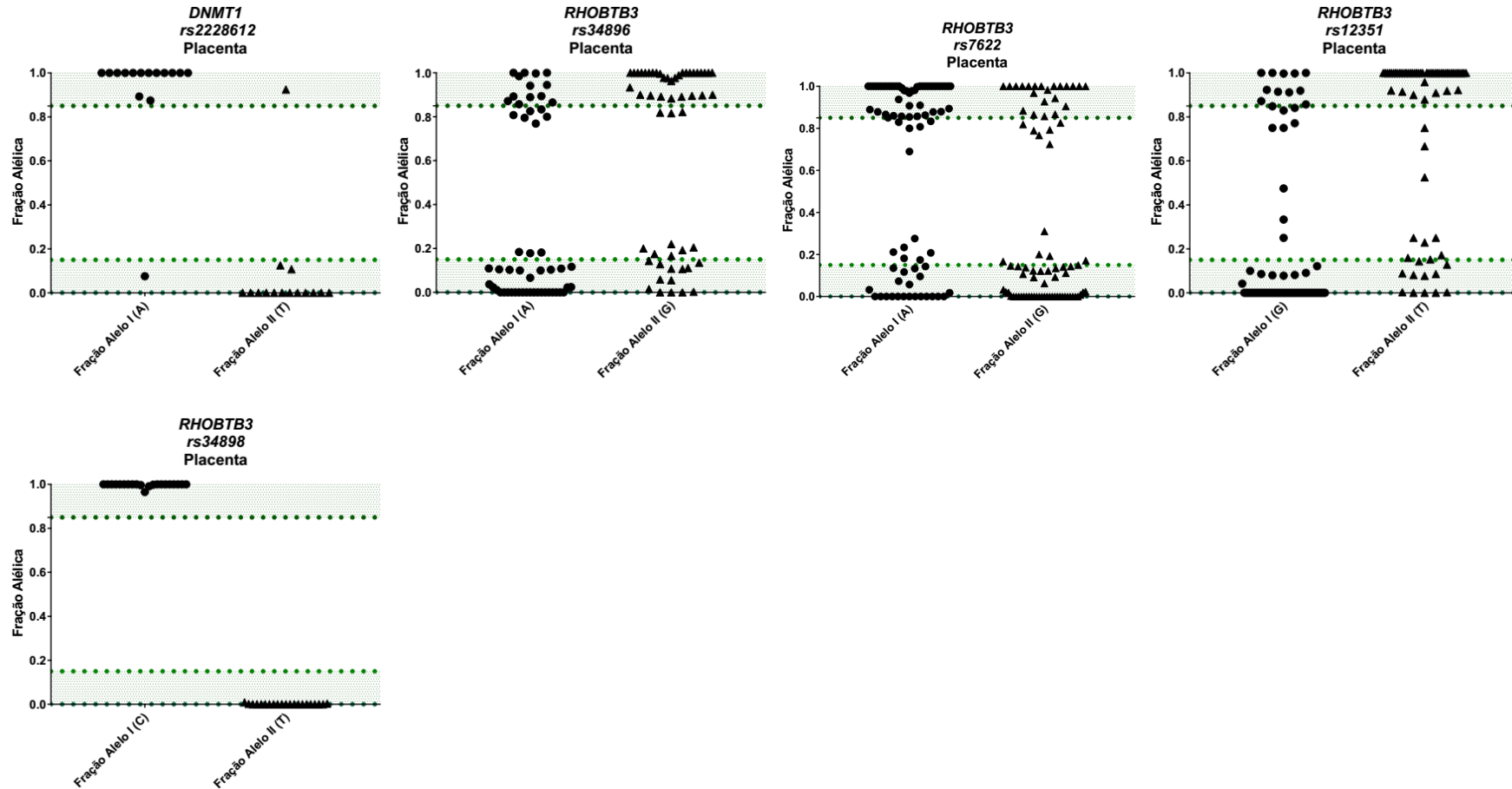


Figura 19. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula “READS ALELO I/ READS TOTAIS” para a fração alélica I e “READS ALELO II/READS TOTAIS” para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condiscentes como expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condiscentes como bialélico. O gene *RHOBTB3* demonstrou evidência de expressão bialélica para os SNPs rs34896, rs7622 e rs12351 em amostras de transcriptoma de placenta enquanto o SNP rs2228612 presente no gene *DNMT1* apresentou evidência de expressão monoalélica enquanto o SNP rs34898 presente no gene *RHOBTB3* apresentou evidência de expressão monoalélica sem flip para amostras placentarias.

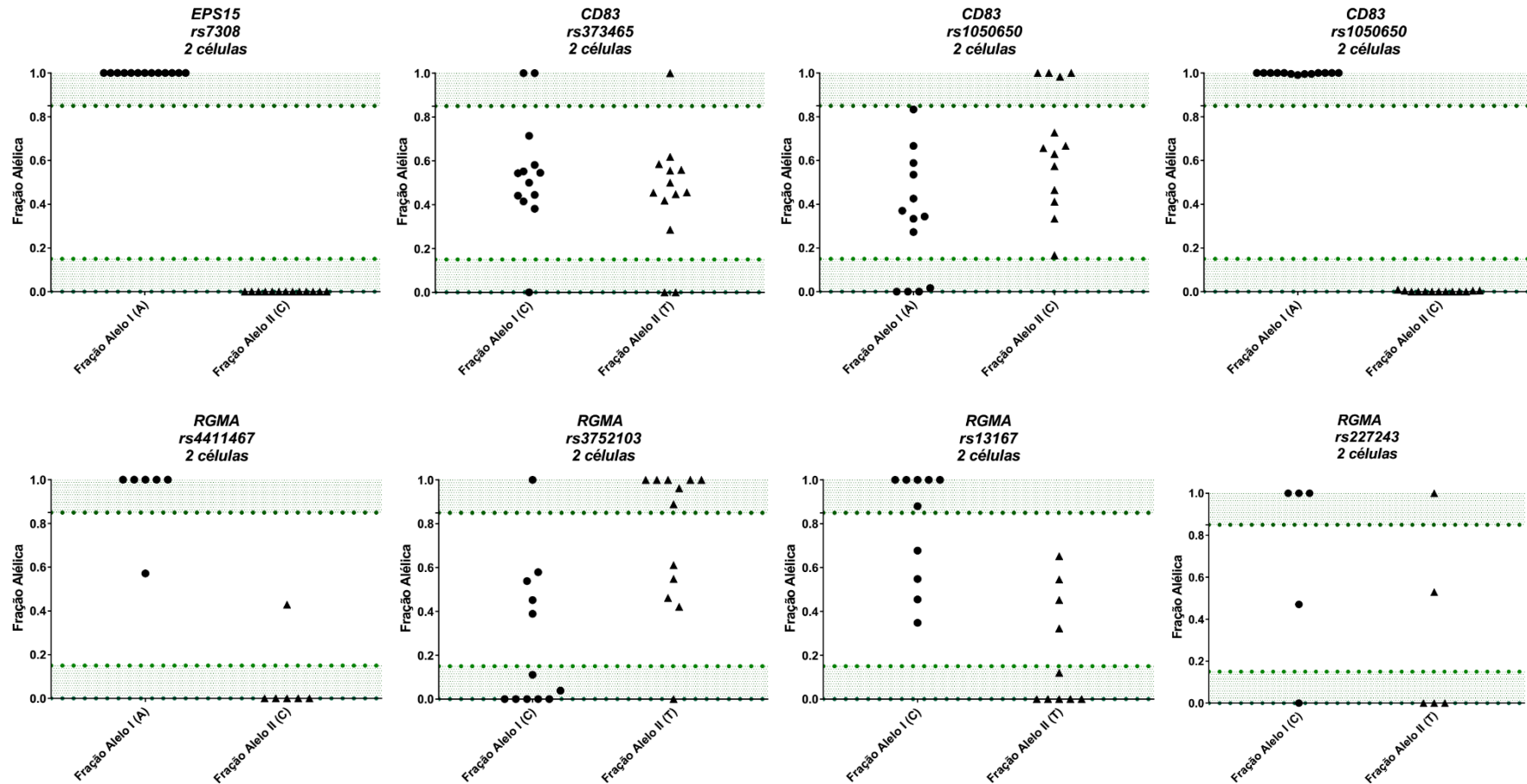


Figura 20. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula "READS ALELO I/ READS TOTAIS" para a fração alélica I e "READS ALELO II/READS TOTAIS" para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condizentes com expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condizentes com expressão bialélica. O gene *CD83* demonstrou evidência de expressão bialélica para os SNPs rs373465 e rs1050650 e em amostras de transcriptoma de 2 células, o gene *RGMA* demonstrou evidência de expressão bialélica para os SNPs rs4411467, rs3752103, rs13167 e rs227243 para amostras de transcriptoma de 2 células. O SNP rs1050650 presente no gene *CD83* apresentou evidência de expressão monoalélica sem flip.

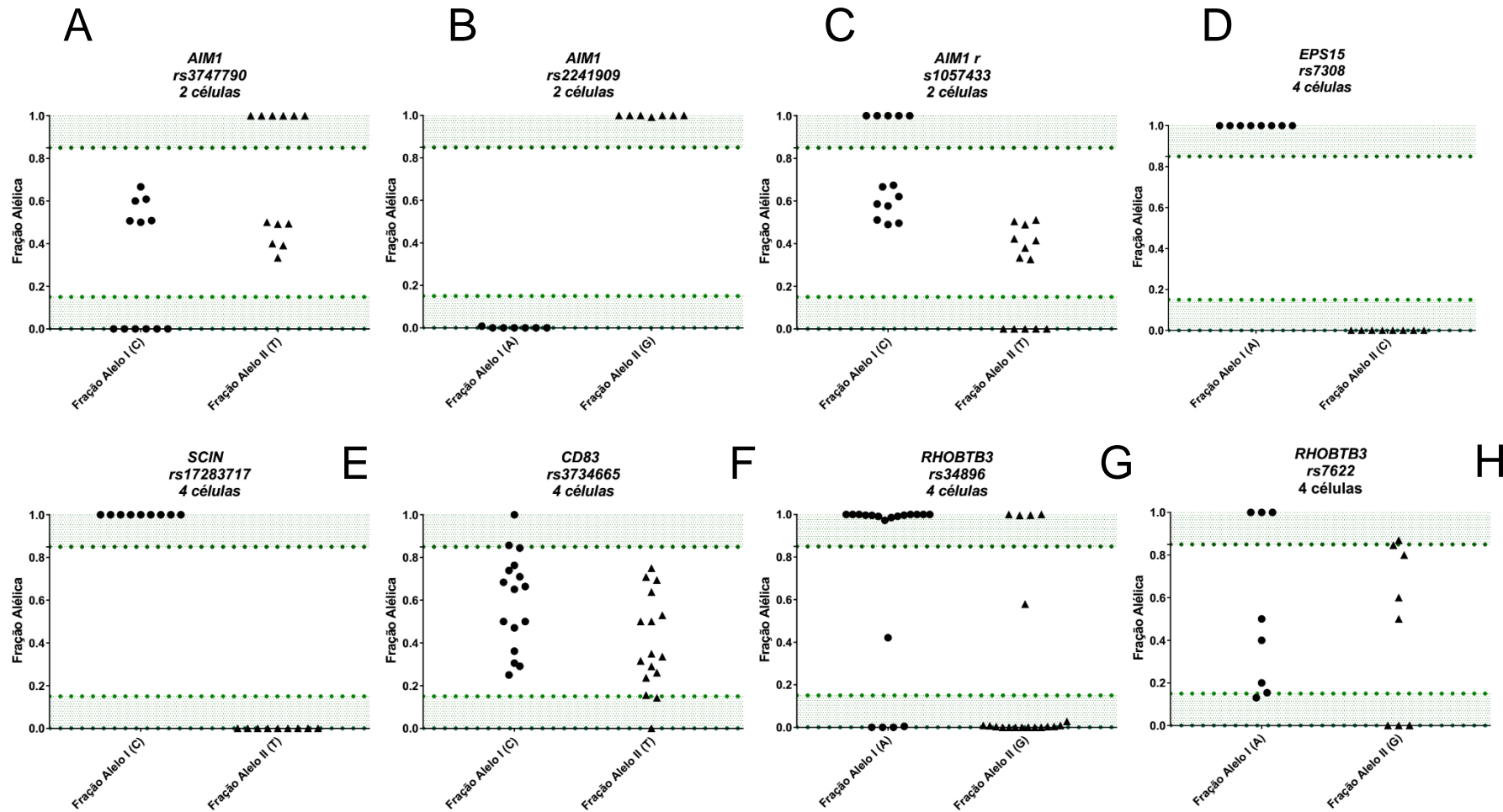


Figura 21. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula "READS ALELO I/ READS TOTAIS" para a fração alélica I e "READS ALELO II/READS TOTAIS" para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condizentes com expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condizentes com expressão bialélica. Em A, B, C se encontram análises referentes a transcriptomas de 2 células, enquanto para D, E, F, G e H se encontram análises referentes a transcriptomas de 4 células. O gene *AIM1* demonstrou evidência de expressão bialélica para os SNPs rs3747790 e rs1057433 em amostras de transcriptoma de 2 células, o gene *RHOBTB3* demonstrou evidência de

expressão bialélica para os SNPs rs3734665, rs34896 para amostras de transcriptoma de 4 células, enquanto o SNP rs3734665 presente no gene *CD83* houve evidência de expressão bialélica para estudos de transcriptoma de 4 células.

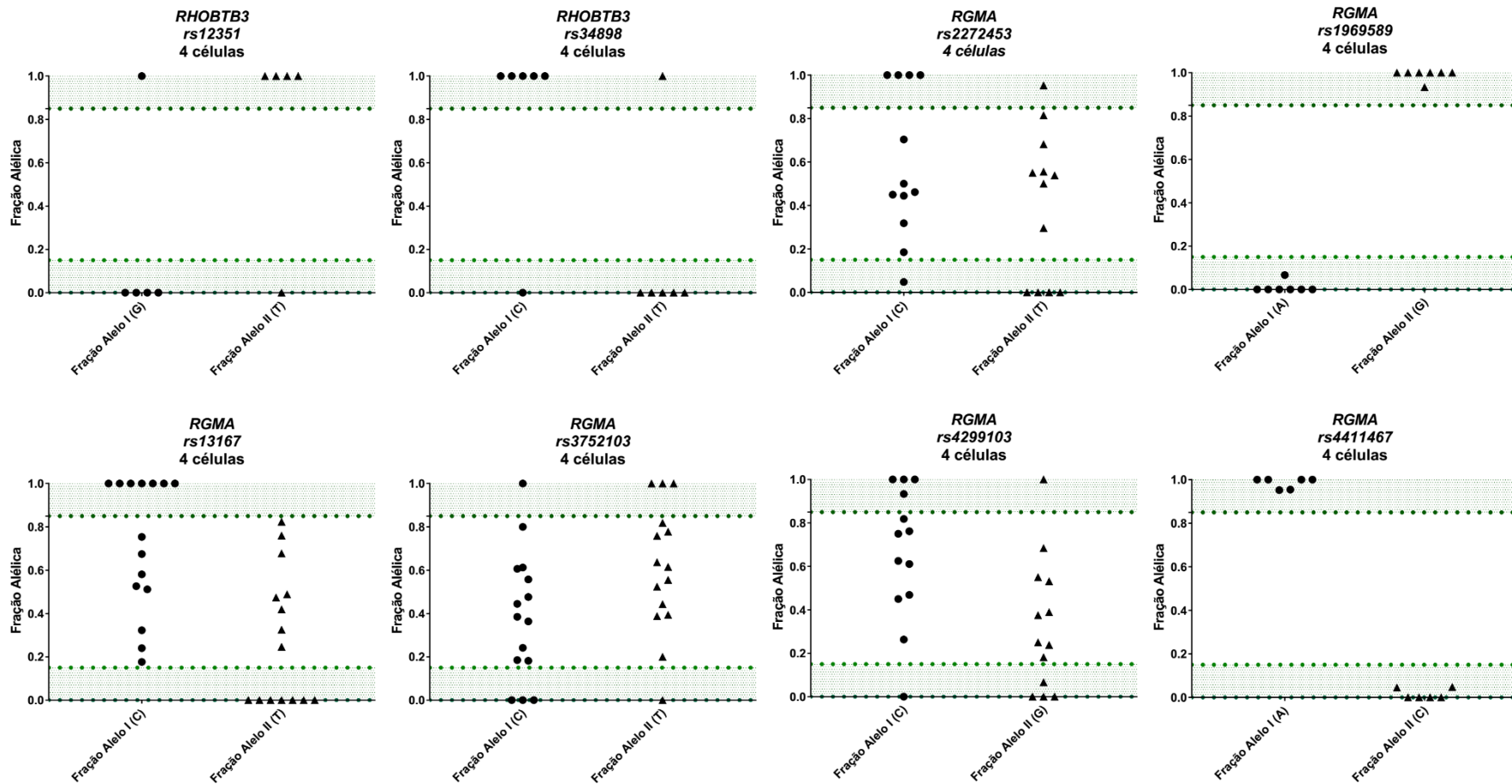


Figura 22. Frações alélicas de genes controladamente imprintados.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y e a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula "READS ALELO I/ READS TOTAIS" para a fração alélica I e "READS ALELO II/READS TOTAIS" para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condizentes com expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condizentes com expressão bialélica. O gene *RGMA* demonstrou evidência de expressão bialélica para os SNPs rs2272453, rs13167, rs3752103, rs4299103 para estudos de transcriptoma de 4 células.

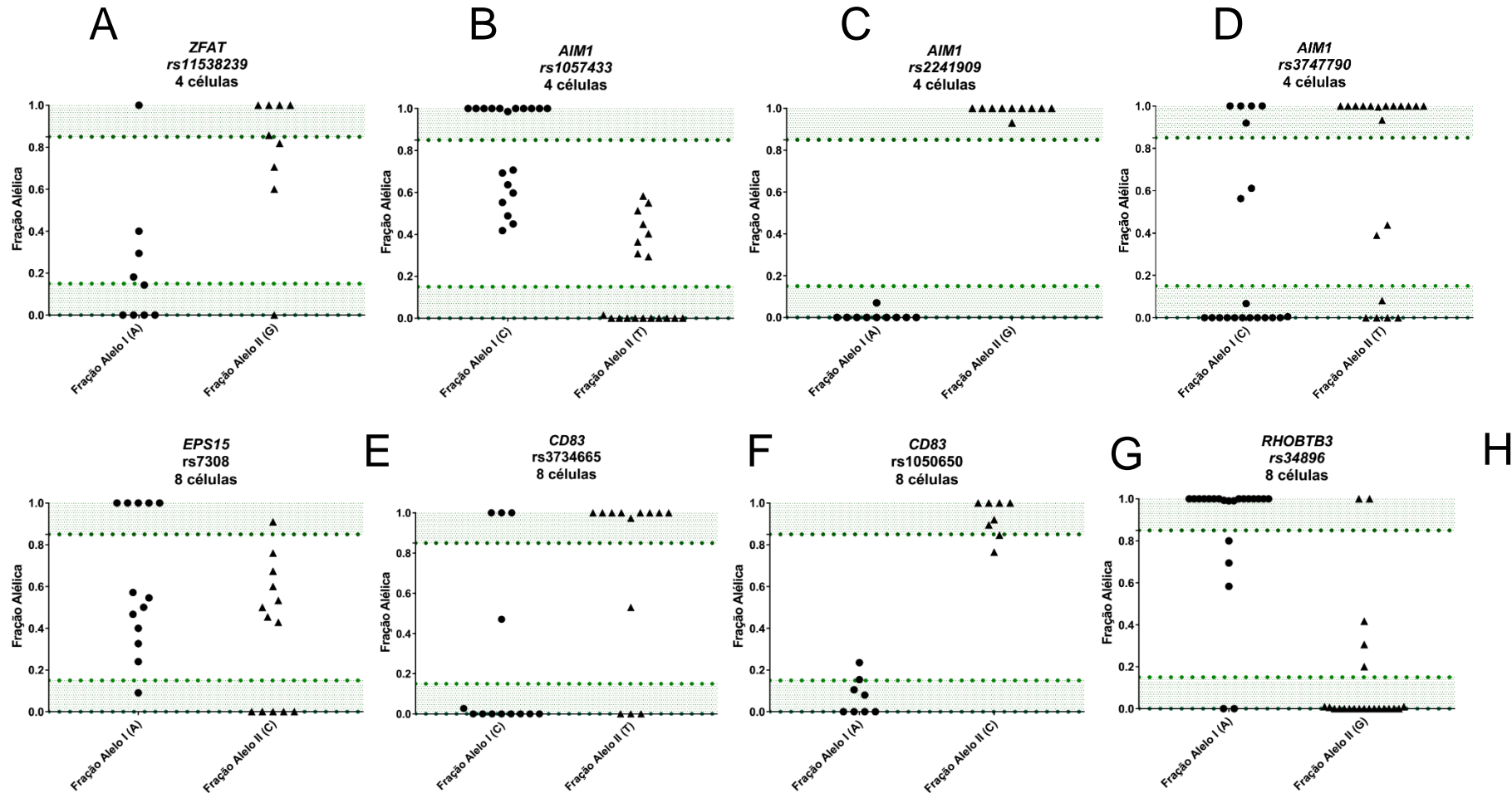


Figura 23. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula “READS ALELO I/ READS TOTAIS” para a fração alélica I e “READS ALELO II/READS TOTAIS” para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condiscentes como expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condiscentes como bialélico. Em **A, B, C, D** se encontram análises referentes a transcriptomas de 4 células, enquanto para **E, F, G e H** se encontram análises referentes a transcriptomas de 8 células. O gene *AIM1* demonstrou evidência de expressão bialélica para os SNPs rs1057433, rs3747790 em estudos de transcriptoma de 4 células, enquanto o SNP rs11538239 apresentou evidências de expressão bialélica em estudos de 4 células. O gene *CD83* apresentou evidências de expressão bialélica nos SNPs rs3734665 e rs1050650 em estudos de transcriptoma de 8 células enquanto SNP rs34896 presente no gene *RHOBTB3* apresentou evidência de expressão bialélica em 8 células.

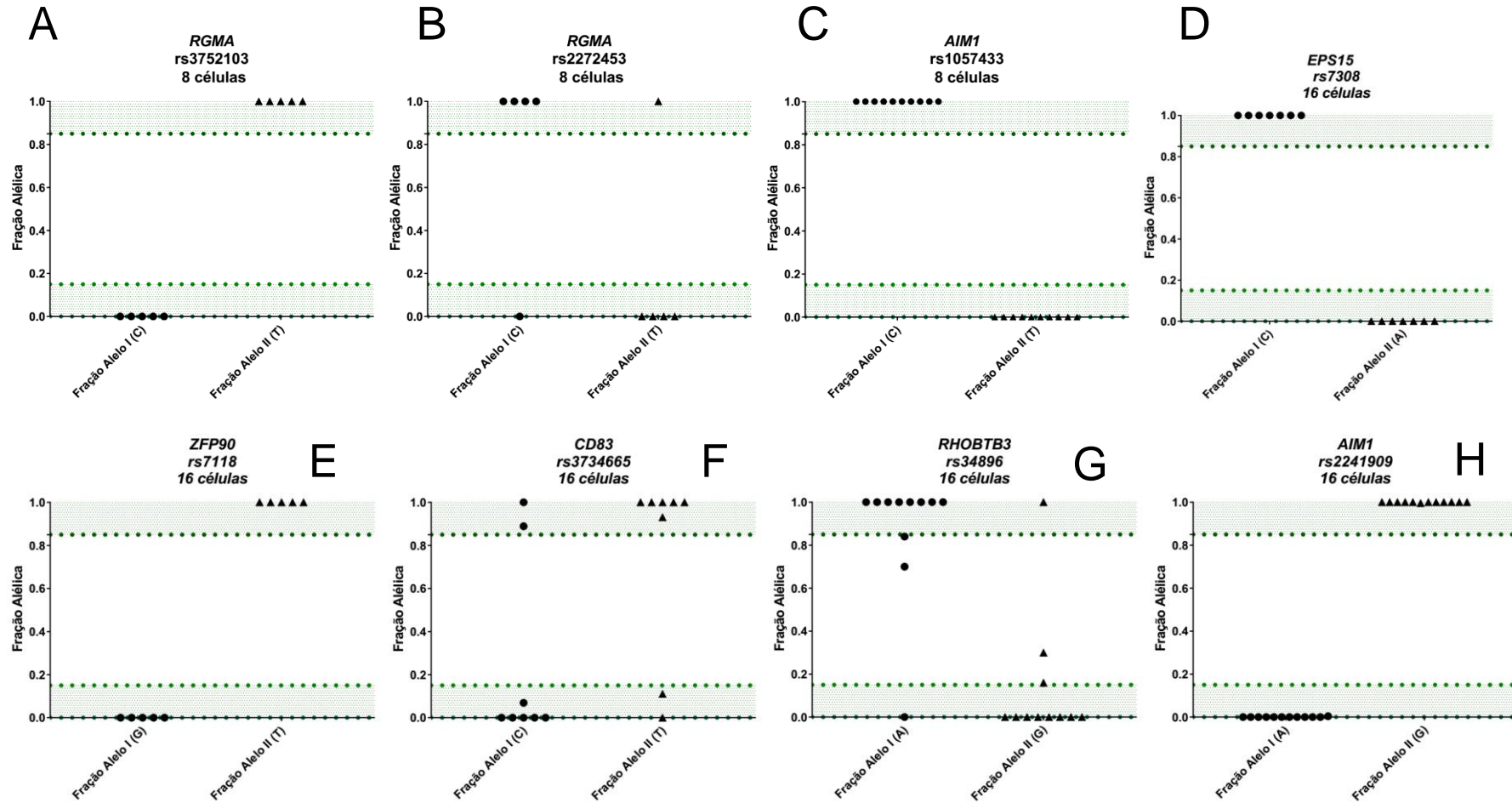


Figura 24. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula "READS ALELO I/ READS TOTAIS" para a fração alélica I e "READS ALELO II/READS TOTAIS" para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condiscentes como expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condiscentes como bialélico. Em A, B, C, se encontram análises referentes a transcriptomas de 8 células, enquanto para D, E, F, G e H se encontram análises referentes a transcriptomas de 16 células. O gene *AIM1* demonstrou evidência de expressão bialélica para os SNPs rs1057433, rs3747790 em estudos de transcriptoma de 4 células, enquanto o SNP rs11538239 apresentou evidências de expressão bialélica em estudos de 4 células. O gene *RHOBTB3* apresentou evidências de expressão bialélica no SNPrs34896 em estudos de transcriptoma de 16 células enquanto SNP rs3734665 presente no gene *CD83* apresentou evidência de expressão monoalélica em 16 células.

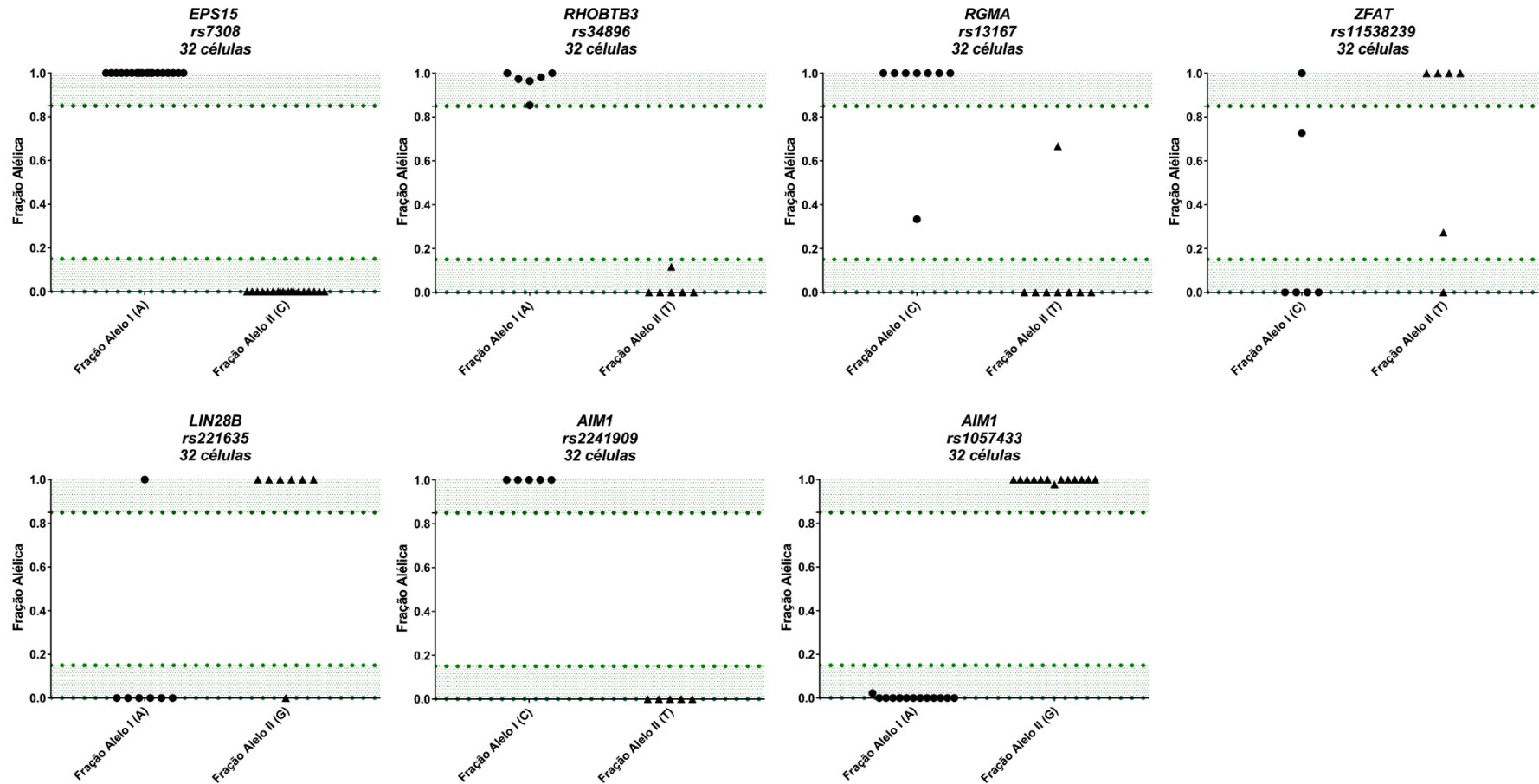


Figura 25. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula "READS ALELO I/ READS TOTAIS" para a fração alélica I e "READS ALELO II/READS TOTAIS" para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condizentes como expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condizente como bialélico. O gene *RGMA* demonstrou evidência de expressão bialélica para o SNP rs34896 em estudos de transcritoma de 32 células, enquanto os SNPs rs13167 e rs11538239 presentes respectivamente nos genes *RGMA* e *ZFAT* apresentaram evidência de expressão bialélica em estudos de 32 células.

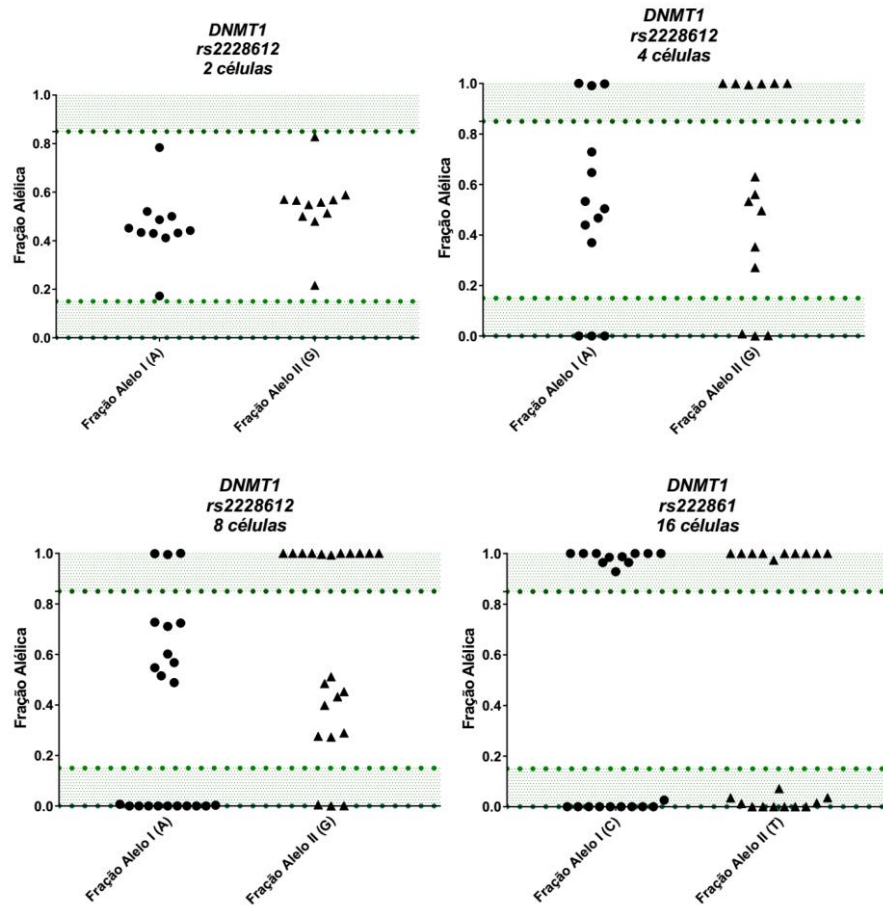


Figura 26. Frações alélicas de genes controle sabidamente imprintados.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula "READS ALELO I/ READS TOTAIS" para a fração alélica I e "READS ALELO II/READS TOTAIS" para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condizentes com expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condizentes com expressão bialélica. O gene *DNMT1* demonstrou evidência de expressão bialélica para o SNP rs2228612 em estudos de transacriptoma de 2 células, 4 células, 8 células enquanto o SNP rs222861 presente no gene *DNMT1* demonstrou evidência de expressão monoalélica em amostras de 16 células.

iDMRs primárias candidatas

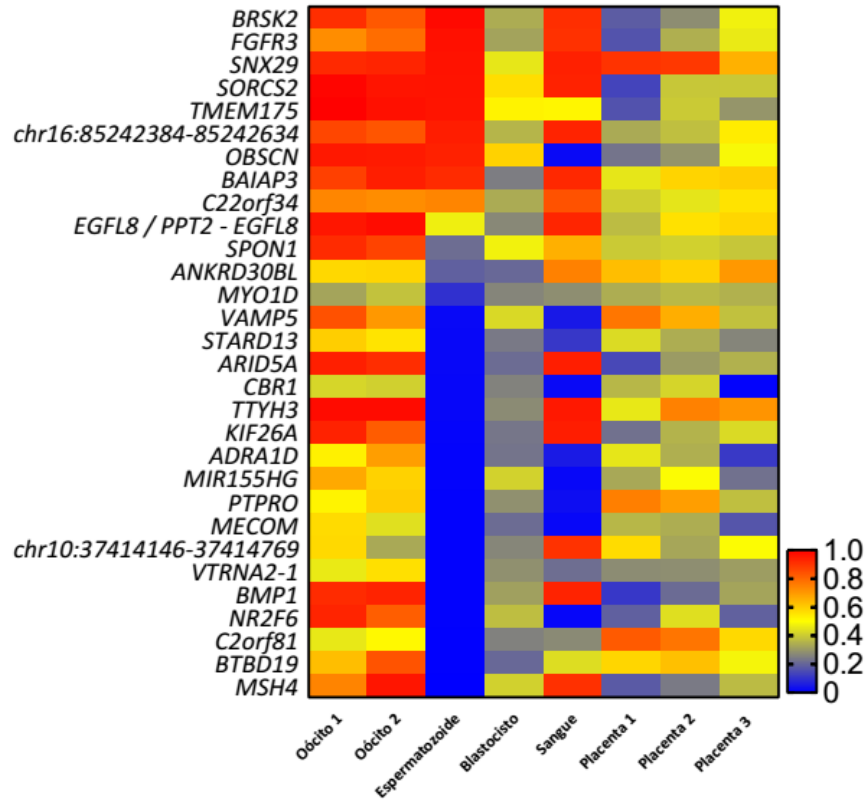


Figura 27. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs candidatas primárias encontradas pelo algoritmo.

No eixo X na parte inferior se encontram os tipos de tecidos utilizados para calcular a média de metilação, no eixo Y a esquerda se encontram os nomes dos genes que apresentam DMRs primárias candidatas encontradas no algoritmo proposto, apresentados em em uma escala de variação entre 0 e 1 sendo 1 a cor vermelha representando perfil hipermetilado, e 0 a cor azul representando o perfil hipometilado. A maioria das DMRs constitutivas encontradas são de origem materna e apresentação metilação no óvulo, ausência de metilação no esperma e domínio de metilação intermediário no blastocisto enquanto as DMRs restantes apresentam novo perfil de DMR primária proposto nesse estudo, sendo ele ausência de assimetria de metilação gámetica e metilação intermediária no blastocisto.

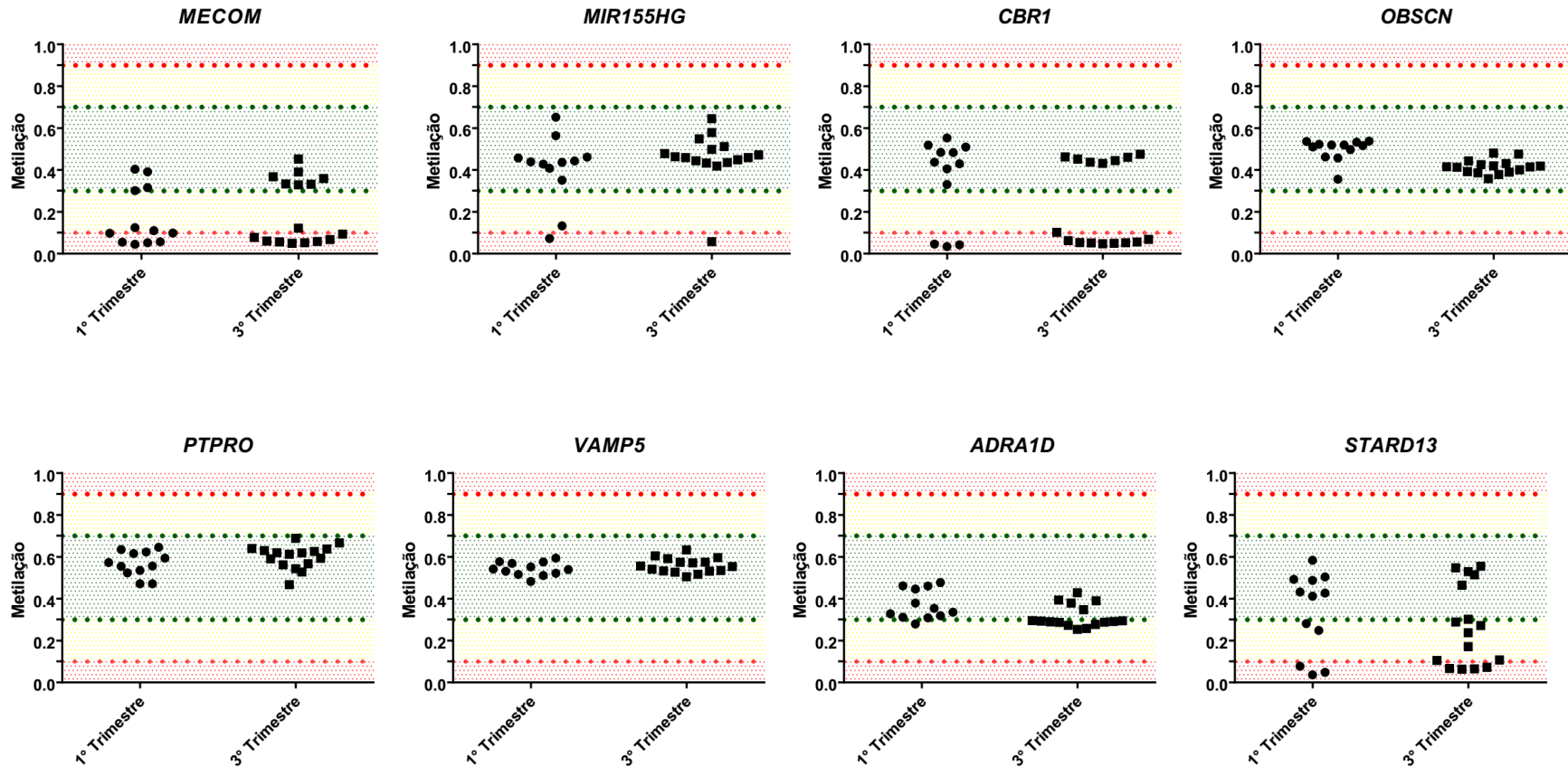


Figura 28. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os genes *MECOM*, *MIR155HG*, *CBR1* e *STARD13* apresentaram evidência de polimorfismo de metilação dentro as amostras placentárias utilizadas enquanto os genes restantes apresentaram ausência de evidência de polimorfismo.

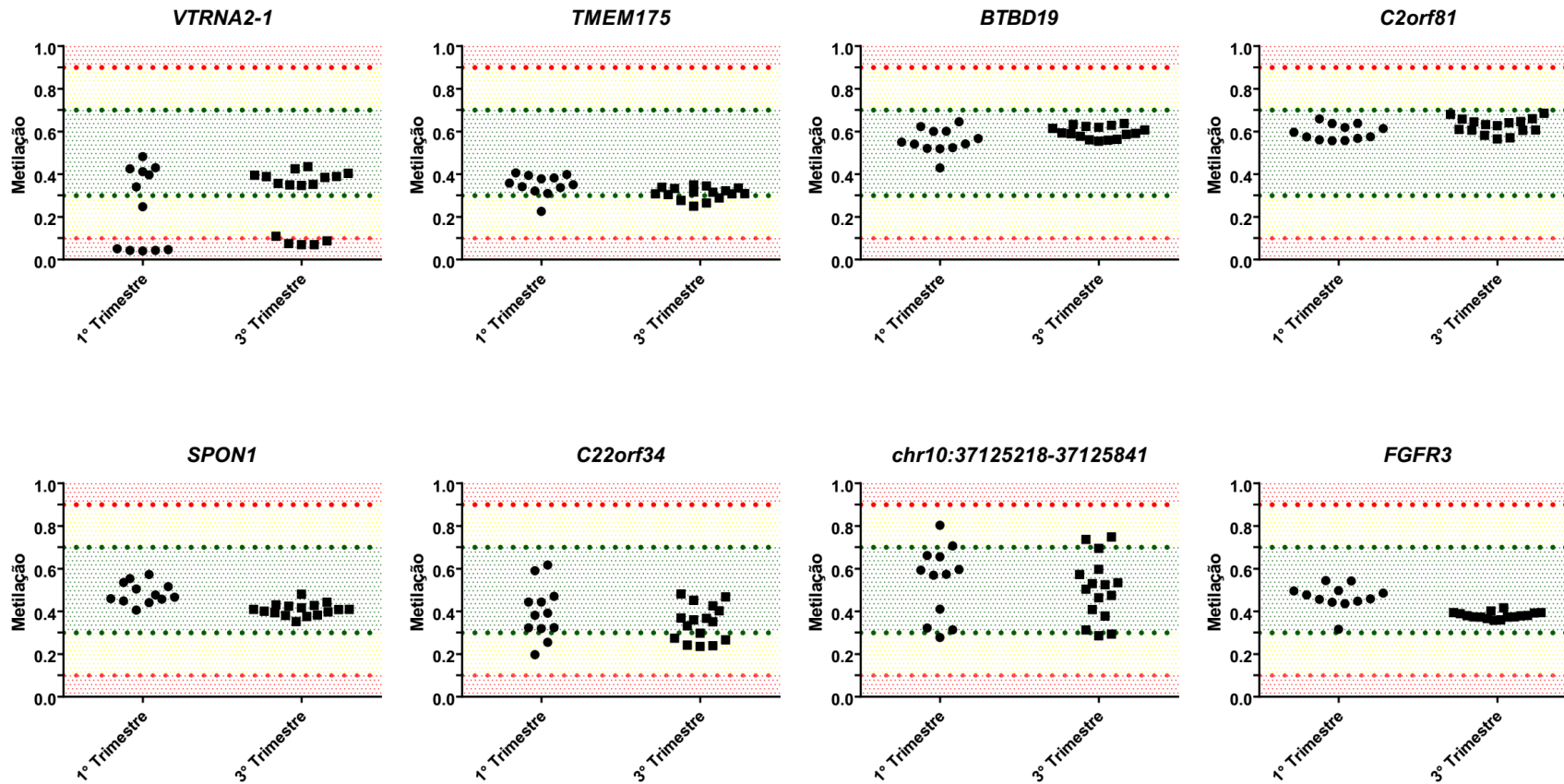


Figura 29. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). O gene *VTRNA2-1* apresentara evidência de polimorfismo de metilação dentro as amostras placentárias utilizadas enquanto os genes restantes apresentaram ausencia de evidência de polimorfismo.

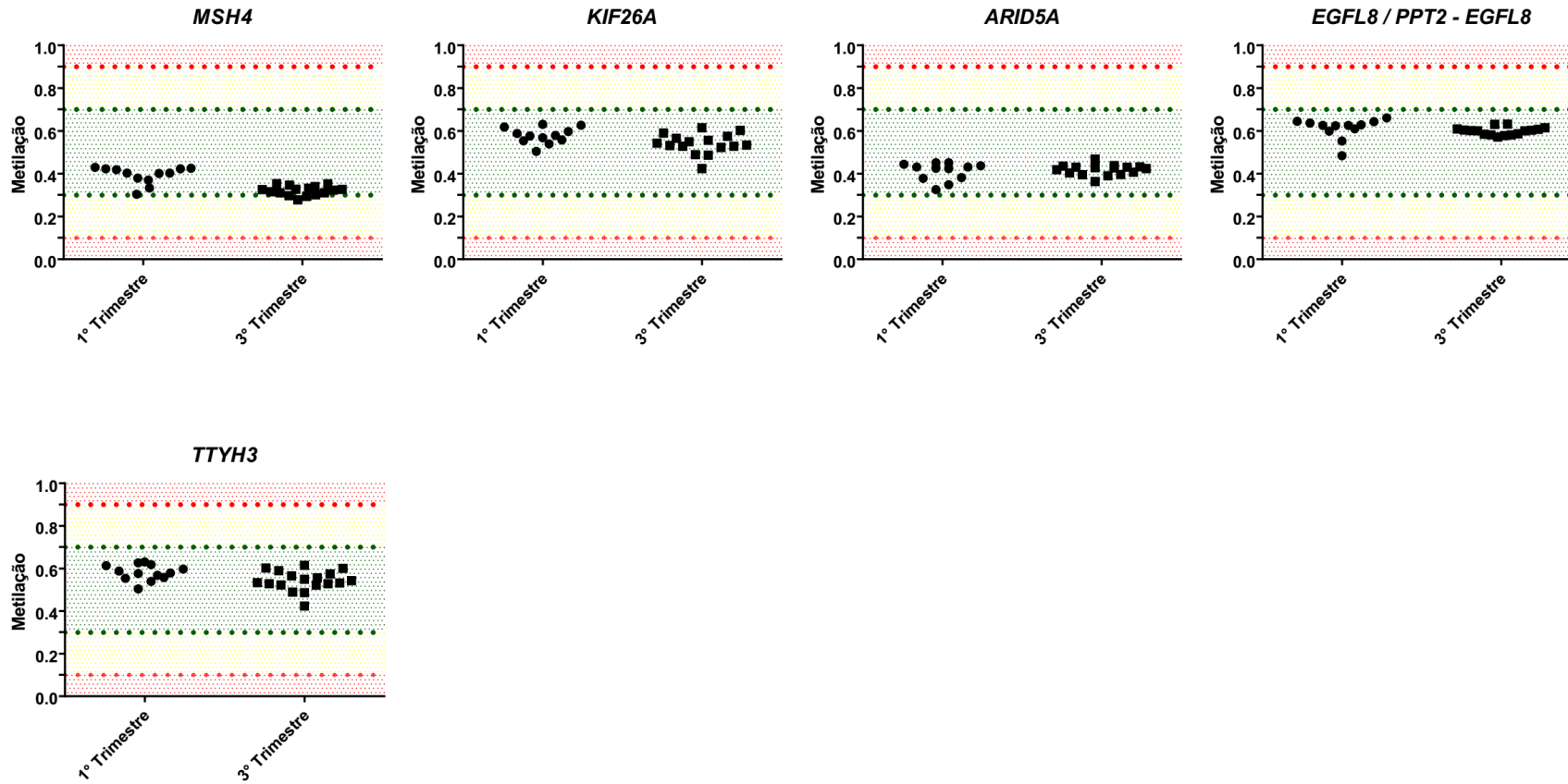


Figura 30. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs primárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em cinco genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os genes estudados não apresentaram evidência de polimorfismo.

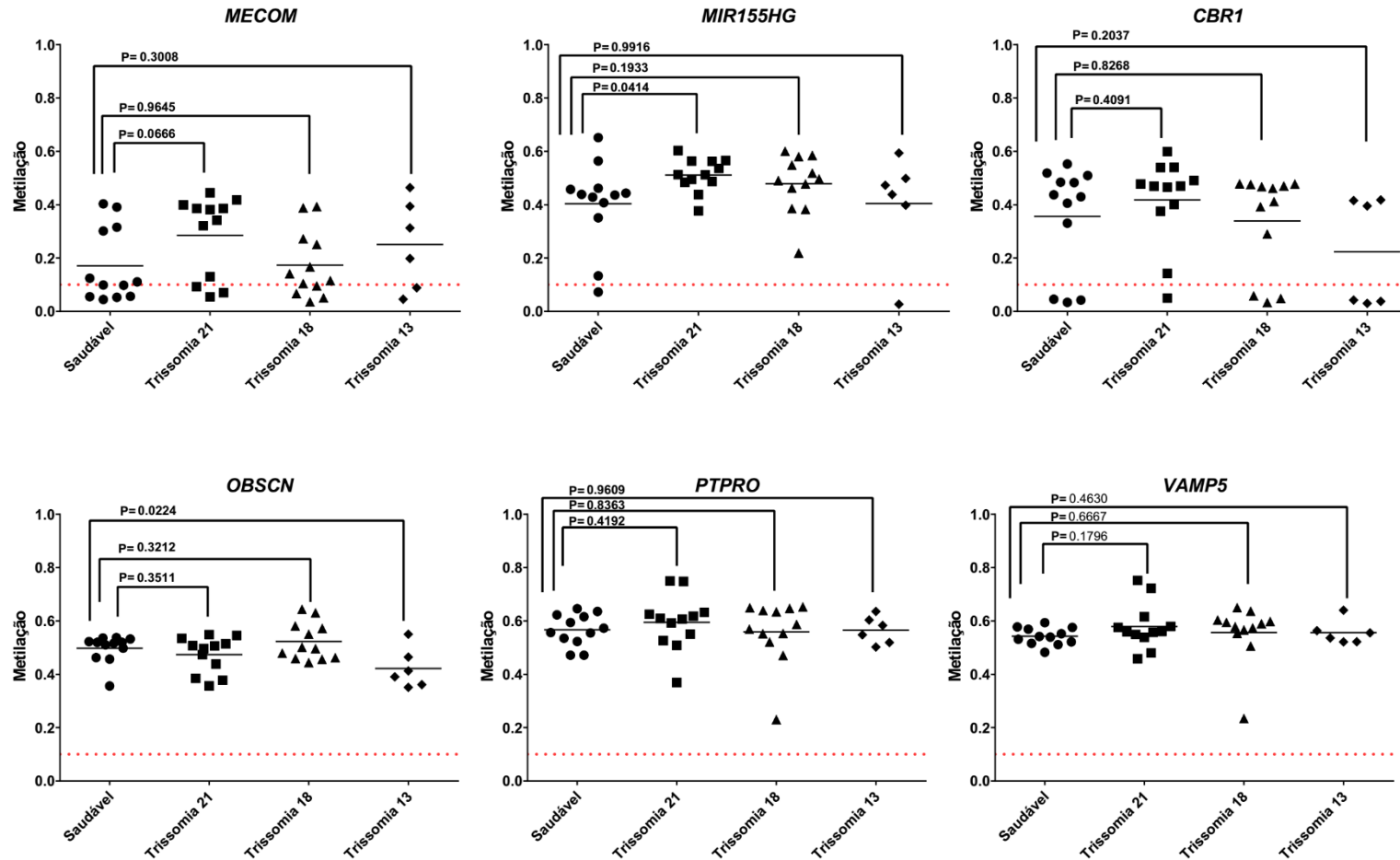


Figura 31. Comparação das DMRs primárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os seis genes estudados não houve DMRs candidatas com diferença estatística entre as amostras saudáveis e trissômicas.

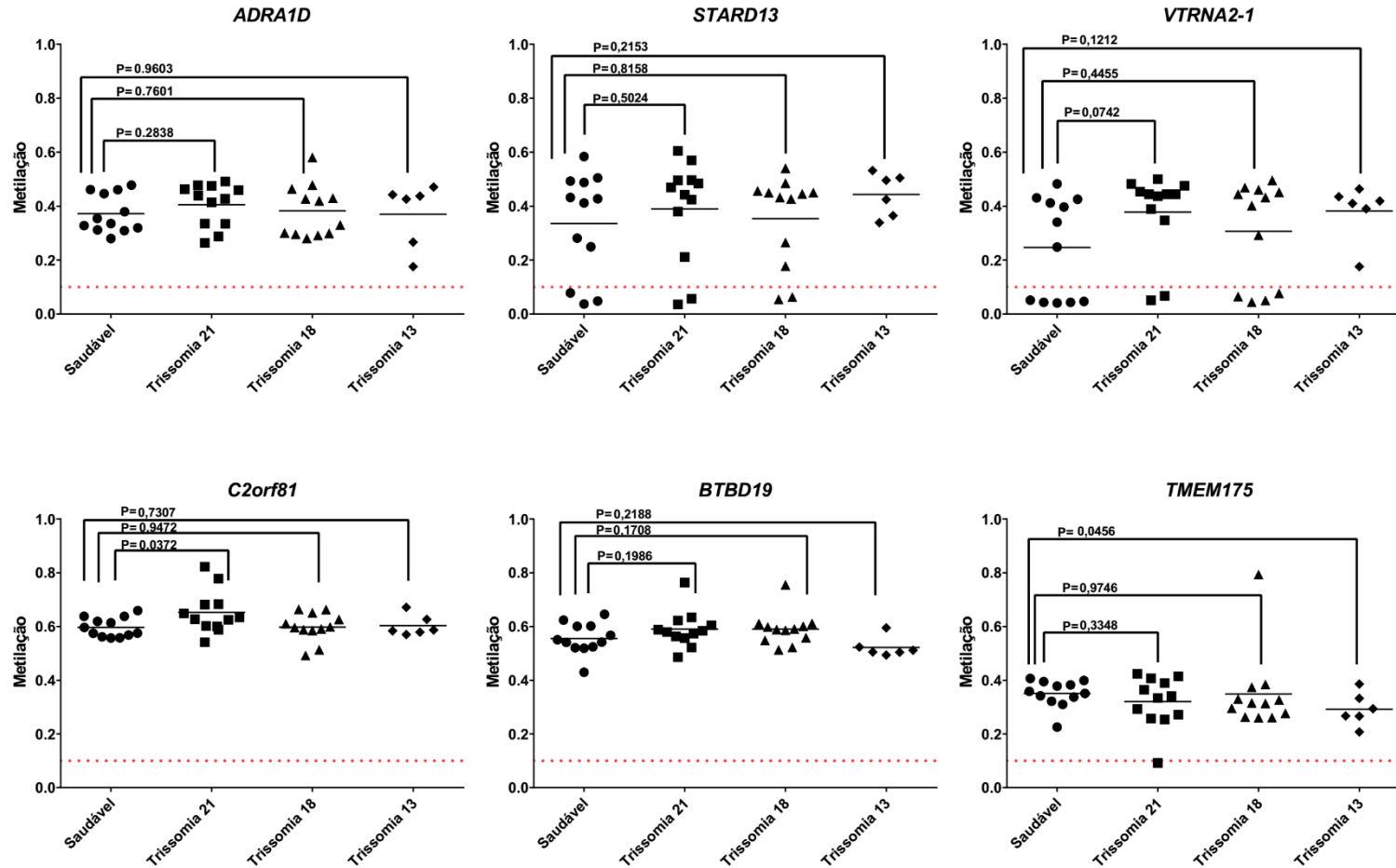


Figura 32. Comparação das DMRs primárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os seis genes estudados quatro não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saudáveis e trissômicas enquanto a DMR presente no gene *TMEM175* apresentou decréscimo de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 13 e a DMR presente no gene *C2orf81* apresentou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 21. .

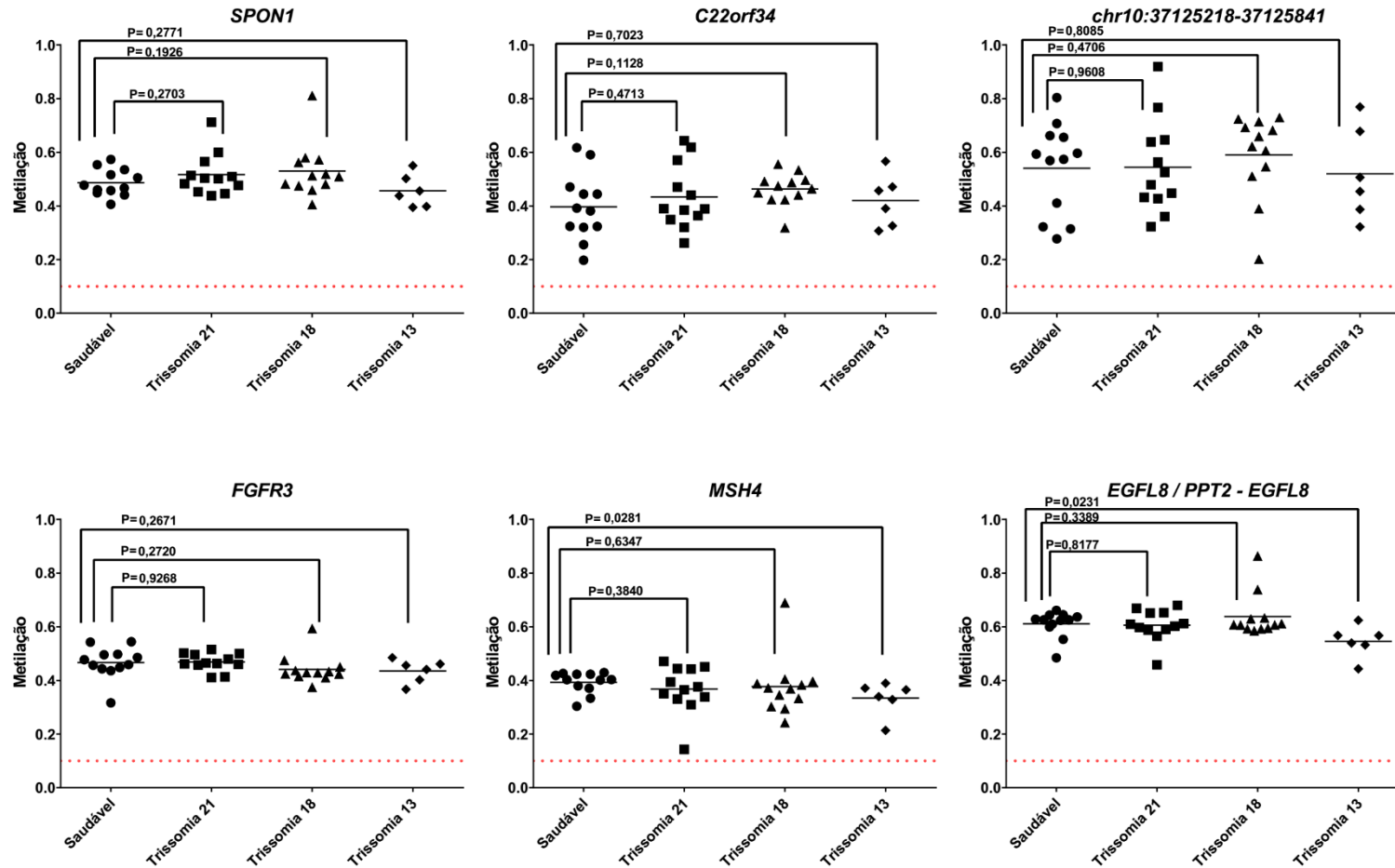


Figura 33. Comparação das DMRs primárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os seis genes estudados cinco não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saudáveis e trissômicas enquanto a DMR presente no gene *MSH4* apresentou decréscimo de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 18.

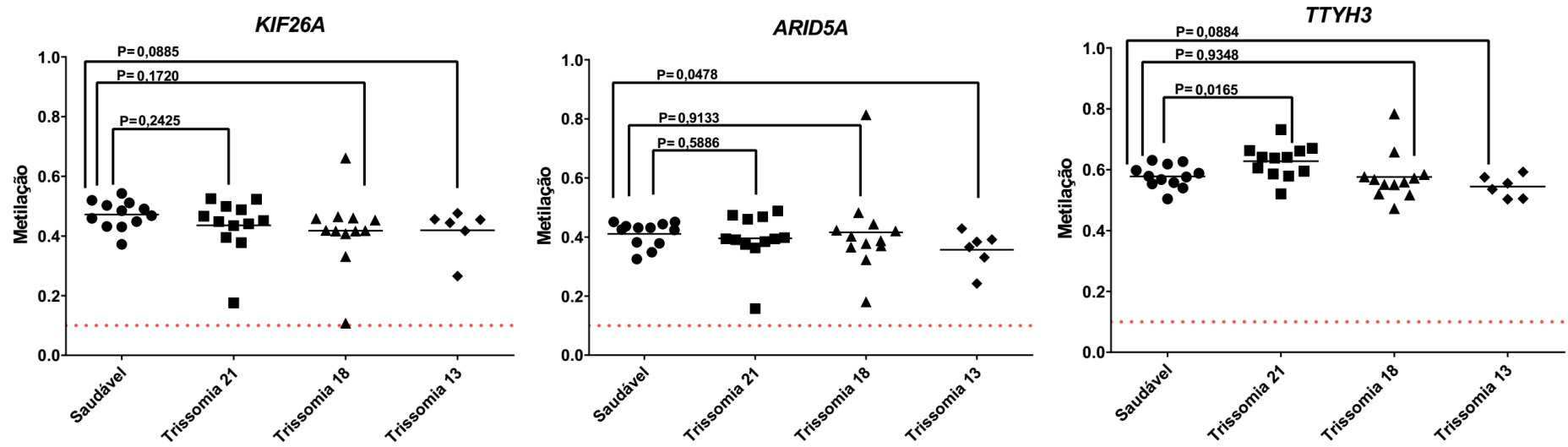


Figura 34. Comparação das DMRs primárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da média dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os seis genes estudados cinco não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saudáveis e trissômicas enquanto a DMR presente no gene *TTYH3* apresentou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 21.

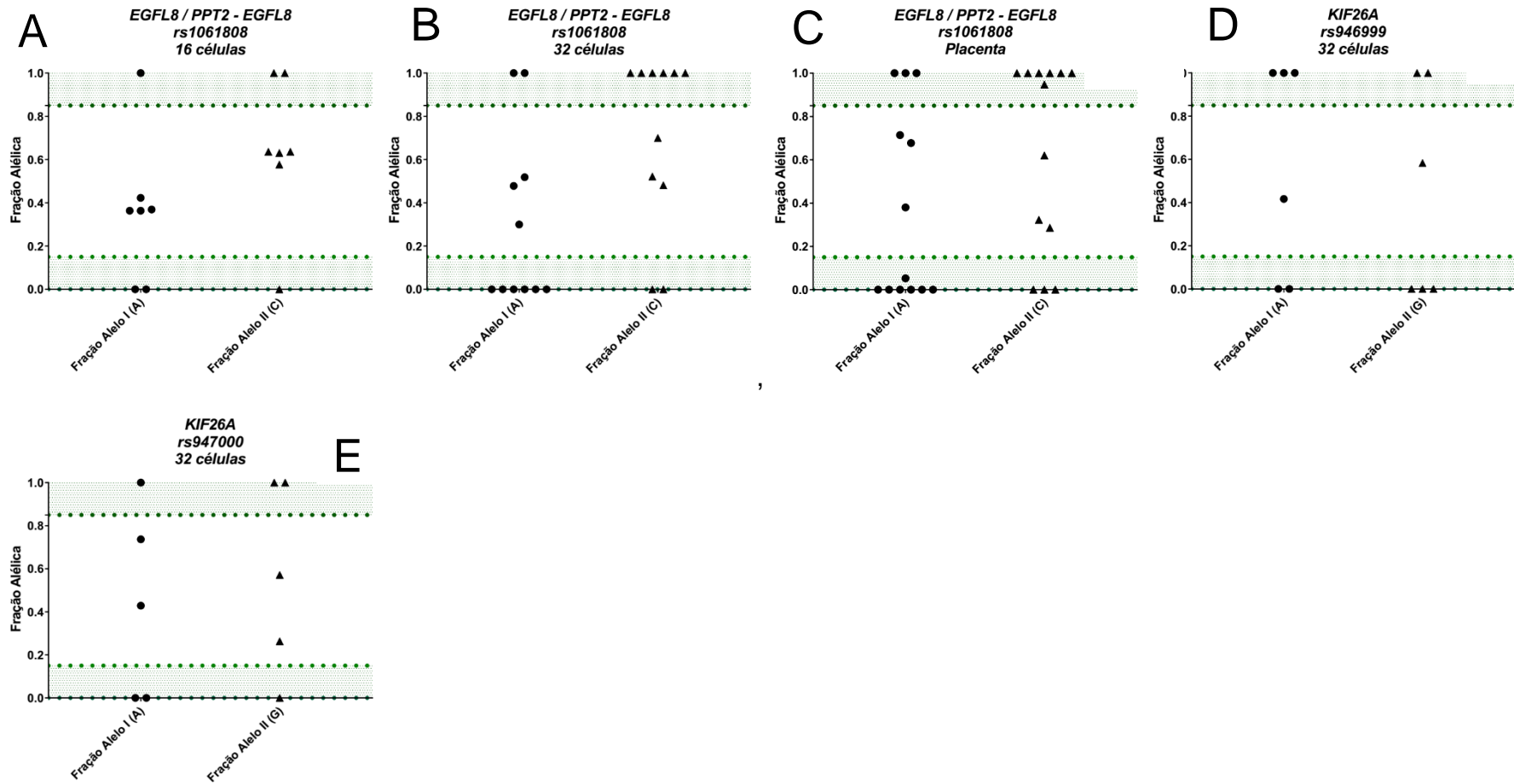


Figura 35. Frações alélicas de genes candidatos ao *imprinting* primário.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula “READS ALELO I/ READS TOTAIS” para a fração alélica I e “READS ALELO II/READS TOTAIS” para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condizentes como expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condizente como bialélico. O gene *EGFL8 / PPT2 - EGFL8* demonstrou evidências de expressão bialélica em 16 células, 32 células e placenta (A, B, C) enquanto O gene *KIF26A* demonstrou evidência de expressão bialélica para dois SNPs distintos (D, E) em estudos de transcriptoma de 32 células.

Tabela 1. Cross-reference de DMRs primárias candidatas ao *imprinting* com dados de expressão alélica presentes no artigo de Hamada 2016.

Cross-reference entre genes presentes em DMRs primárias candidatas ao *imprinting* que apresentaram valores de expressão alélica oriundos do artigo de Hamada 2016 (*Allele-Specific Methylome and Transcriptome Analysis Reveals Widespread Imprinting in the Human Placenta.*) e interpretações oriundas de transcriptoma selecionados (16 células, 32 células e Placenta) feitas na plataforma SRA.

Nome do gene	Transcriptoma Hamada 2016, et al.	Estado 16 células	Estado 32 células	Estado Placenta
<i>NR2F6</i>	Expressão consistente com bialélica	Ausência de SNPs com MAF >0.3	Ausência de SNPs com MAF >0.3	Ausência de SNPs com MAF >0.3
<i>MECOM</i>	1 Placenta com expressão consistente com materna	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>CBR1</i>	4 Placentas consistentes com expressão monoalélica paterna	Ausência de SNPs com MAF >0.3	Ausência de SNPs com MAF >0.3	Ausência de SNPs com MAF >0.3
<i>VAMP5</i>	1 Placenta consistente com expressão monoalélica paterna	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>STARD13</i>	Expressão consistente com bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>MYO1D</i>	1 Placenta consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>SPON1</i>	2 Placentas consistentes com expressão bialélica, 1 placenta consistente com expressão monoalélica materna	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>FGFR3</i>	1 Placenta consistente com expressão bialélica	Ausência de SNPs com MAF >0.3	Ausência de SNPs com MAF >0.3	Ausência de SNPs com MAF >0.3
<i>EGFL8 / PPT2 - EGFL8</i>	Expressão consistente com bialélica	Expressão consistente com bialélica	Expressão consistente com bialélica	Dados consistentes com expressão bialélica
<i>BMP1</i>	Expressão consistente com bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>SNX29</i>	Expressão consistente com bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>KIF26A</i>	Expressão consistente com bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Dados consistentes com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise
<i>TTYH3</i>	Expressão consistente com bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise

iDMRs secundárias candidatas

iDMRs secundárias candidatas

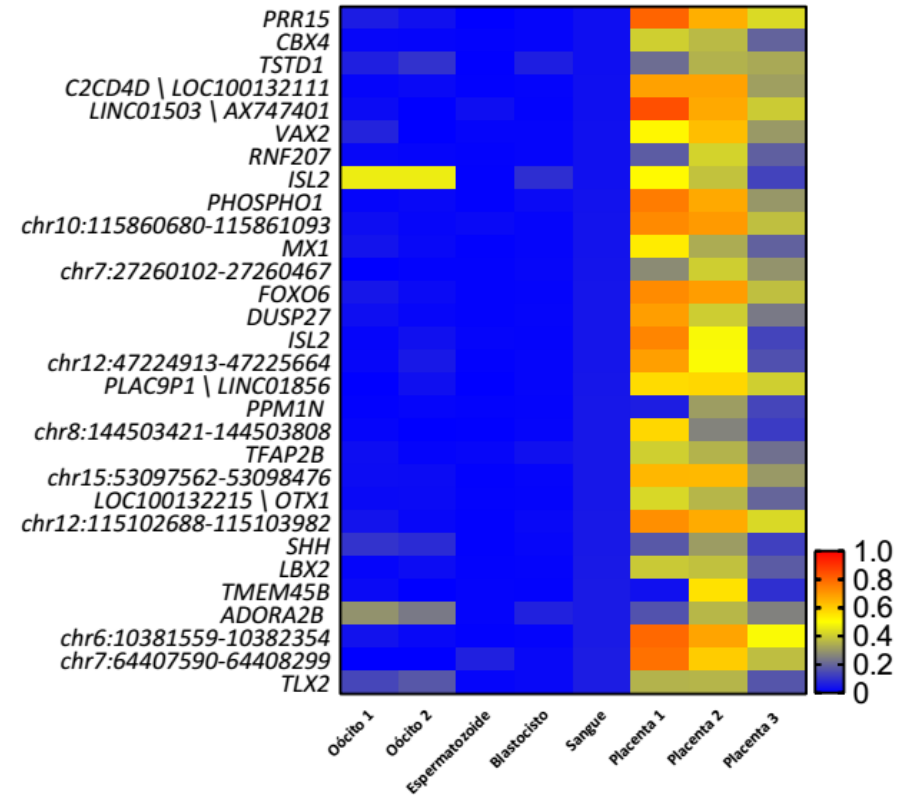
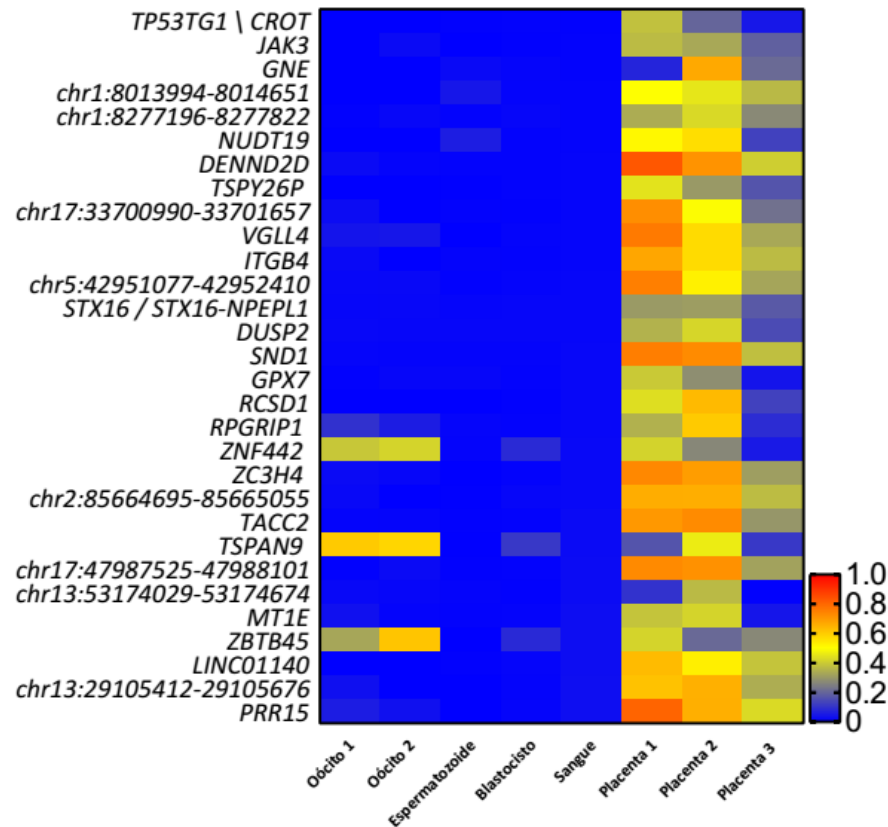
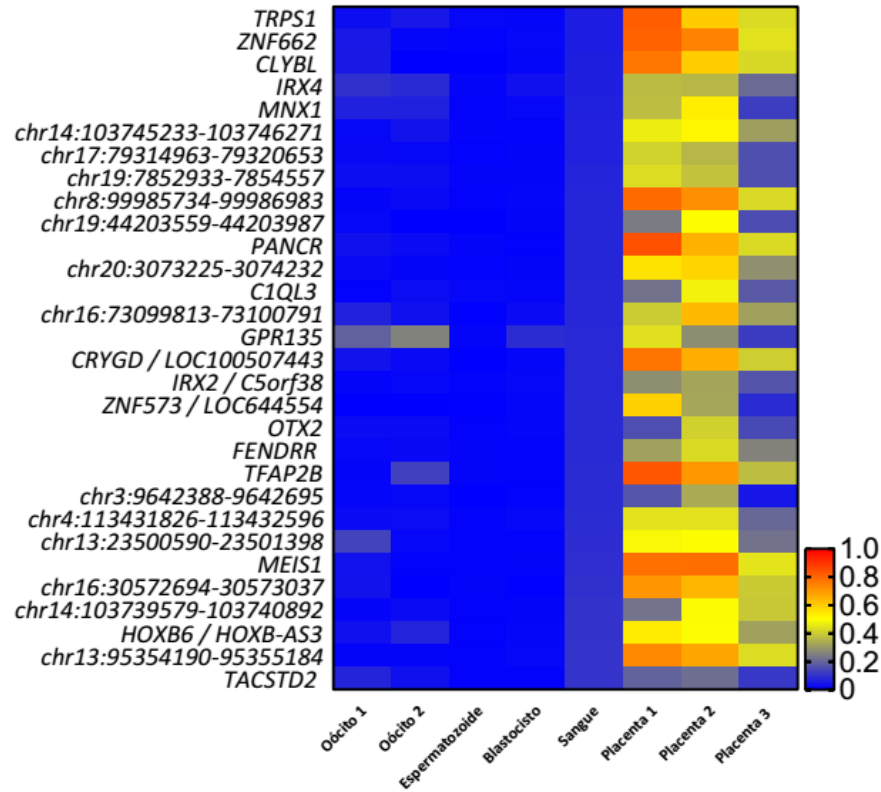


Figura 36. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs candidatas secundárias encontradas pelo algoritmo (grupo 2).

No eixo X na parte inferior se encontram os tipos de tecidos utilizados para calcular a média de metilação, no eixo Y a esquerda se encontram os nomes dos genes que apresentam DMRs secundárias candidatas encontradas no algoritmo proposto, apresentados em em uma escala de variação entre 0 e 1 sendo 1 a cor vermelha representando perfil hipermetilado, e 0 a cor azul representando o perfil hipometilado. Regiões com ausência de genes conhecidos foram apresentadas como a extensão inicial e final da DMR encontrada. As DMRs secundárias encontradas no grupo 2 foram categorizadas como DMRs específicas da placenta, apresentaram em sua maioria ausência de metilação gamética e metilação intermediária polimórfica na placenta.

iDMRs secundárias candidatas



iDMRs secundárias candidatas

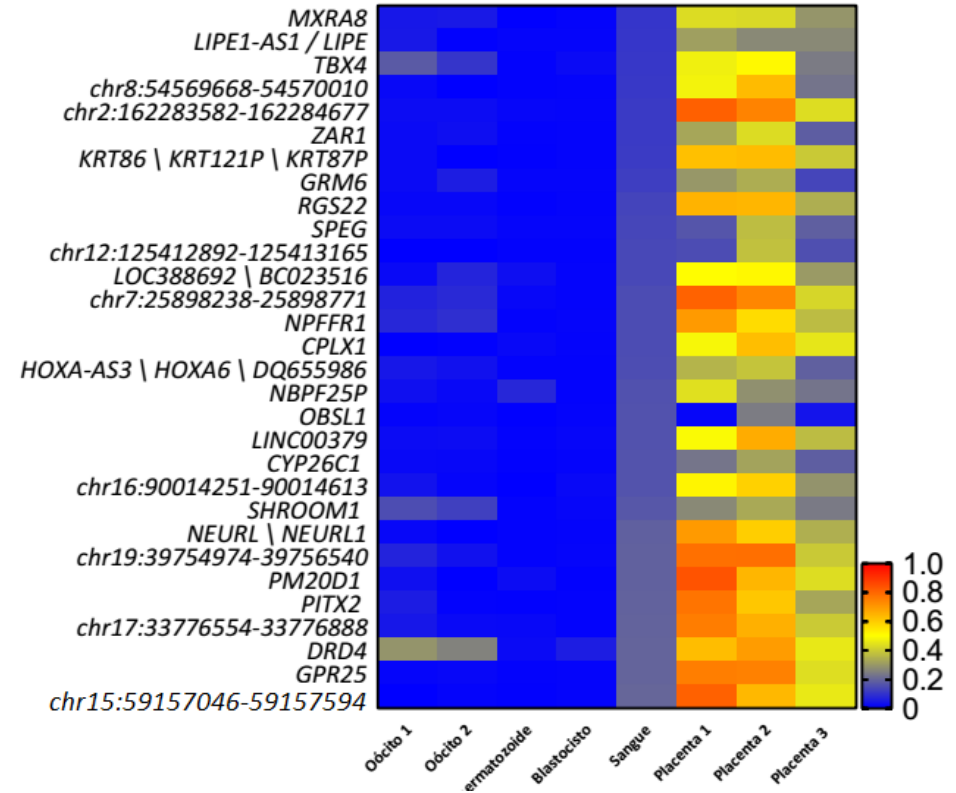


Figura 37. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs candidatas secundárias encontradas pelo algoritmo (grupo 2).

No eixo X na parte inferior se encontram os tipos de tecidos utilizados para calcular a média de metilação, no eixo Y a esquerda se encontram os nomes dos genes que apresentam DMRs secundárias candidatas encontradas no algoritmo proposto, apresentados em em uma escala de variação entre 0 e 1 sendo 1 acor vermelha representando perfil hipermetilado, e 0 a cor azul representando o perfil hipometilado. Regiões com ausencia de genes conhecidos foram apresentadas como a extensão inicial e final da DMR encontrada As DMRs secundárias encontradas no grupo 2 foram categorizadas como DMRs específicas da placenta, apresentaram em sua maioria ausencia de metilação gamética e metilação intermediária polimórfica na placenta .

iDMRs secundárias candidatas

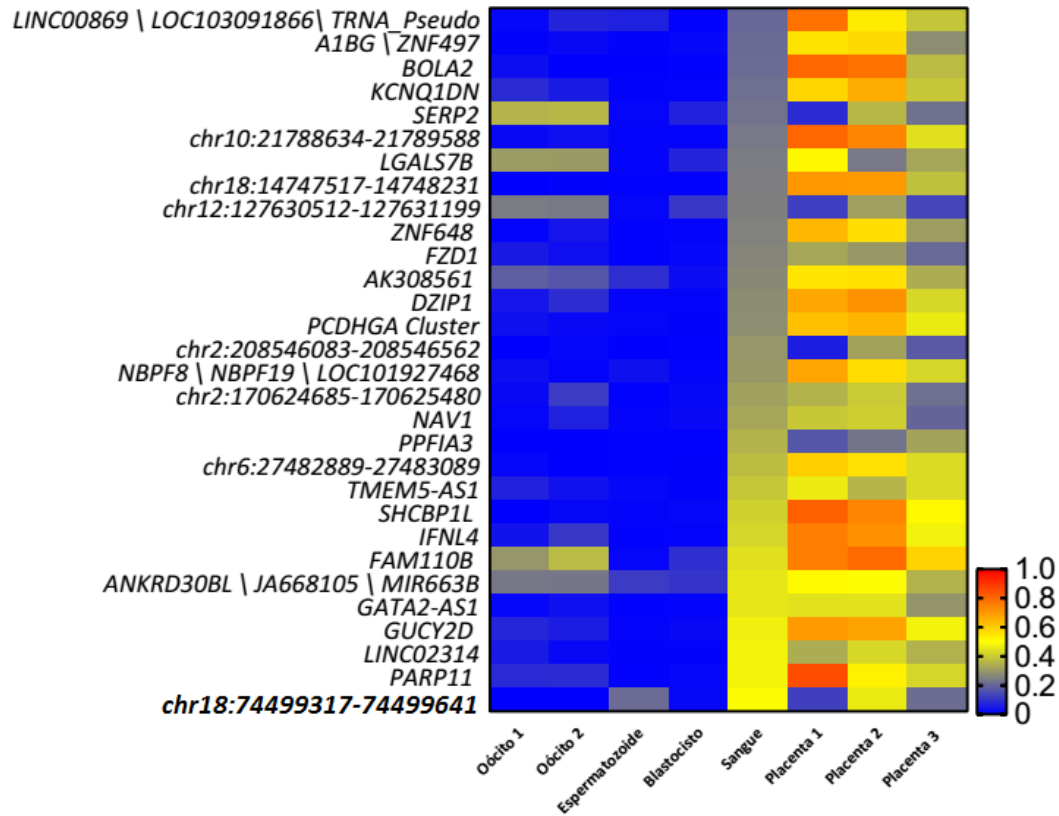
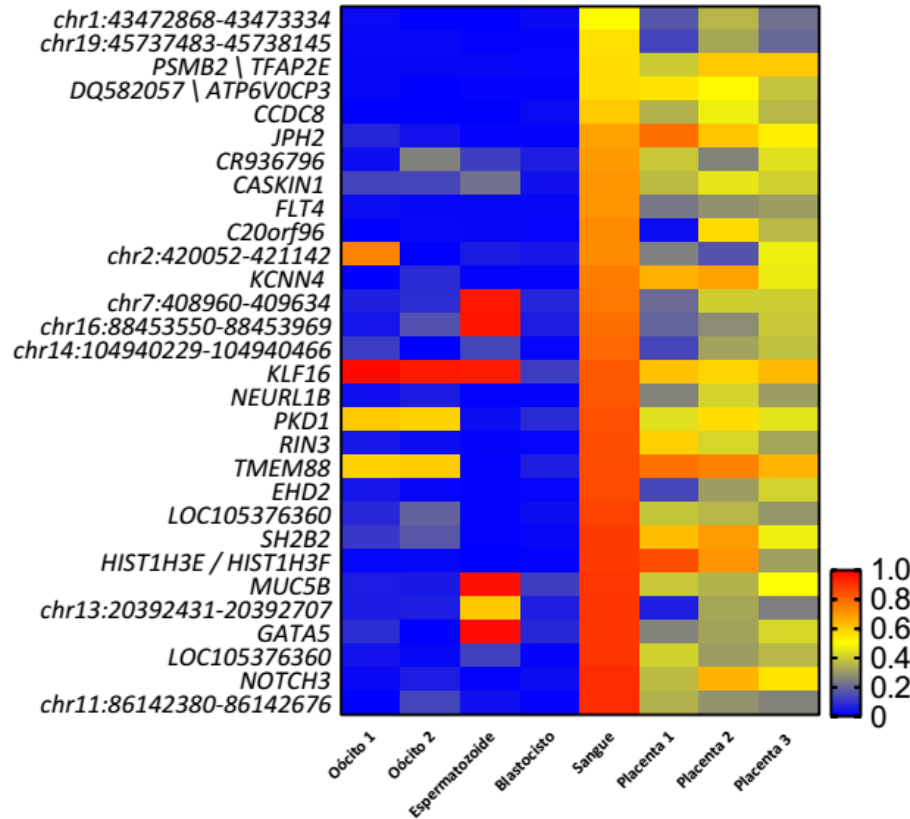


Figura 38. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs candidatas secundárias encontradas pelo algoritmo (grupo 3).

No eixo X na parte inferior se encontram os tipos de tecidos utilizados para calcular a média de metilação, no eixo Y a esquerda se encontram os nomes dos genes que apresentam DMRs secundárias candidatas encontradas no algoritmo proposto, apresentados em em uma escala de variação entre 0 e 1 sendo 1 a cor vermelha representando perfil hipermetilado, e 0 a cor azul representando o perfil hipometilado. Regiões com ausência de genes conhecidos foram apresentadas como a extensão inicial e final da DMR encontrada. As DMRs secundárias encontradas no grupo 3 foram categorizadas como constitutivas, apresentaram ausência de metilação gamética e metilação intermediária polimórfica na placenta e metilação intermediária no sangue .

iDMRs secundárias candidatas



iDMRs secundárias candidatas

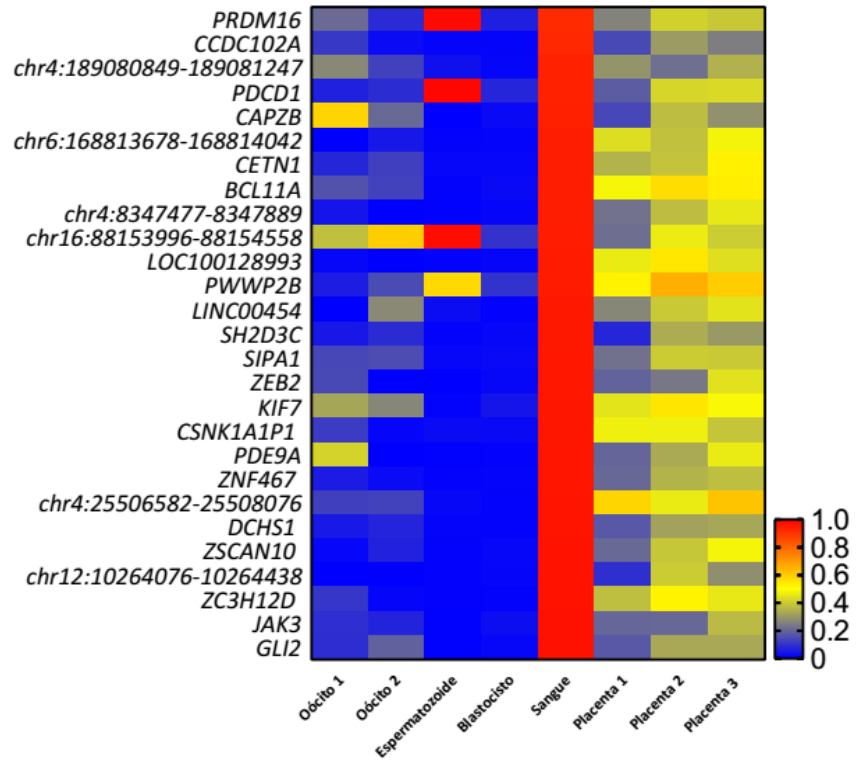


Figura 39. Mapa de calor das diferenças de metilação em DMRs candidatas secundárias encontradas pelo algoritmo (grupo 4).

No eixo X na parte inferior se encontram os tipos de tecidos utilizados para calcular a média de metilação, no eixo Y a esquerda se encontram os nomes dos genes que apresentam DMRs secundárias candidatas encontradas no algoritmo proposto, apresentados em em uma escala de variação entre 0 e 1 sendo 1 a cor vermelha representando perfil hipermetilado, e 0 a cor azul representando o perfil hipometilado. As DMRs secundárias encontradas no grupo 4 foram categorizadas como constitutivas entre a posição chr1:149671992-149673412 e chr14:104940229-104940466, apresentaram ausência de metilação gamética e metilação intermediária polimórfica na placenta e metilação intermediária no sangue. As posições restantes foram caracterizada como DMRs constitutivas específicas da placenta apresentaram ausência de metilação gamética e metilação intermediária polimórfica.

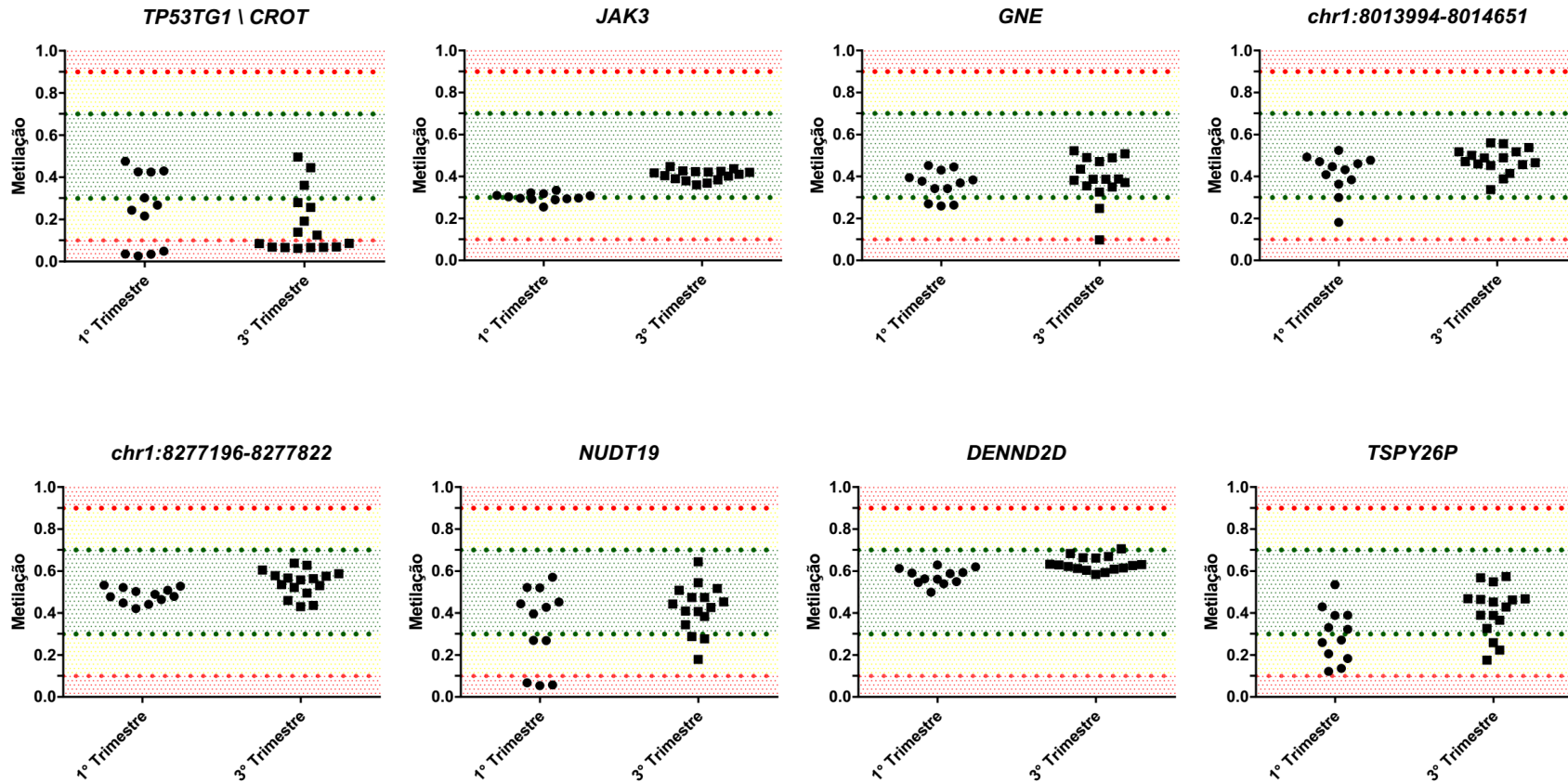


Figura 40. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os genes *TP53TG1/CROT*, *NUDT19* e *GNE* estudados apresentaram evidência de polimorfismo enquanto os genes restantes não apresentaram evidência de polimorfismo.

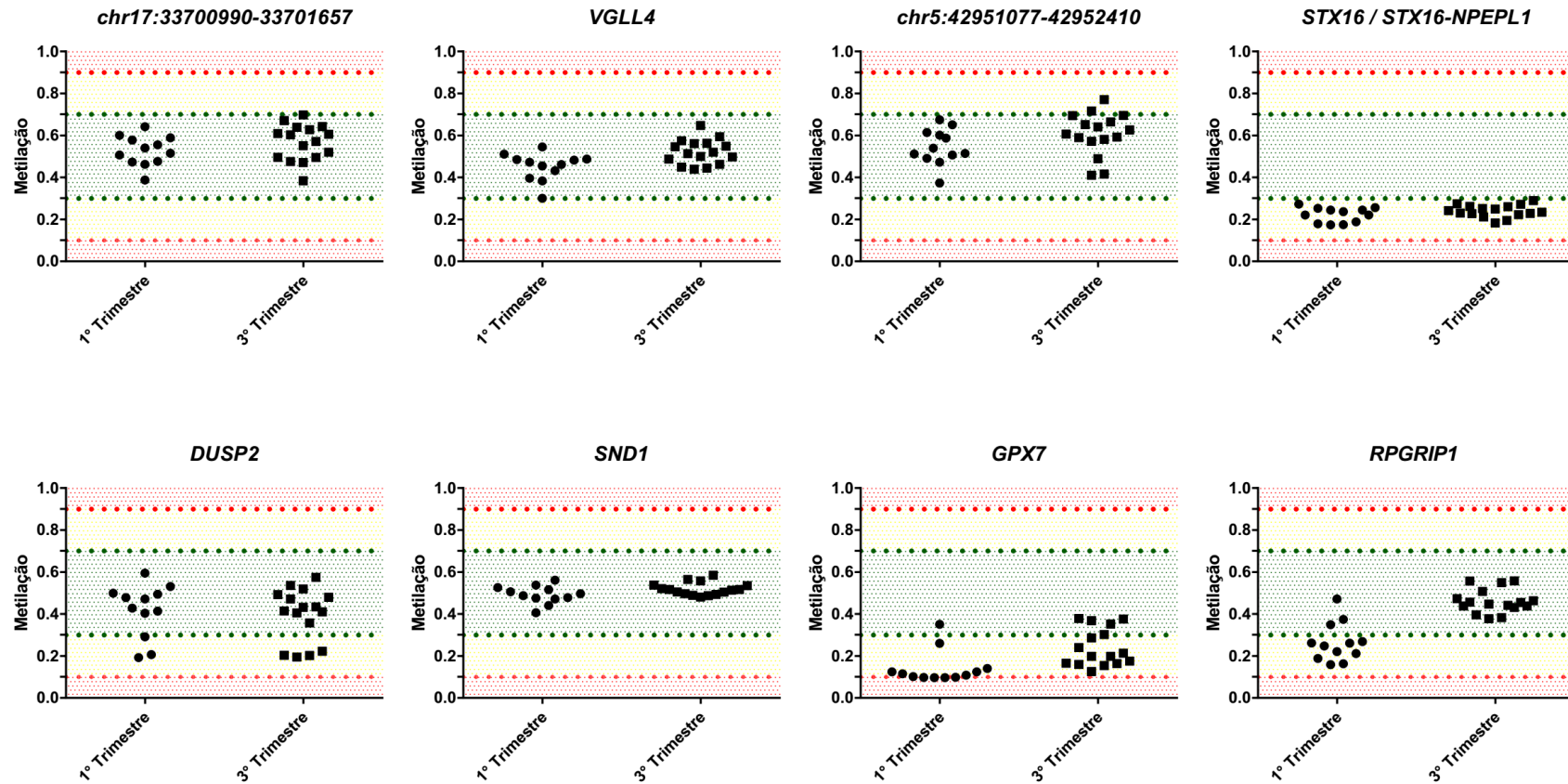


Figura 41. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentaria em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). O gene *GPX7* apresentou amostras no limite entre metilação intermediária alterada e polimorfismo, enquanto as amostras restantes não apresentaram evidência de polimorfismo placentario entre as amostras estudadas.

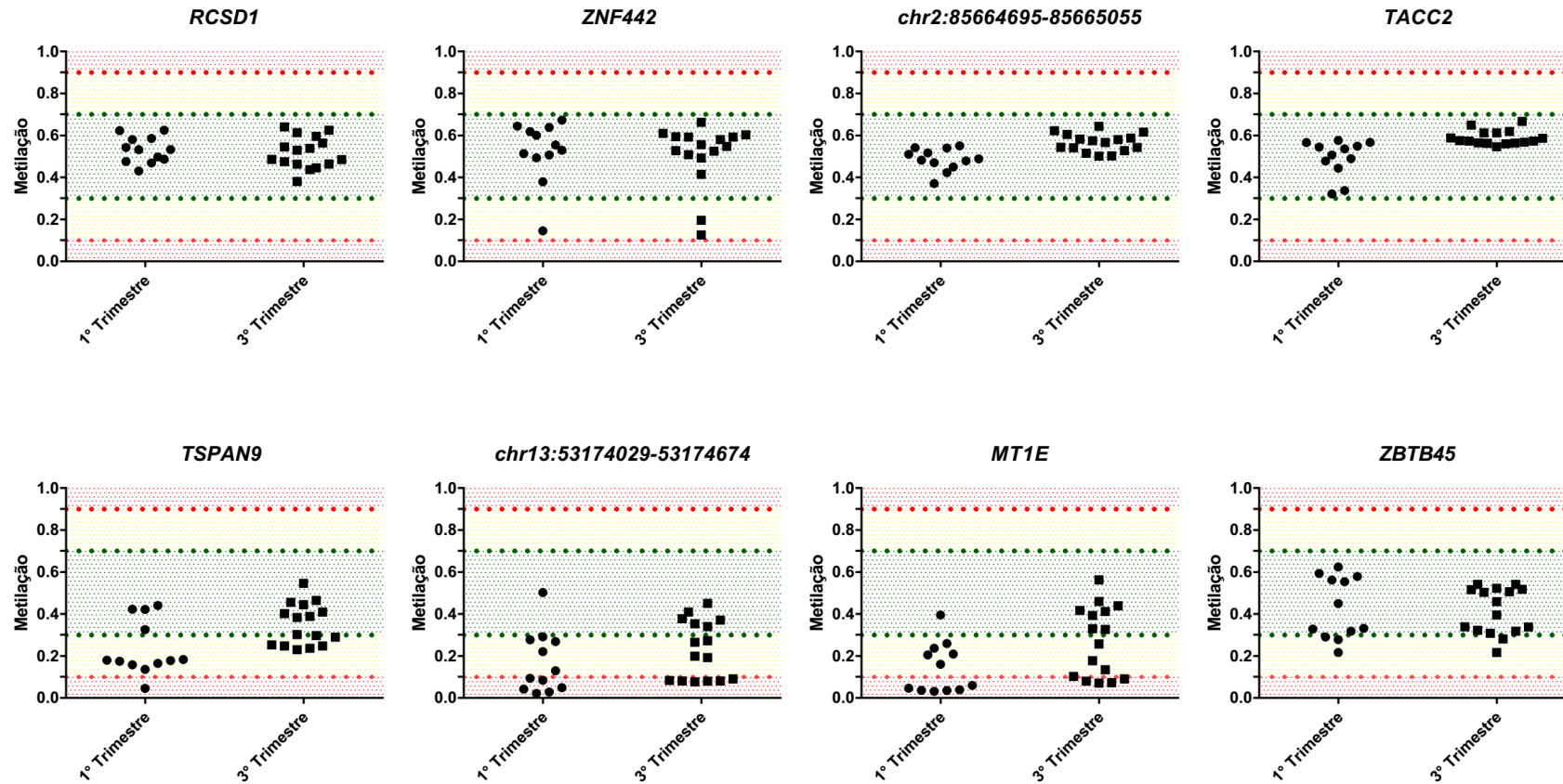


Figura 42. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Os genes *TSPAN9*, *MT1E* e a posição *chr13:53174029-53174674* apresentaram evidência de polimorfismo, enquanto os genes restantes não apresentaram evidência de polimorfismo placentário entre as amostras estudadas.

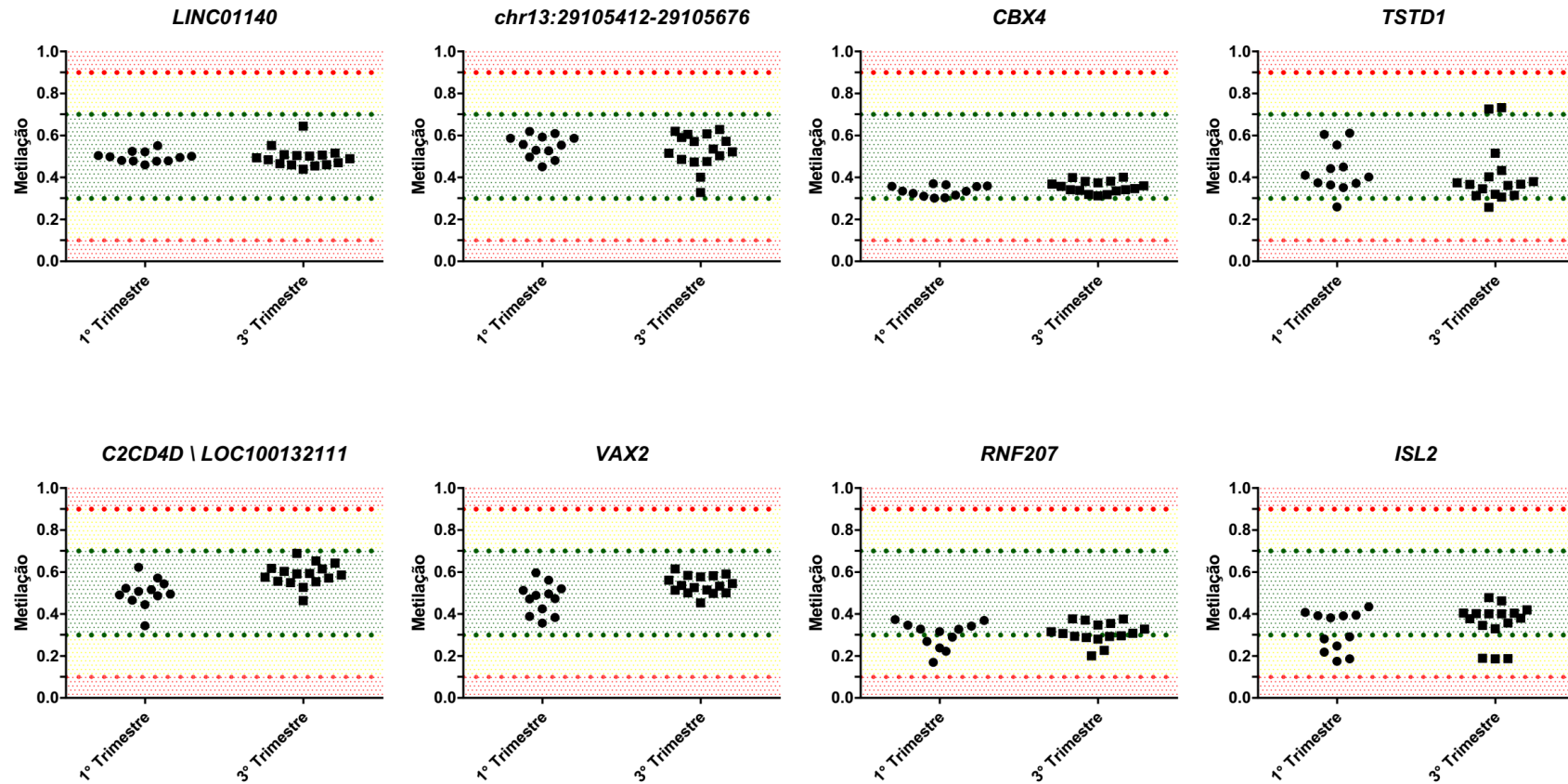


Figura 43. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Não há evidência de polimorfismo nos genes estudados dentre as amostras utilizadas.

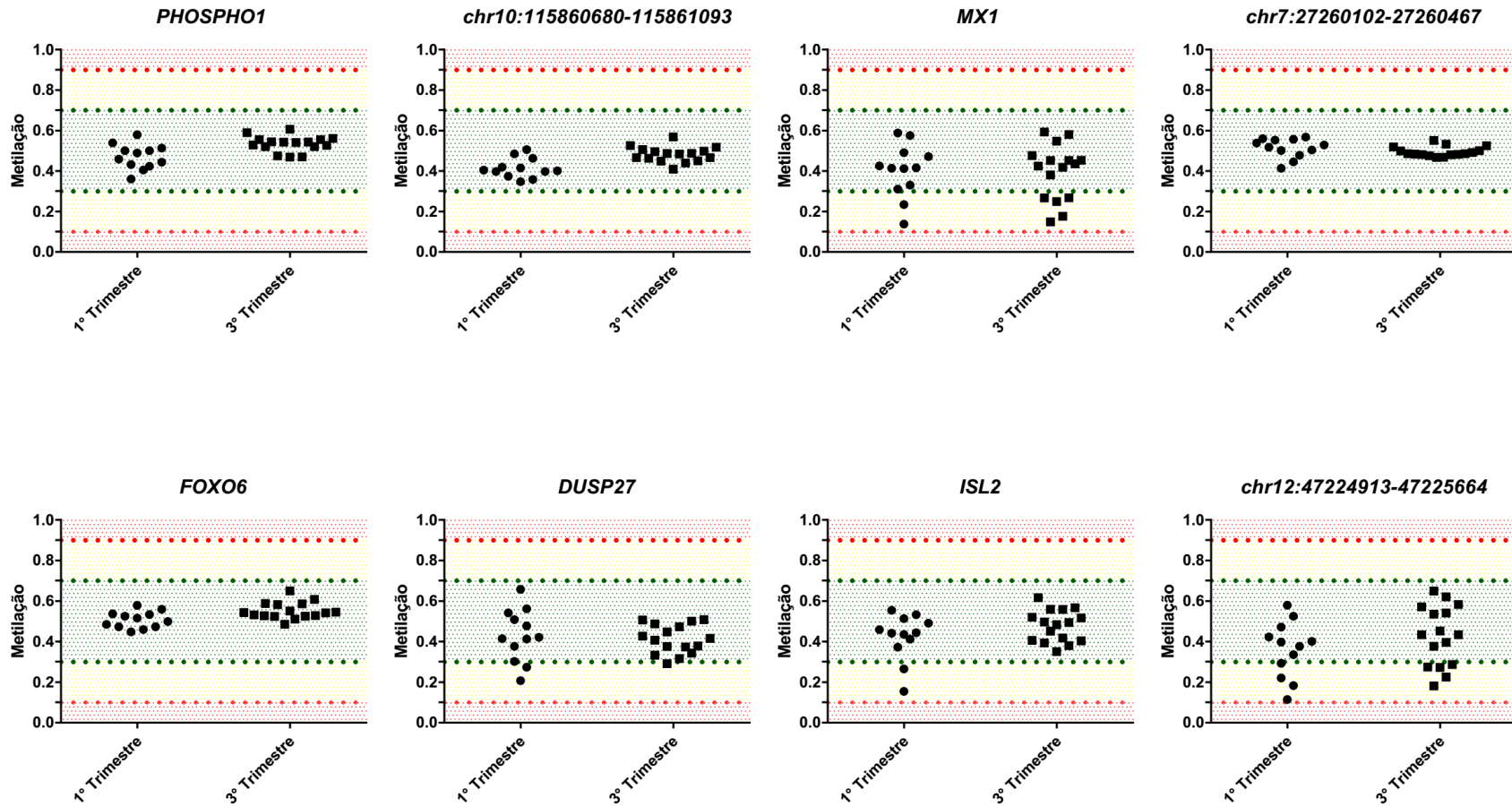


Figura 44. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Não há evidência de polimorfismo nos genes estudados dentre as amostras utilizadas.

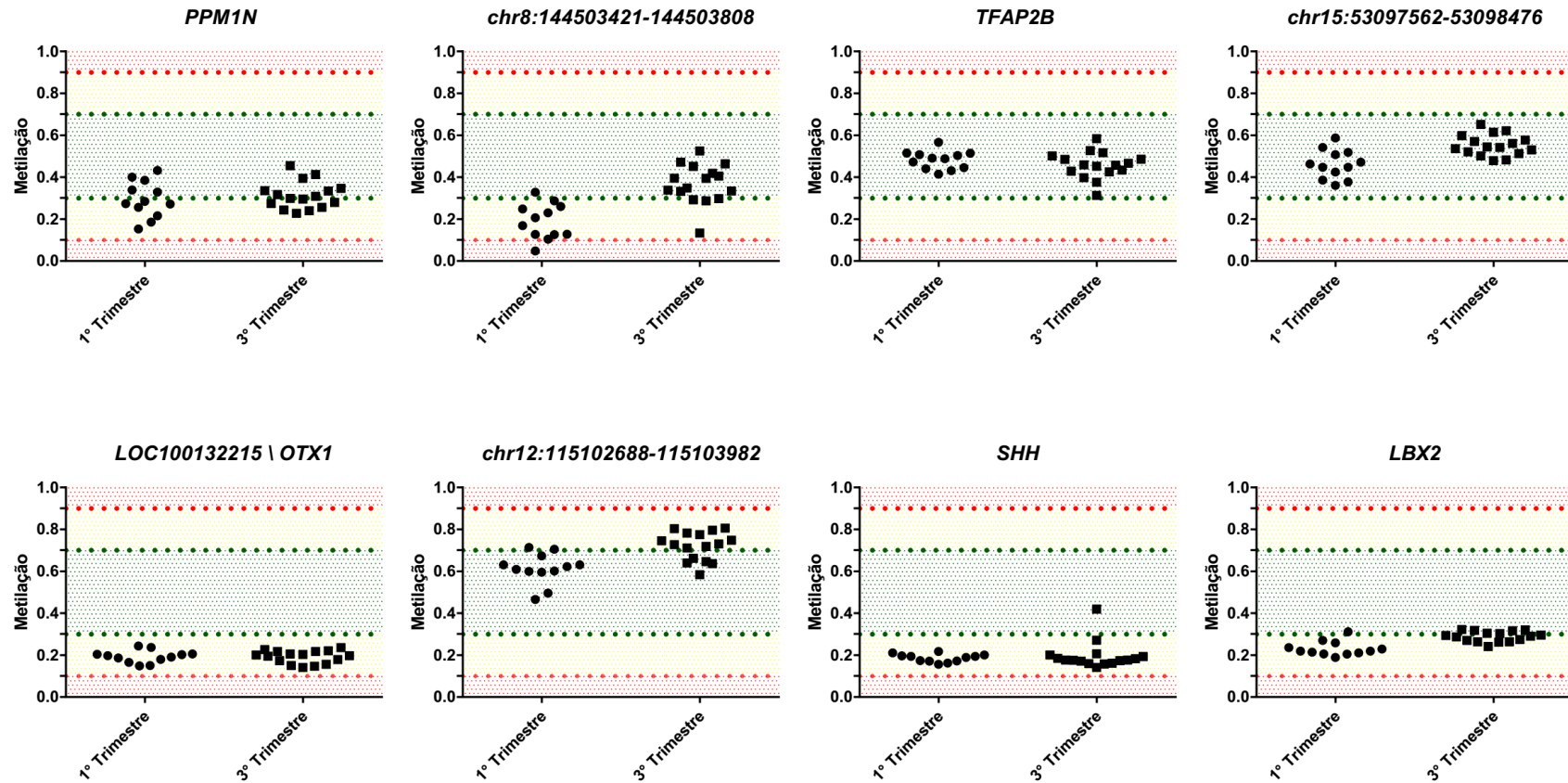


Figura 45. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Dentre as regiões estudadas há evidência de polimorfismo na região chr8:144503421-144503808 enquanto não há evidência de polimorfismo para genes restantes.

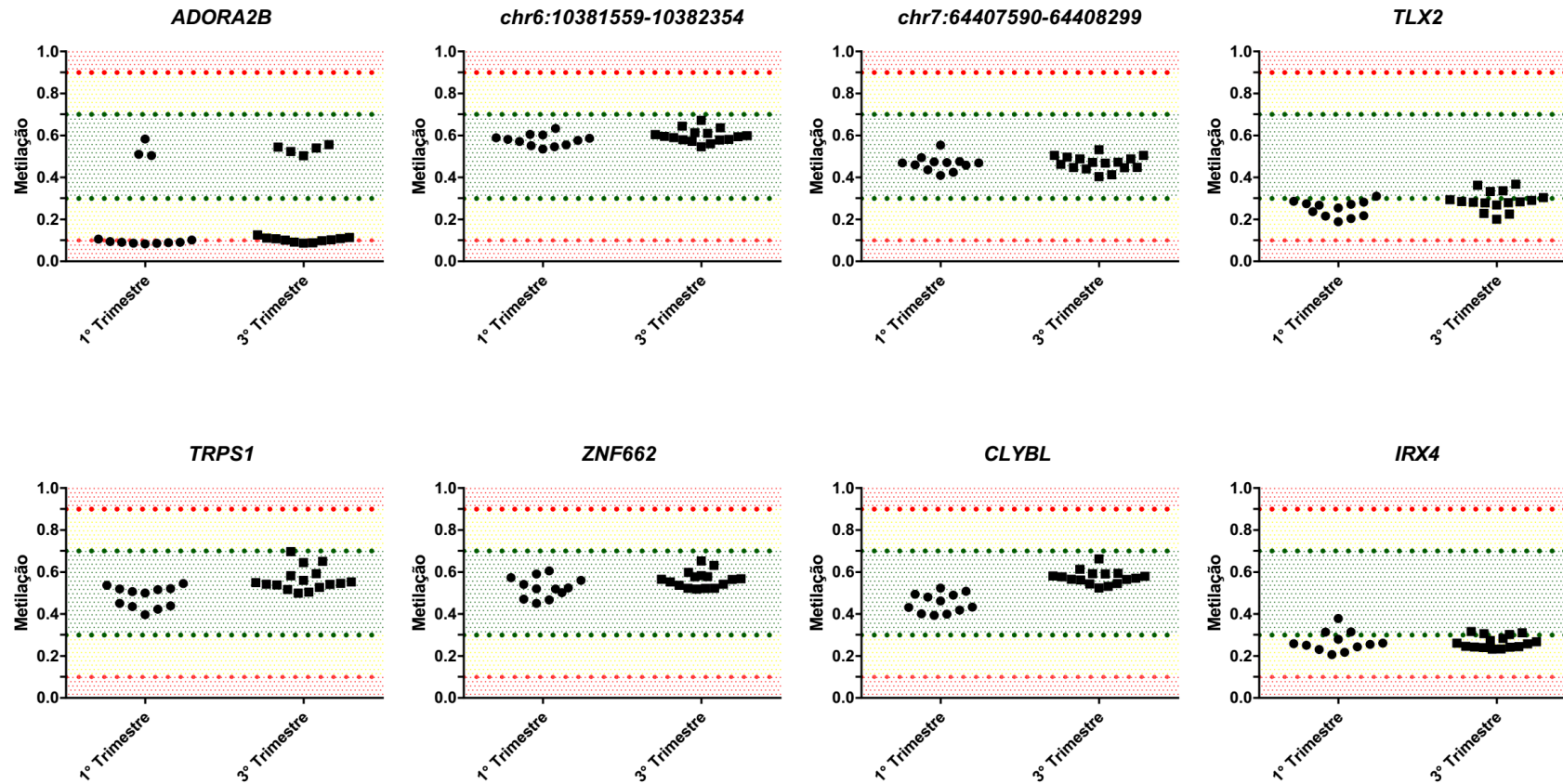


Figura 46. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Dentre as regiões estudadas há evidência de polimorfismo para o gene *ADORA2B* enquanto não há evidência de polimorfismo para genes restantes.

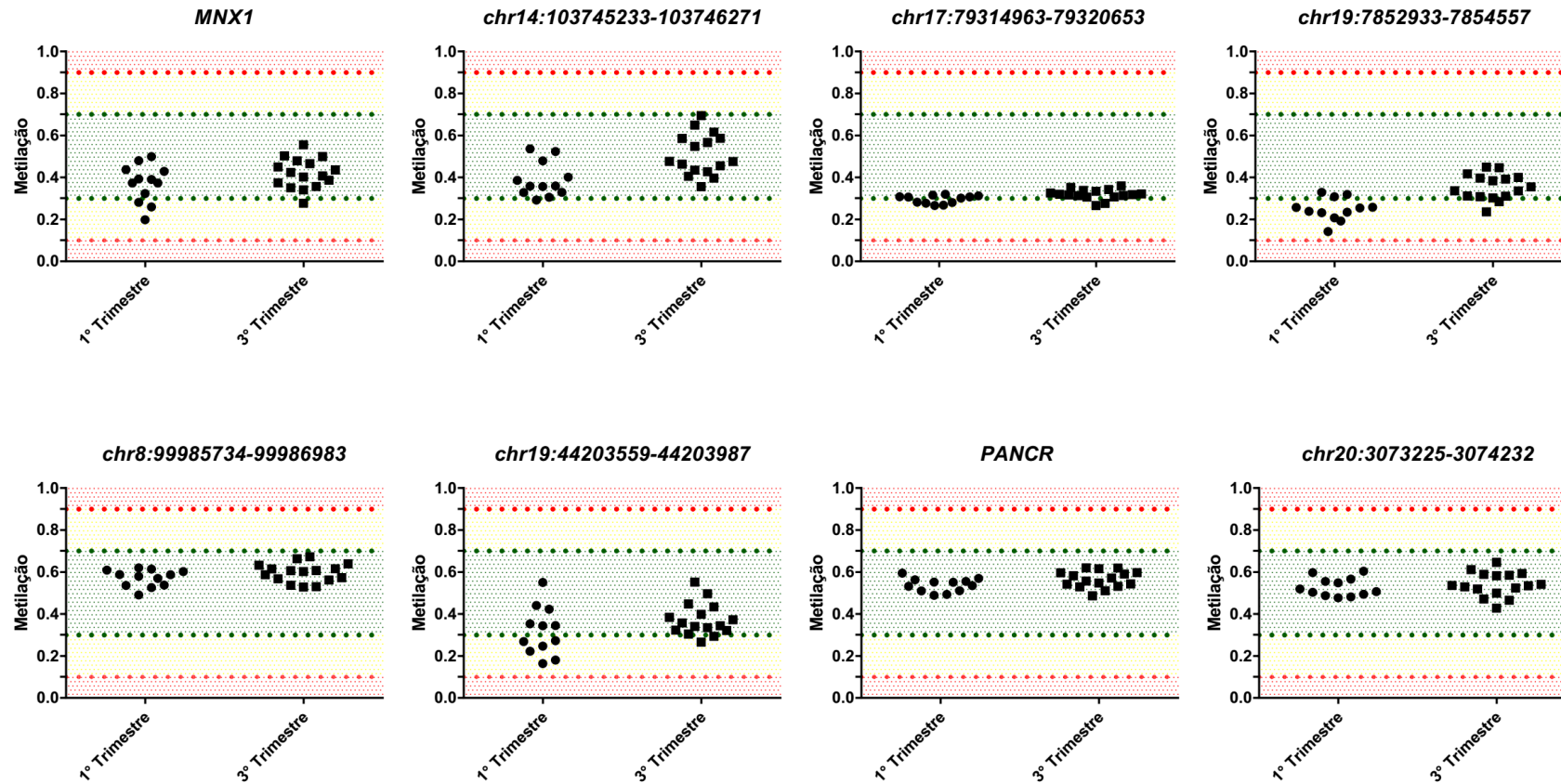


Figura 47. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentaria em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediaria (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediaria perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Dentre os genes estudados não há evidência de polimorfismo de metilação placentario entre as amostras utilizadas.

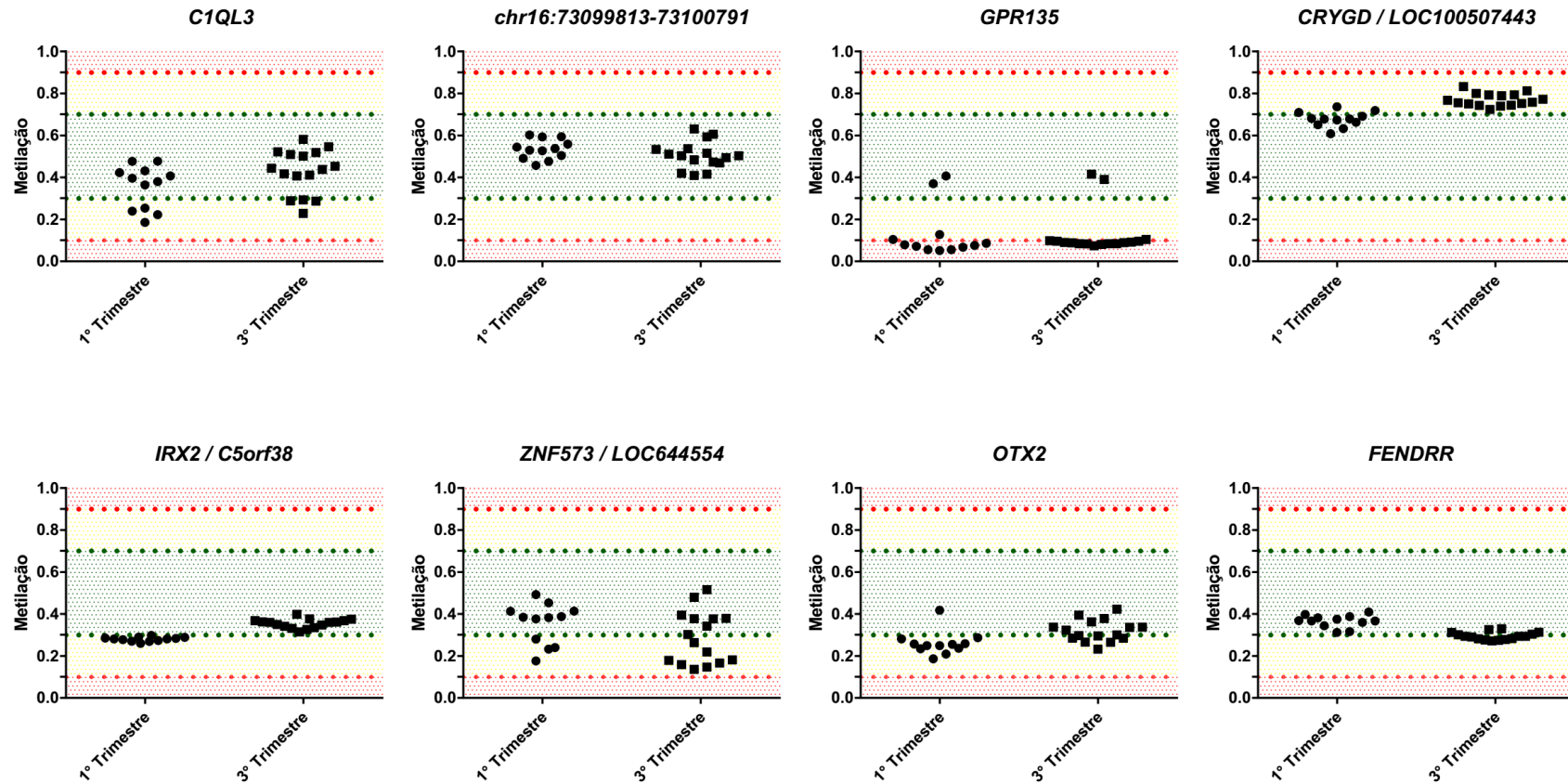


Figura 48. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Dentre as regiões estudadas há evidência de polimorfismo para o gene *GPR135* enquanto não há evidência de polimorfismo para genes restantes.

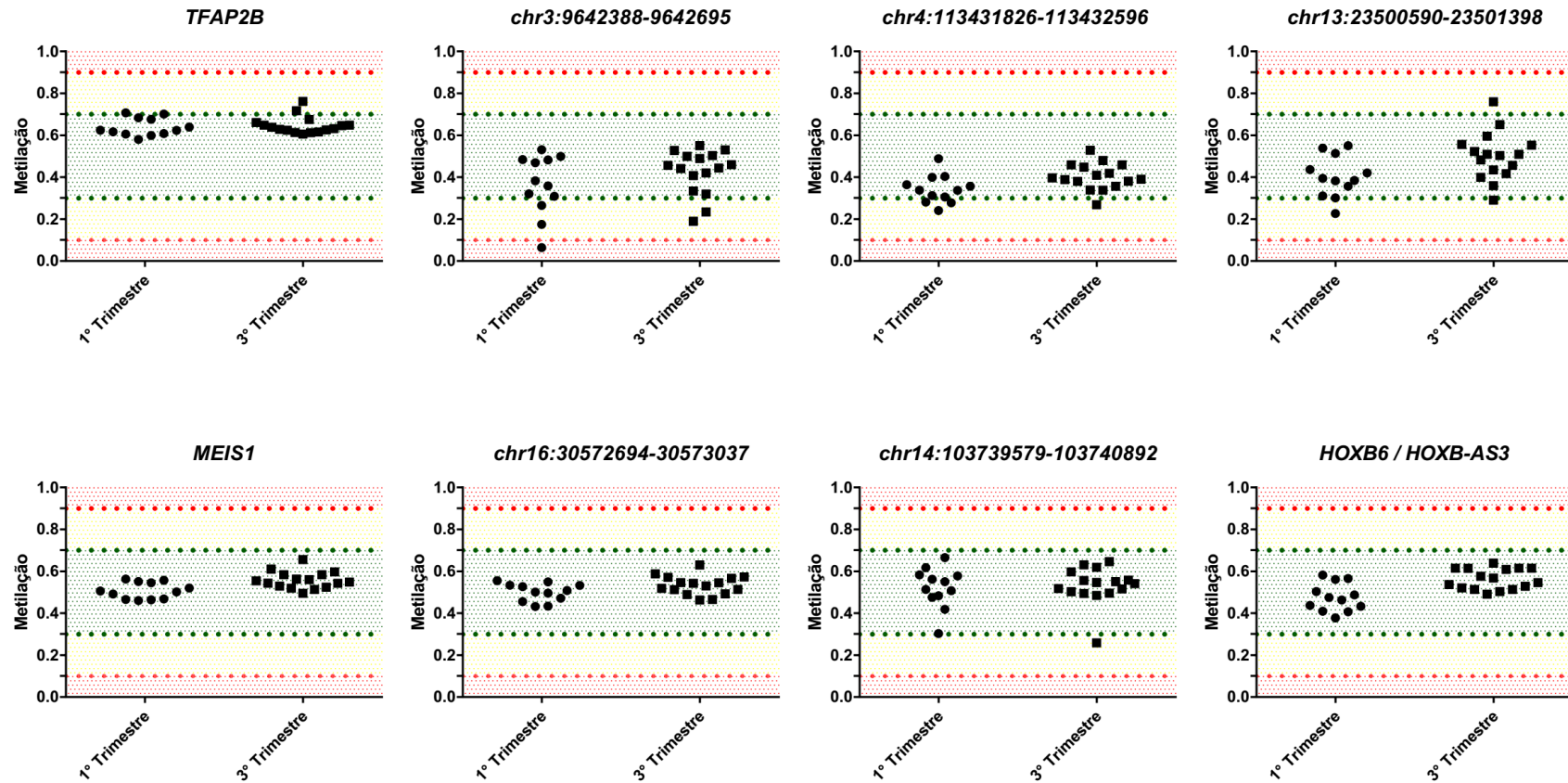


Figura 49. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Dentre as regiões estudadas há evidência de polimorfismo para a região *chr3:9642388-9642695* enquanto não há evidência de polimorfismo para genes restantes.

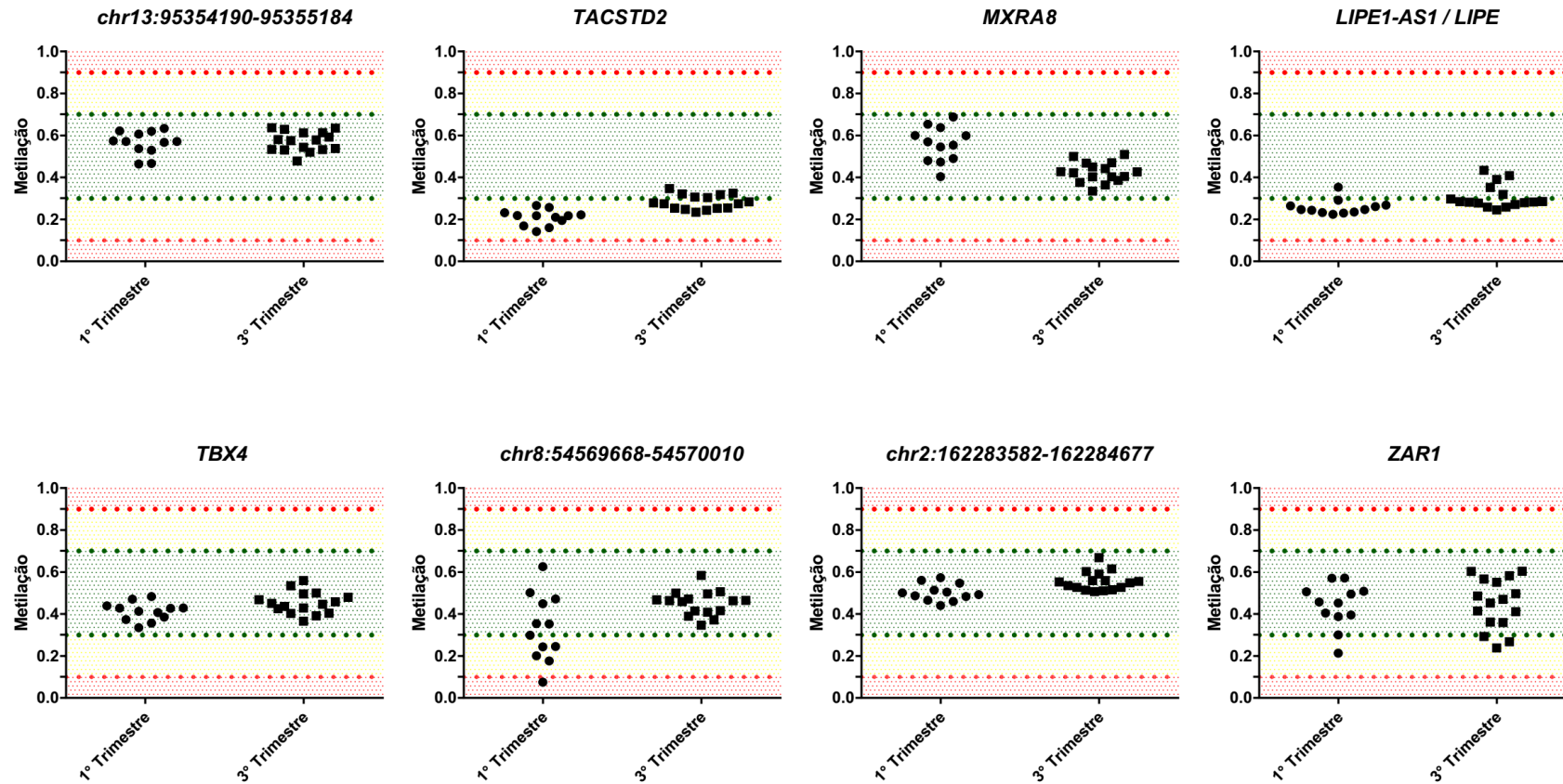


Figura 50. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Dentre as regiões estudadas há evidência de polimorfismo para a região *chr8:54569668-54570010* enquanto não há evidência de polimorfismo para genes restantes.

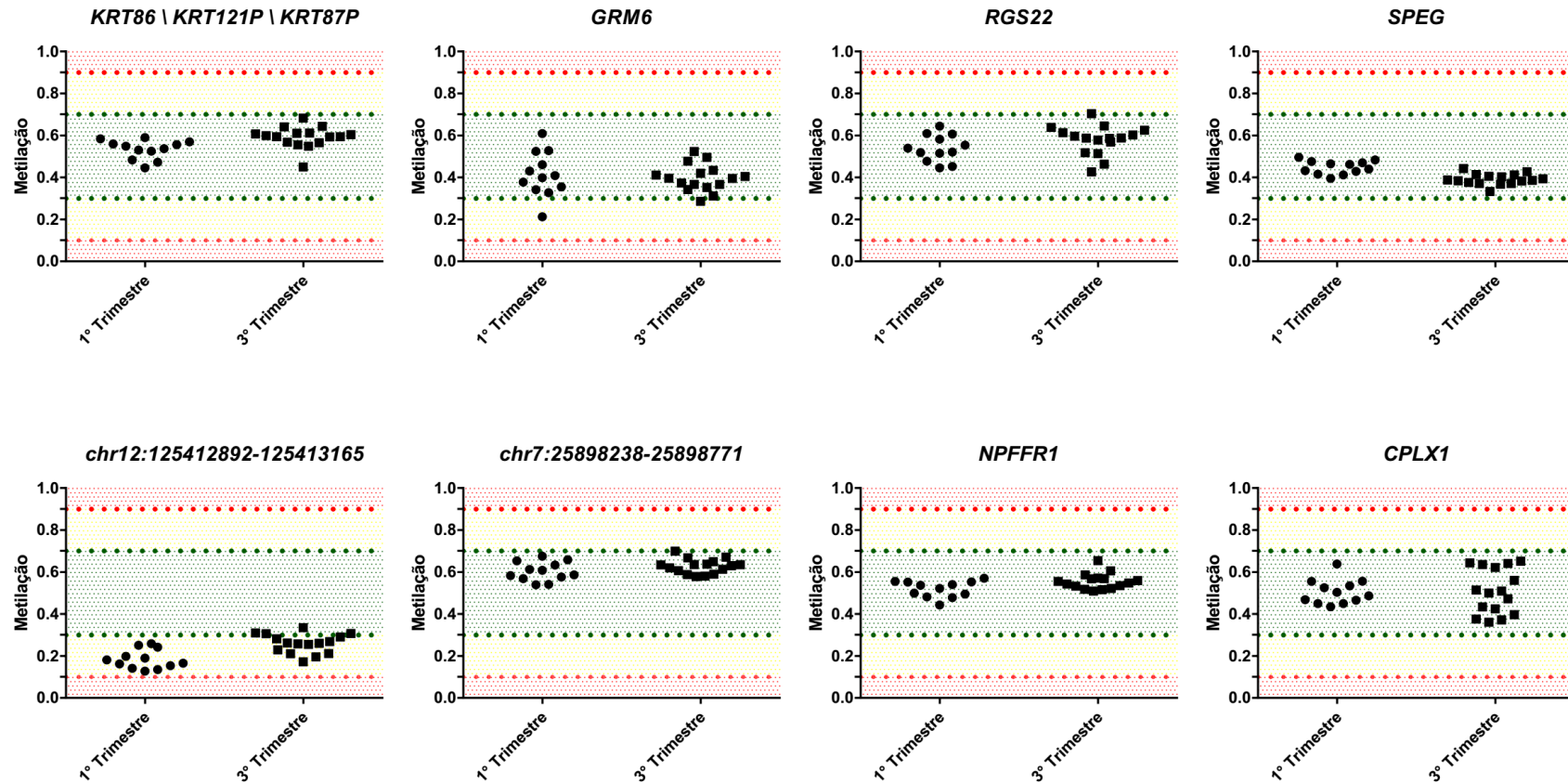


Figura 51. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Dentre as regiões estudadas não há evidência de polimorfismo dentre as amostras utilizadas

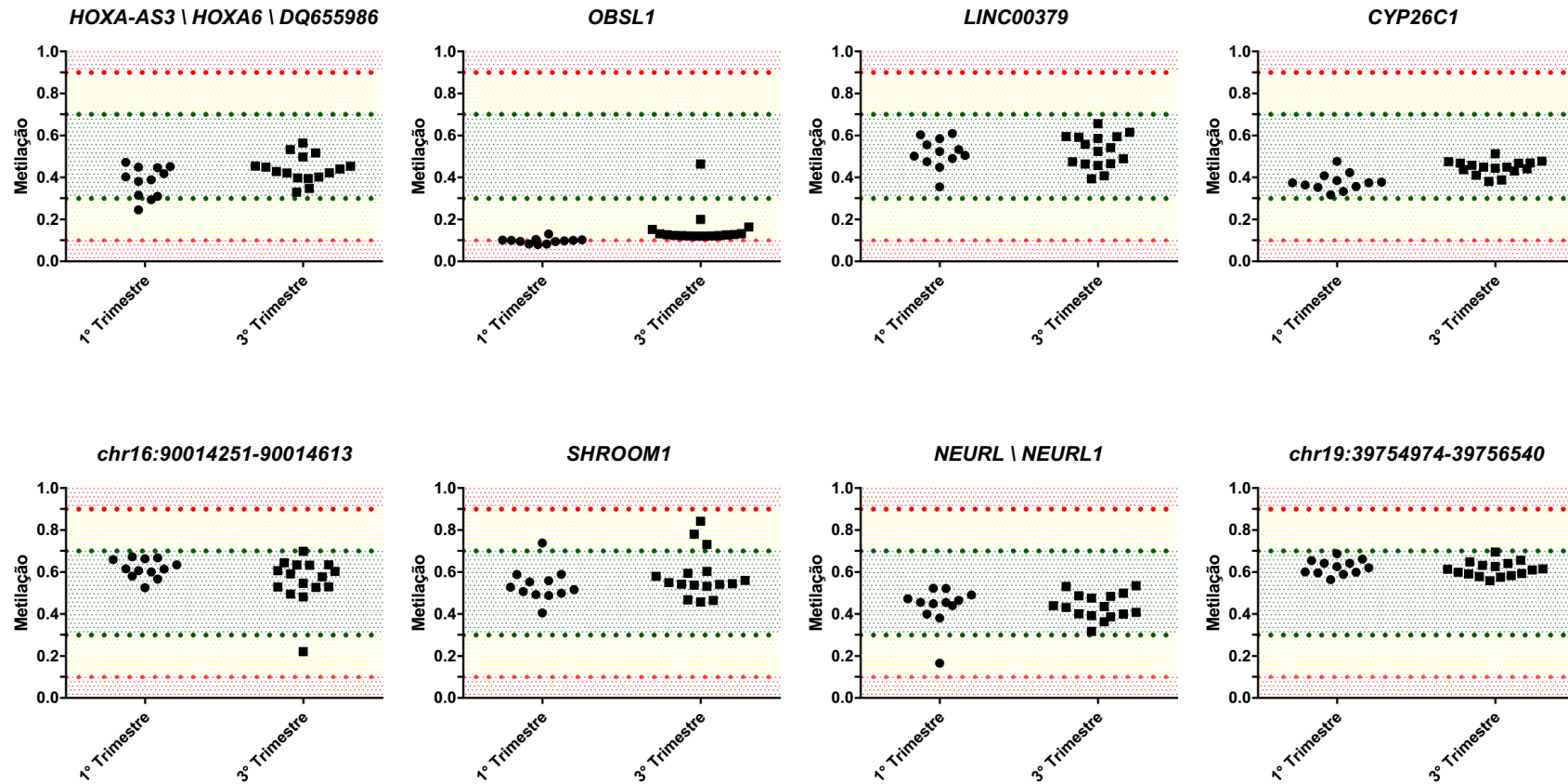


Figura 52. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Dentre as regiões estudadas há evidência de polimorfismo para o gene *OBSL1* enquanto para os genes restantes não há evidência de polimorfismo dentre as amostras utilizadas

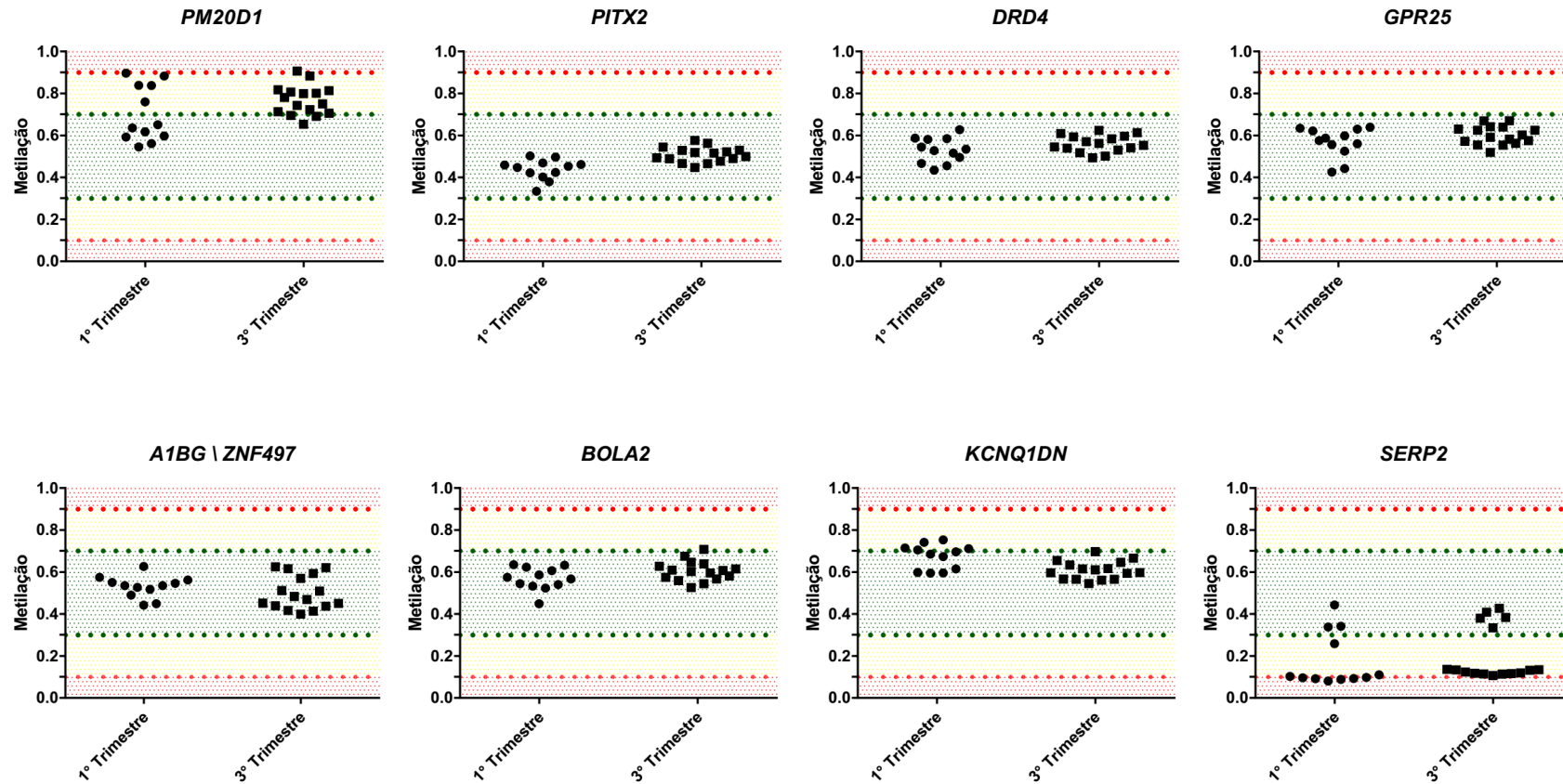


Figura 53. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Dentre as regiões estudadas há evidência de polimorfismo para o gene *SERP2* enquanto para os genes restantes não há evidência de polimorfismo dentre as amostras utilizadas

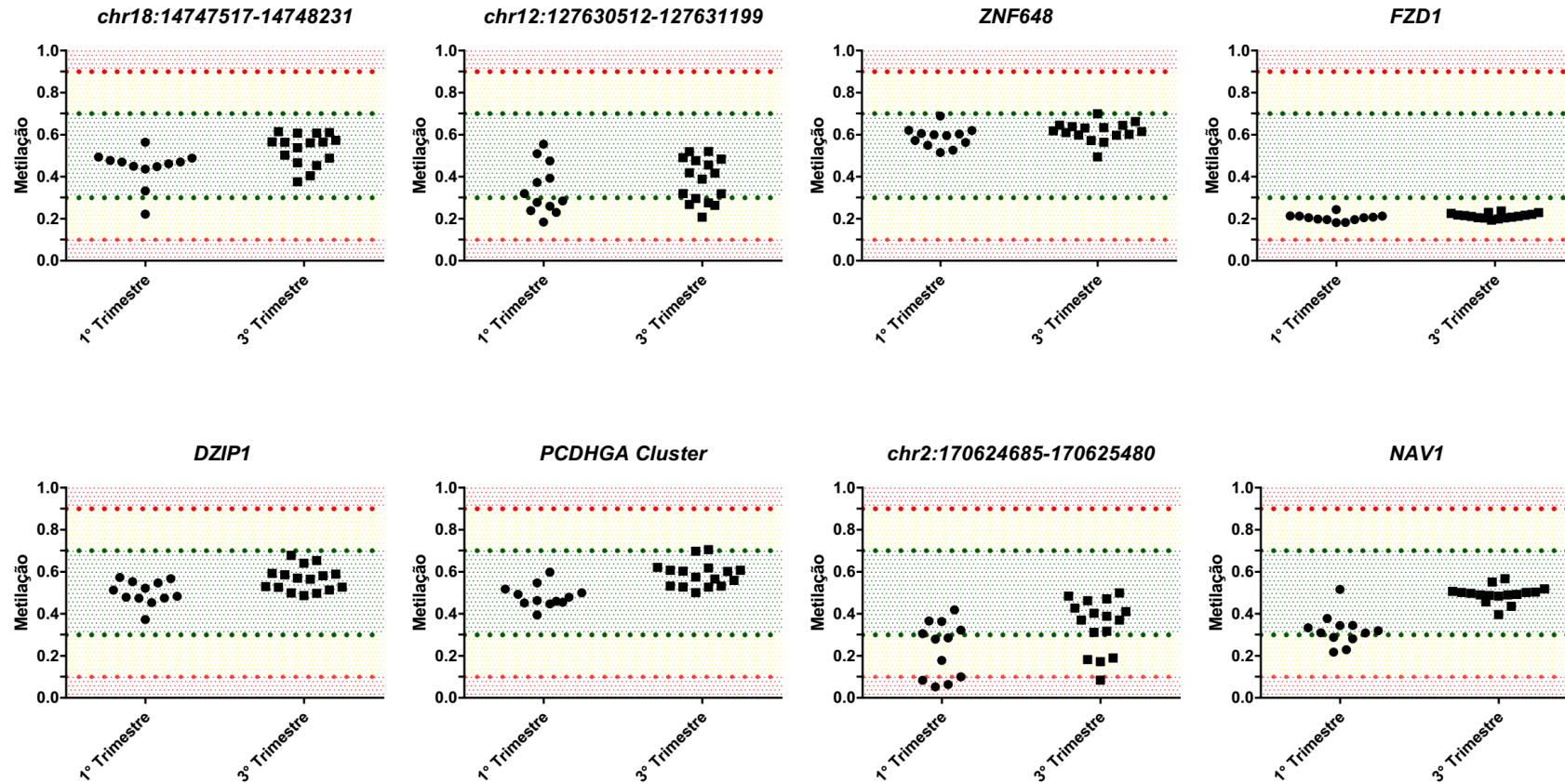


Figura 54. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Dentre as regiões estudadas há evidência de polimorfismo para a região *chr2:170624685-170625480* enquanto para os genes restantes não há evidência de polimorfismo dentre as amostras utilizadas

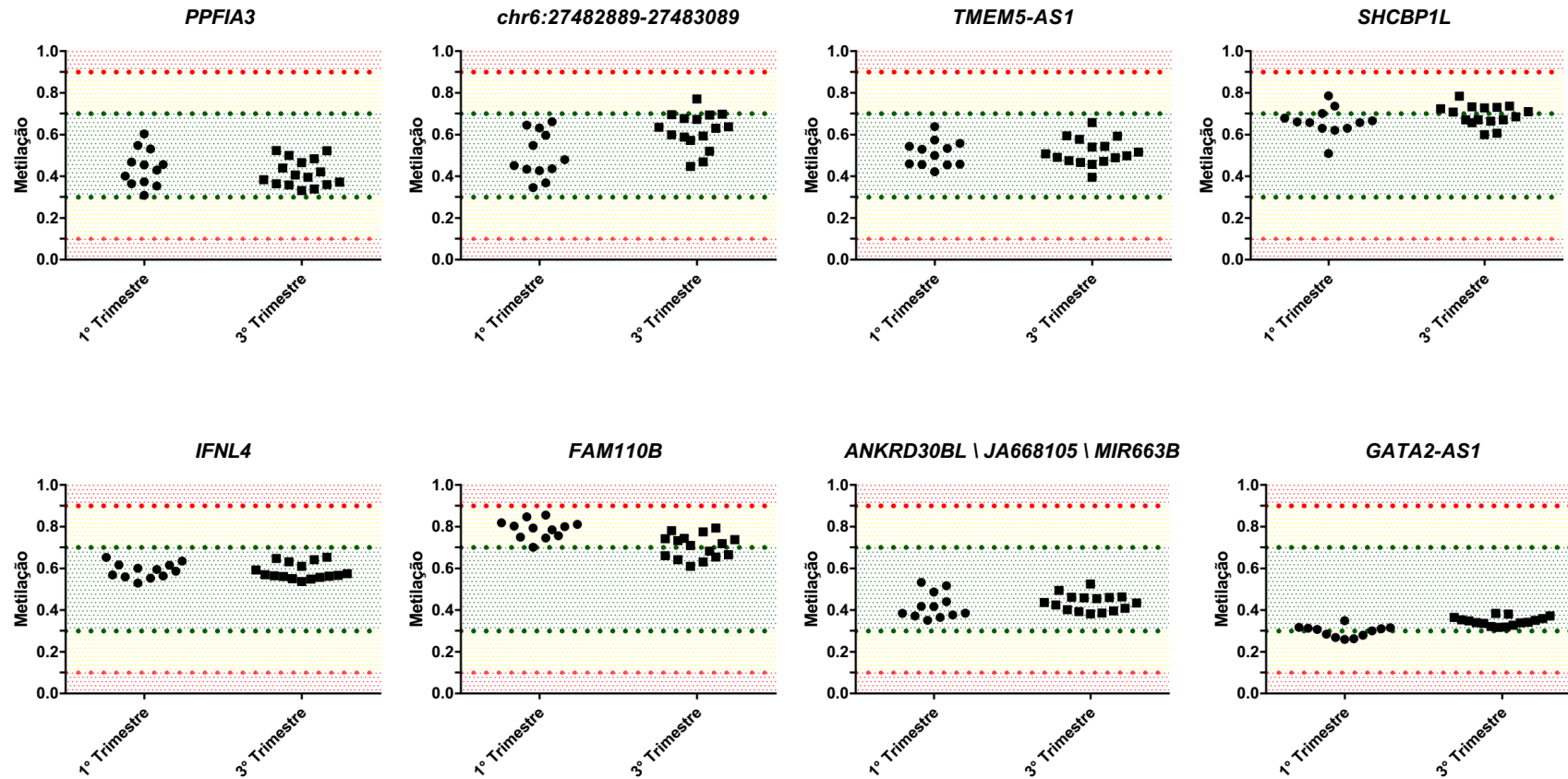


Figura 55. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Não há evidência de polimorfismo de metilação placentária nas regiões estudadas.

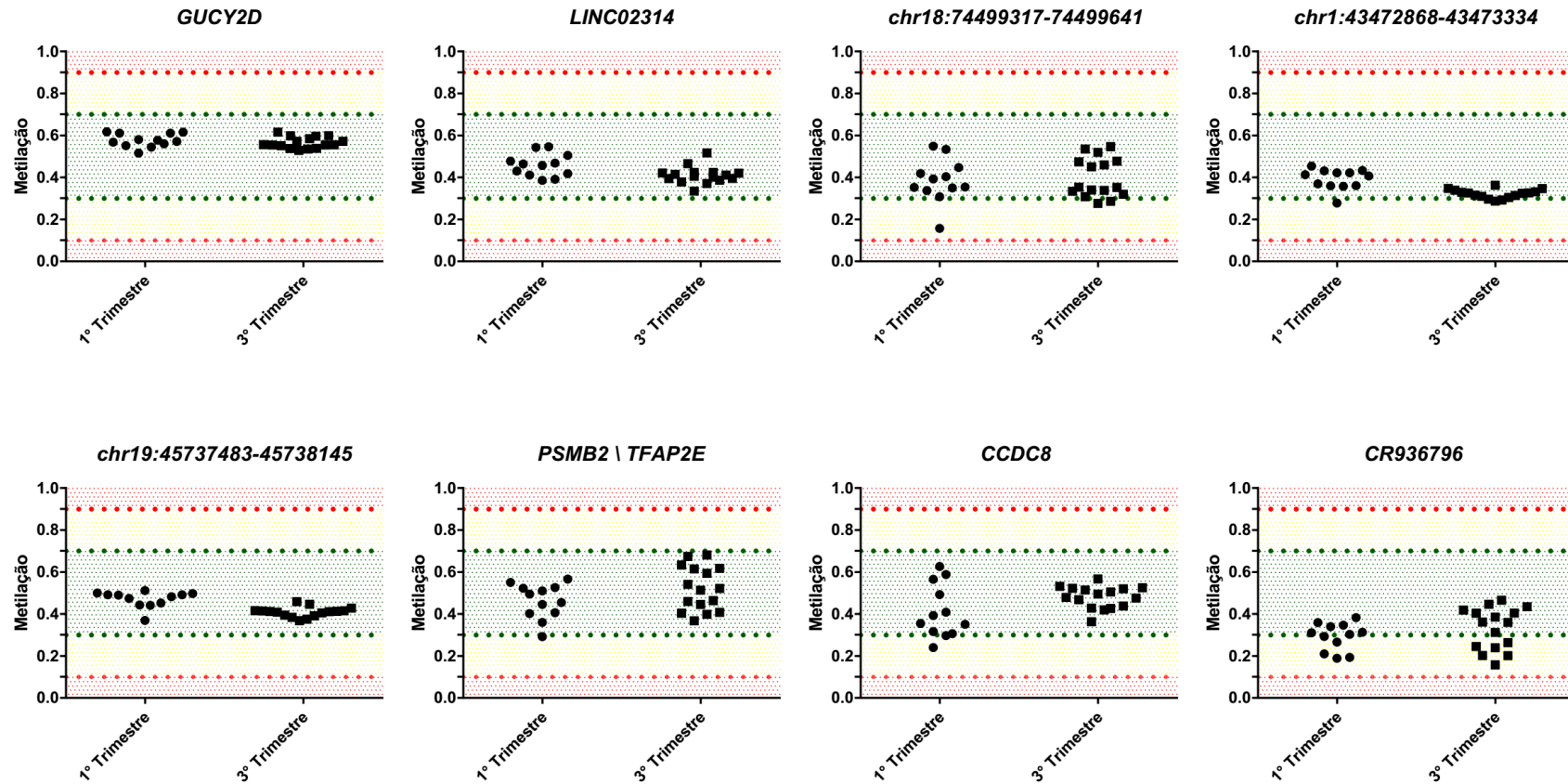


Figura 56. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Não há evidência de polimorfismo de metilação placentária nas regiões estudadas.

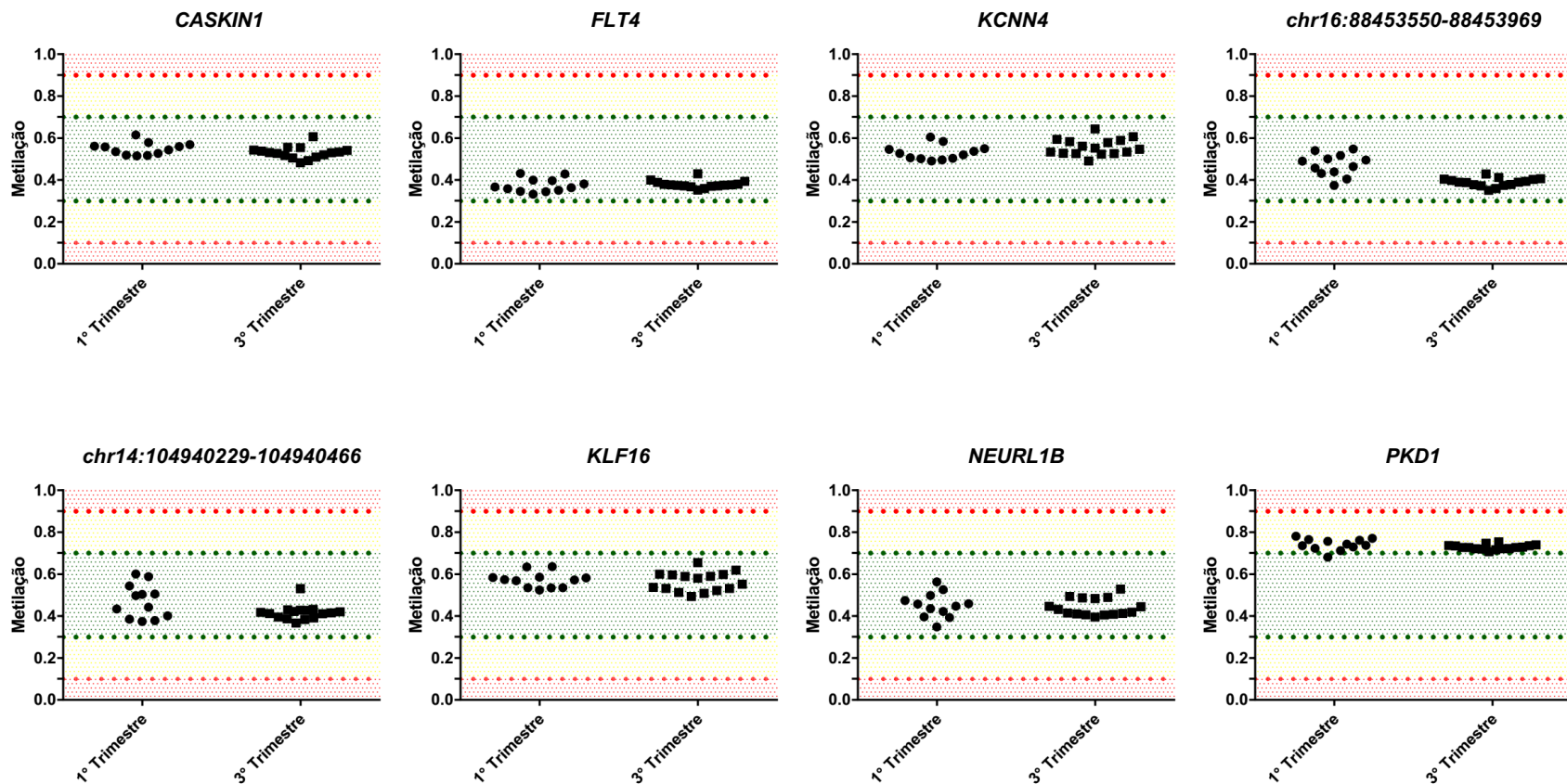


Figura 57. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentaria em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediaria (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediaria perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Não há evidência de polimorfismo de metilação placentaria nas regiões estudadas.

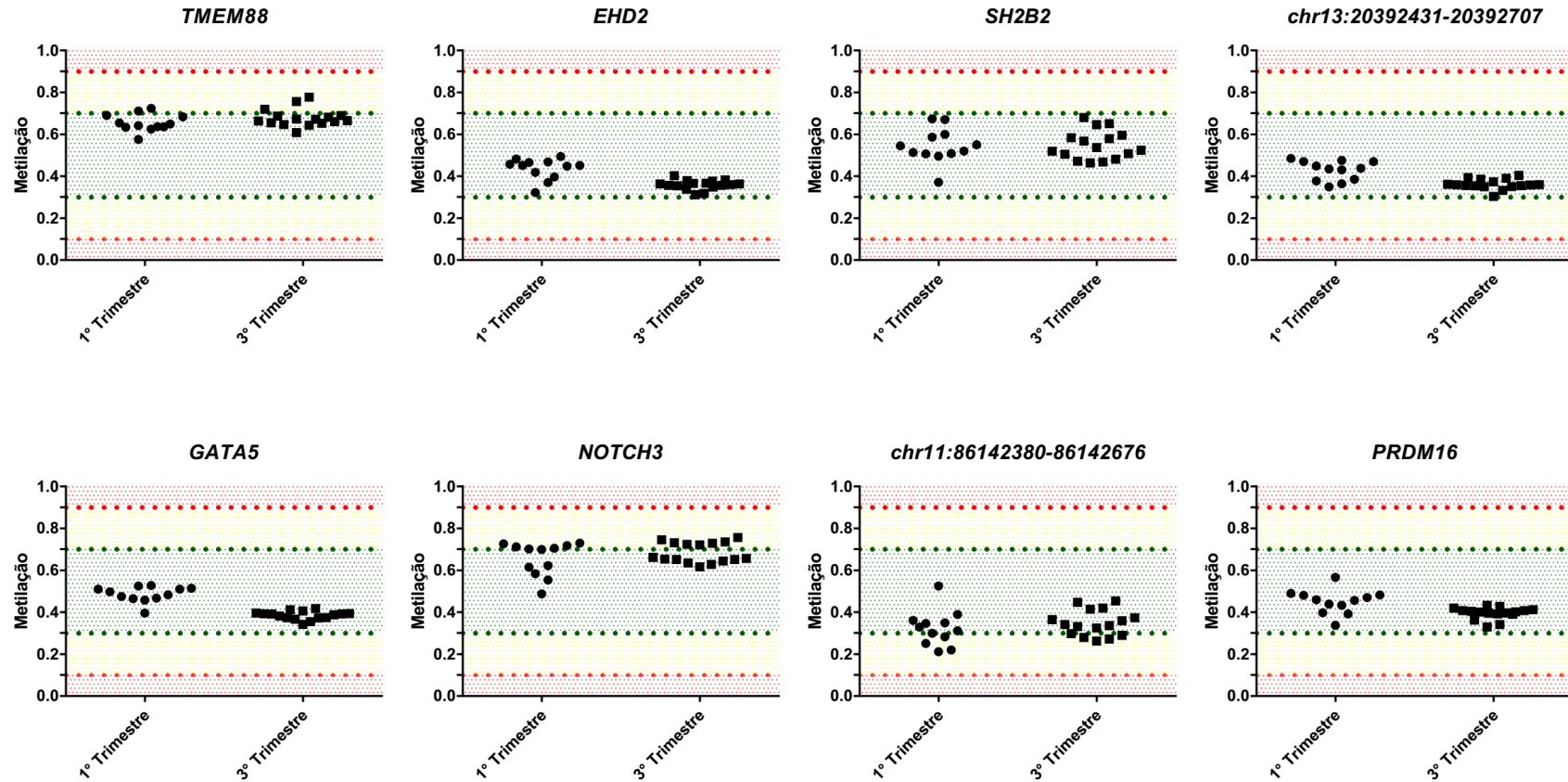


Figura 58. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentaria em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Não há evidência de polimorfismo de metilação placentaria nas regiões estudadas.

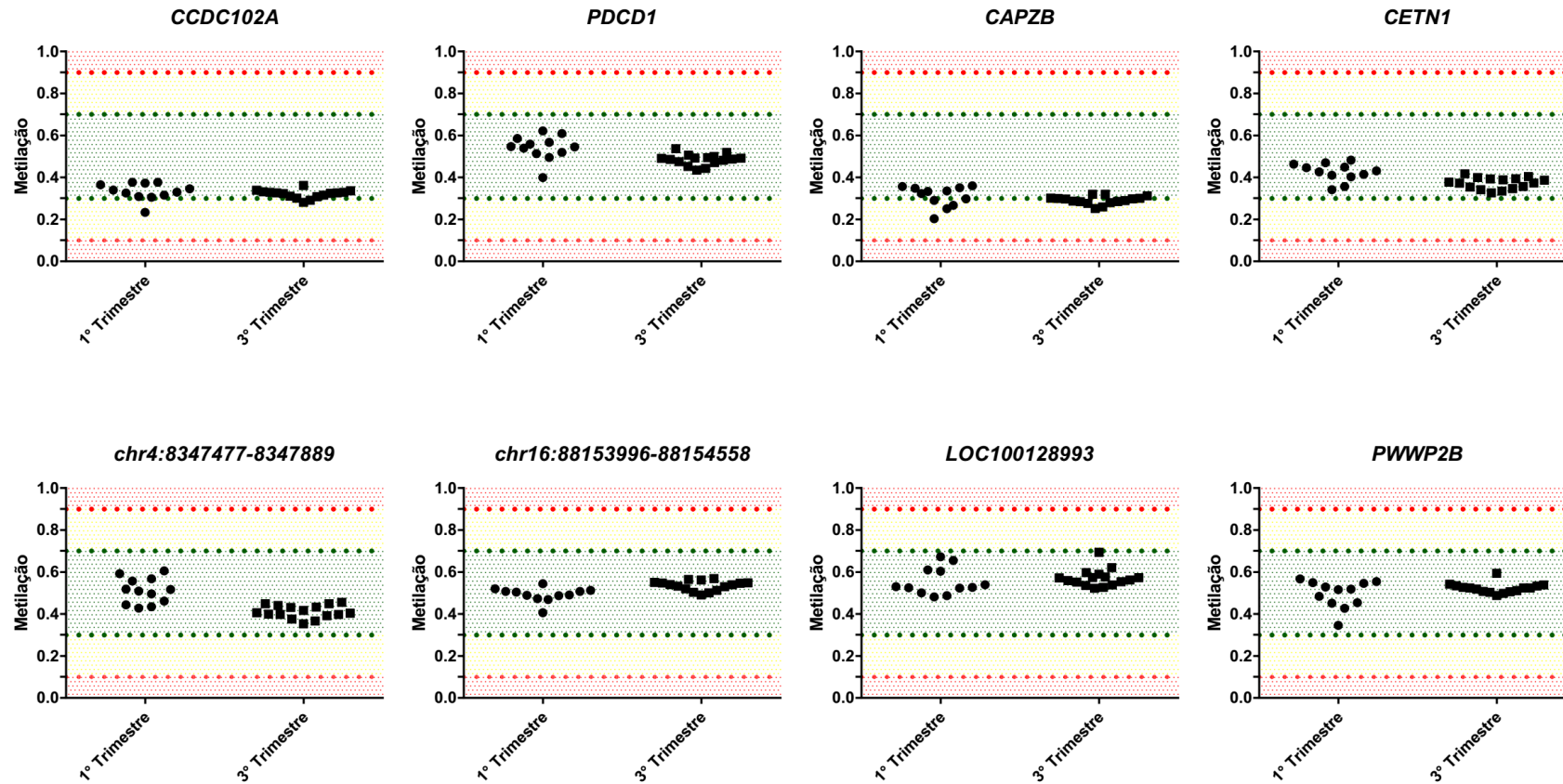


Figura 59. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Não há evidência de polimorfismo de metilação placentária nas regiões estudadas.

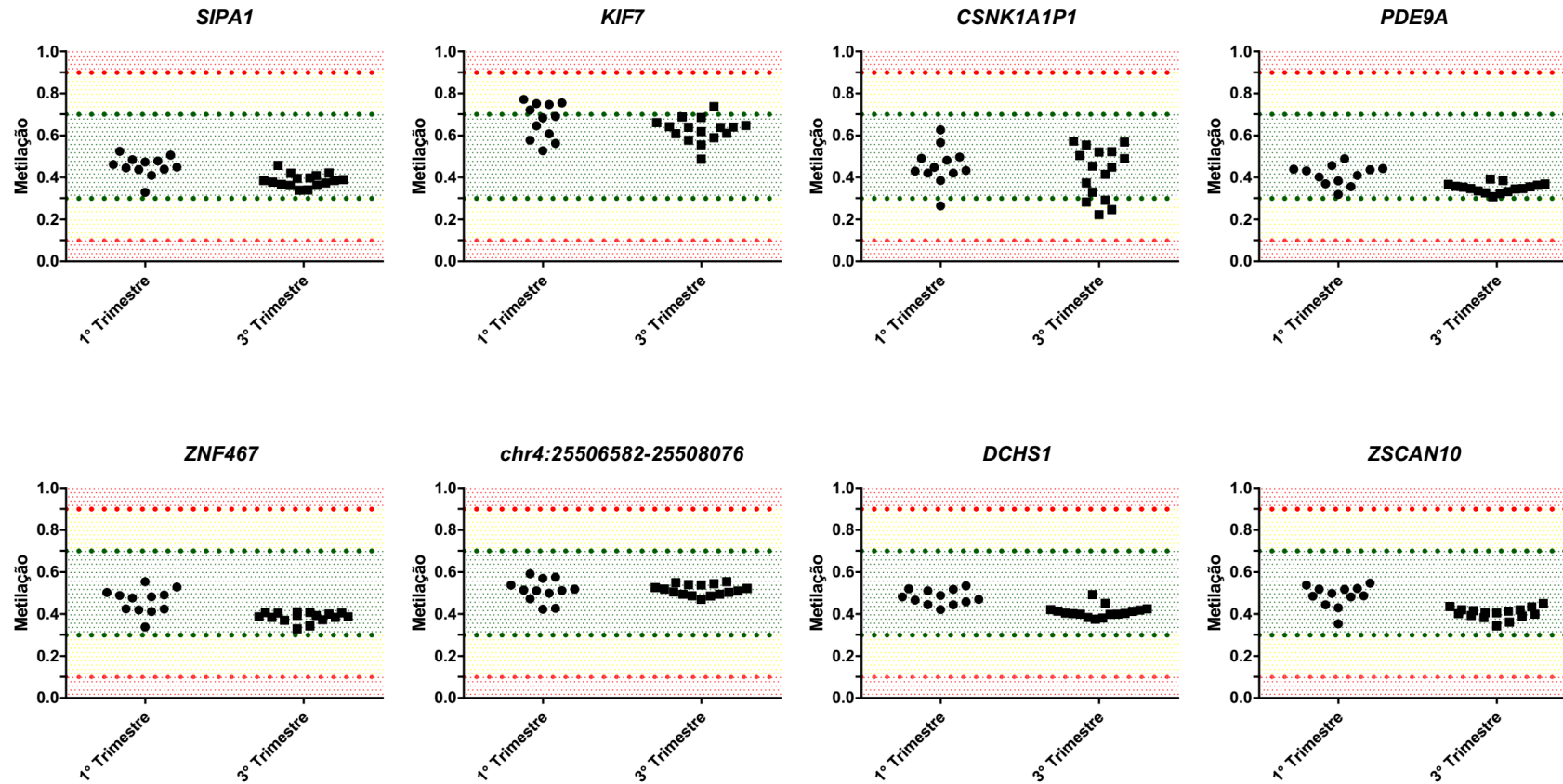


Figura 60. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Não há evidência de polimorfismo de metilação placentária nas regiões estudadas.

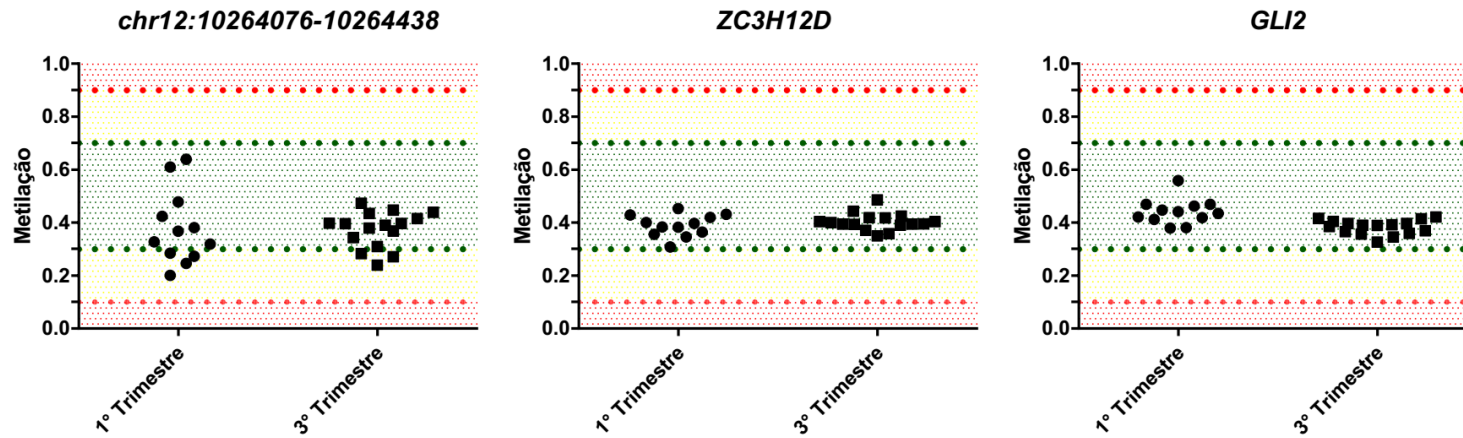
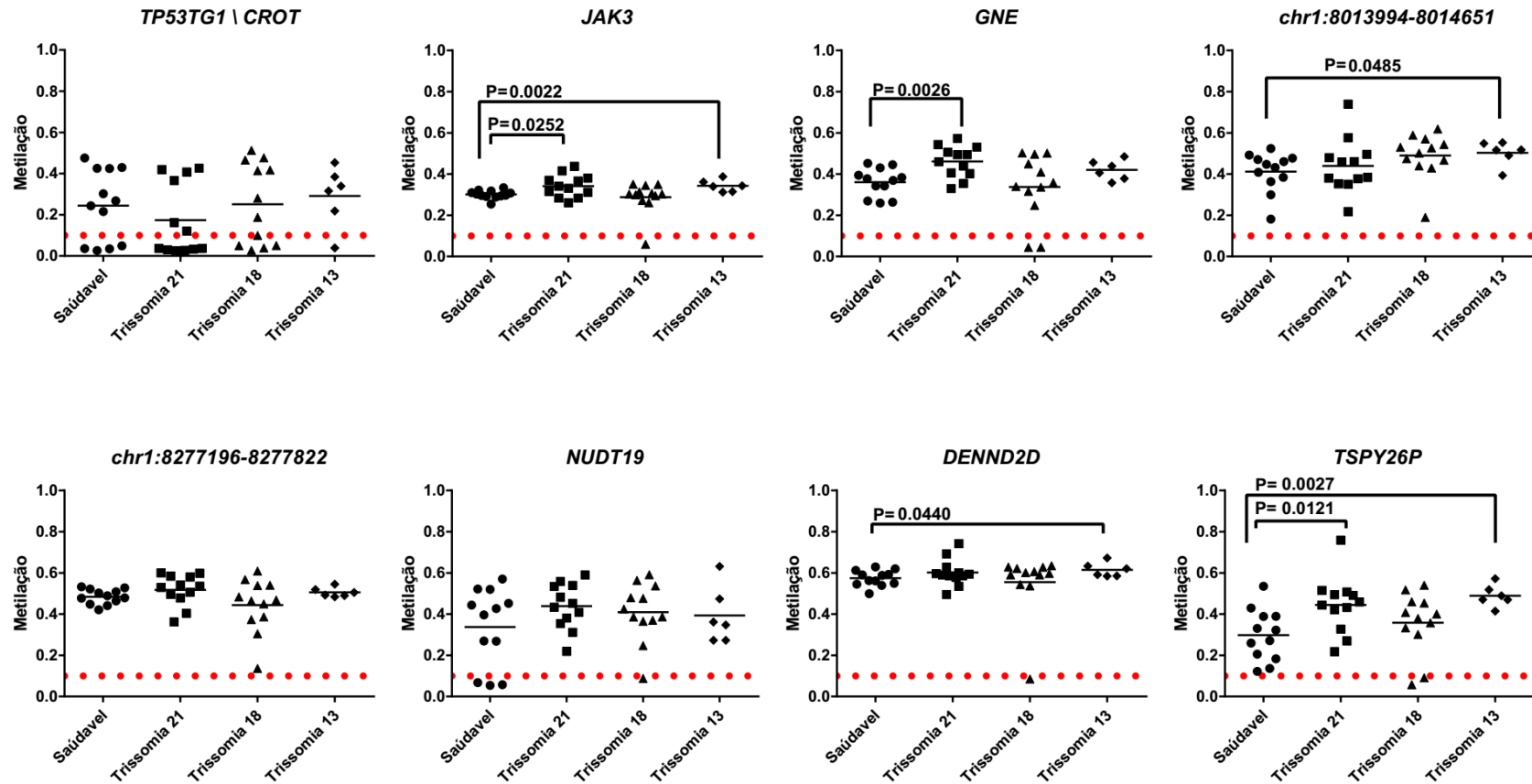


Figura 61. Teste de polimorfismo de metilação em DMRs secundárias candidatas.

Teste de polimorfismo de metilação placentária em oito genes distintos, no eixo X de cada gráfico se encontra a idade da placenta utilizada para calcular a média de metilação sendo que cada ponto representa o nível de metilação de uma placenta distinta. No eixo Y a esquerda o nível de metilação dividido em três intervalos distintos sendo eles: metilação intermediária (entre 0.3 e 0.7 de metilação), metilação intermediária perturbada (0.7 a 0.9 e 0.3 a 0.1) e polimorfismo (0.1 a 0 e 0.9 a 1). Não há evidência de polimorfismo de metilação placentária nas regiões estudadas.



6

Figura 62. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados três não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto a DMR presente no gene *JAK3* apresentou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 21 e 13, o gene *GNE* demonstrou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 21, a DMR presente no *chr1:8013994-8014651* e nos genes *DENND2D* e *TSPY26P* apresentaram aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 13. Além disso a DMR presente no gene *TSPY26P* apresentou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 21.

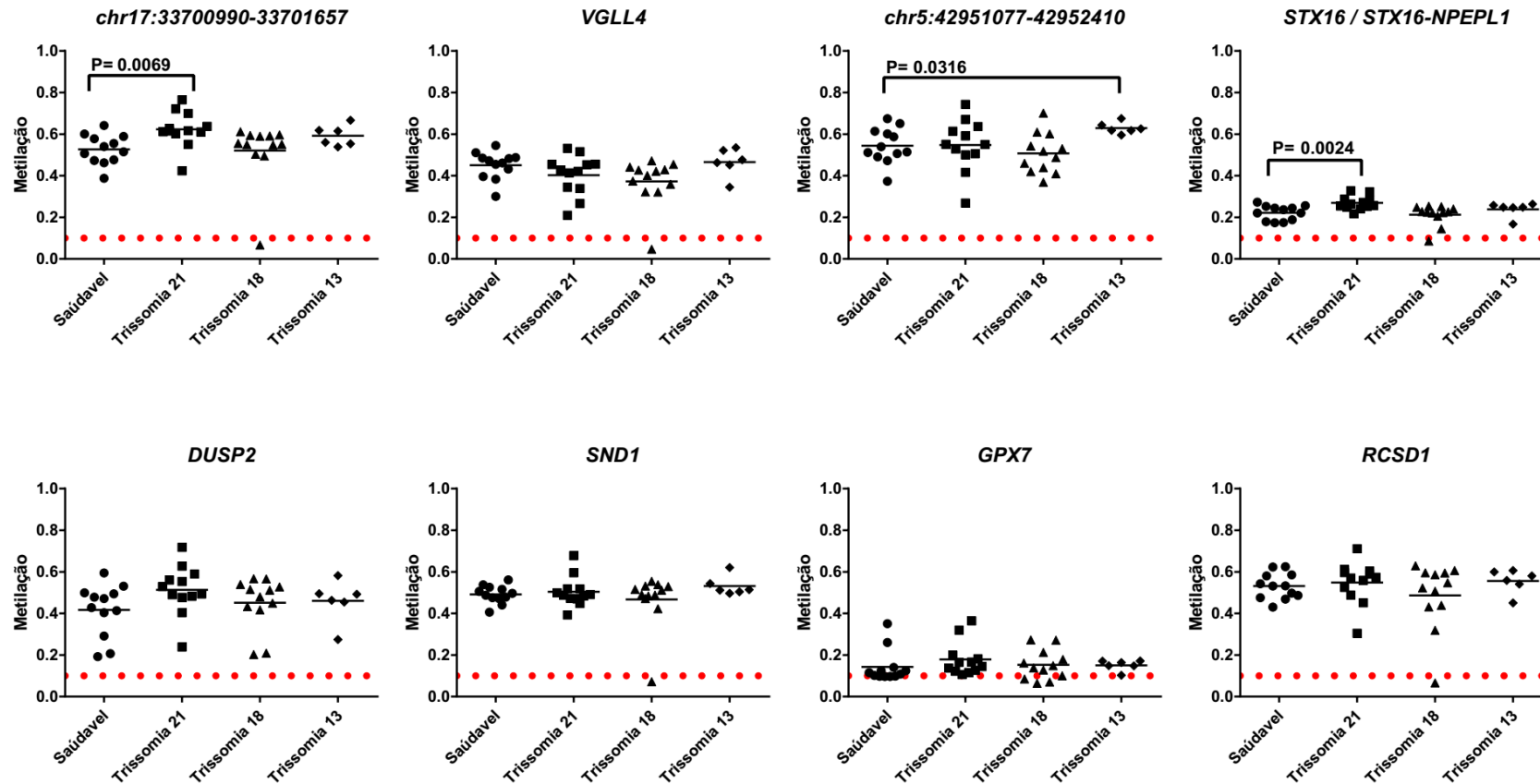


Figura 63. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da média dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados cinco não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saudáveis e trissômicas enquanto a DMR presente na posição *chr17:33700990-33701657* apresentou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 21, o gene *STX16 / STX16-NPEPL1* demonstrou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 21, a DMR presente no *chr5:42951077-42952410* demonstrou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 13.

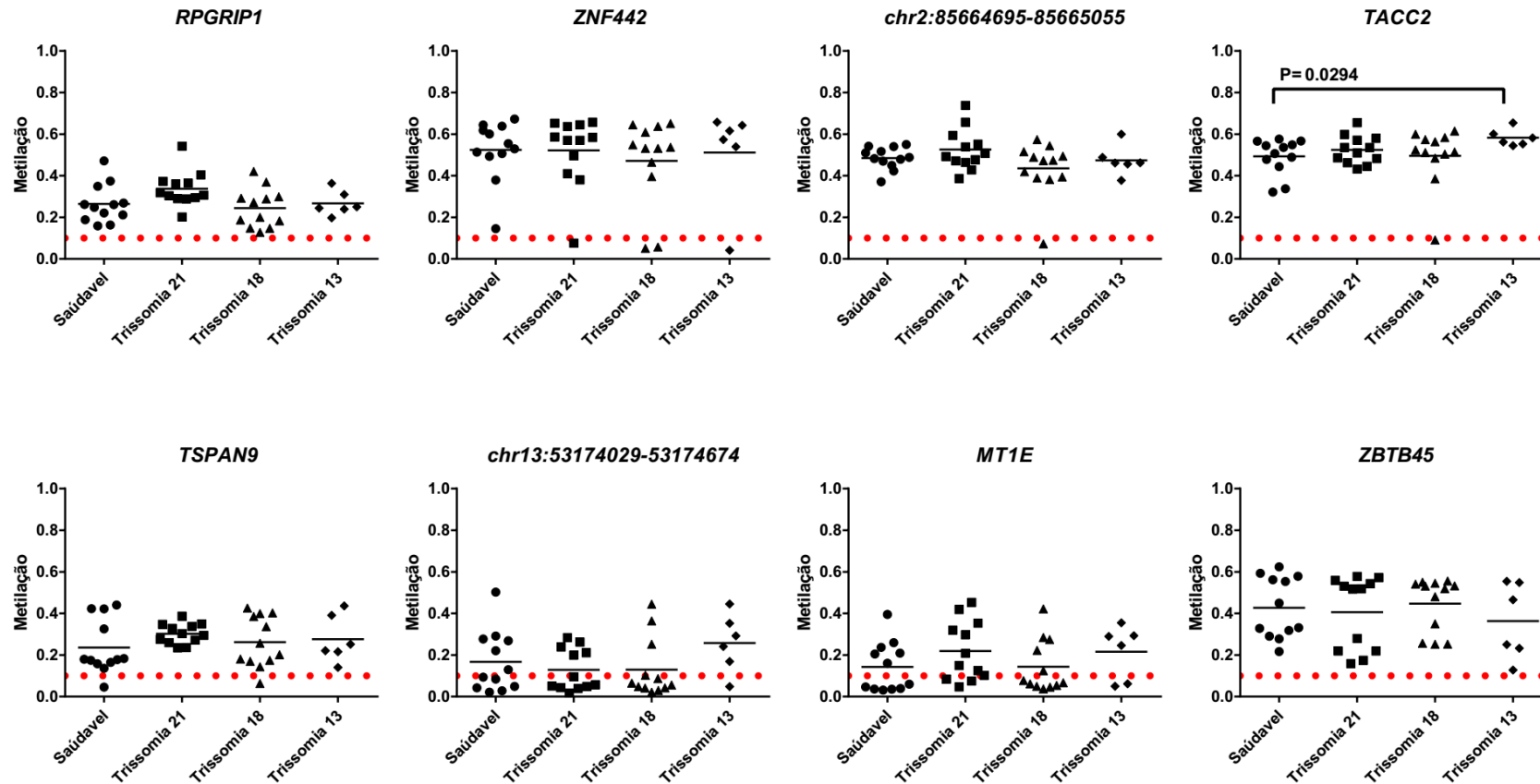


Figura 64. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados sete não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto a DMR presente no gene *TACC2* demonstrou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 13.

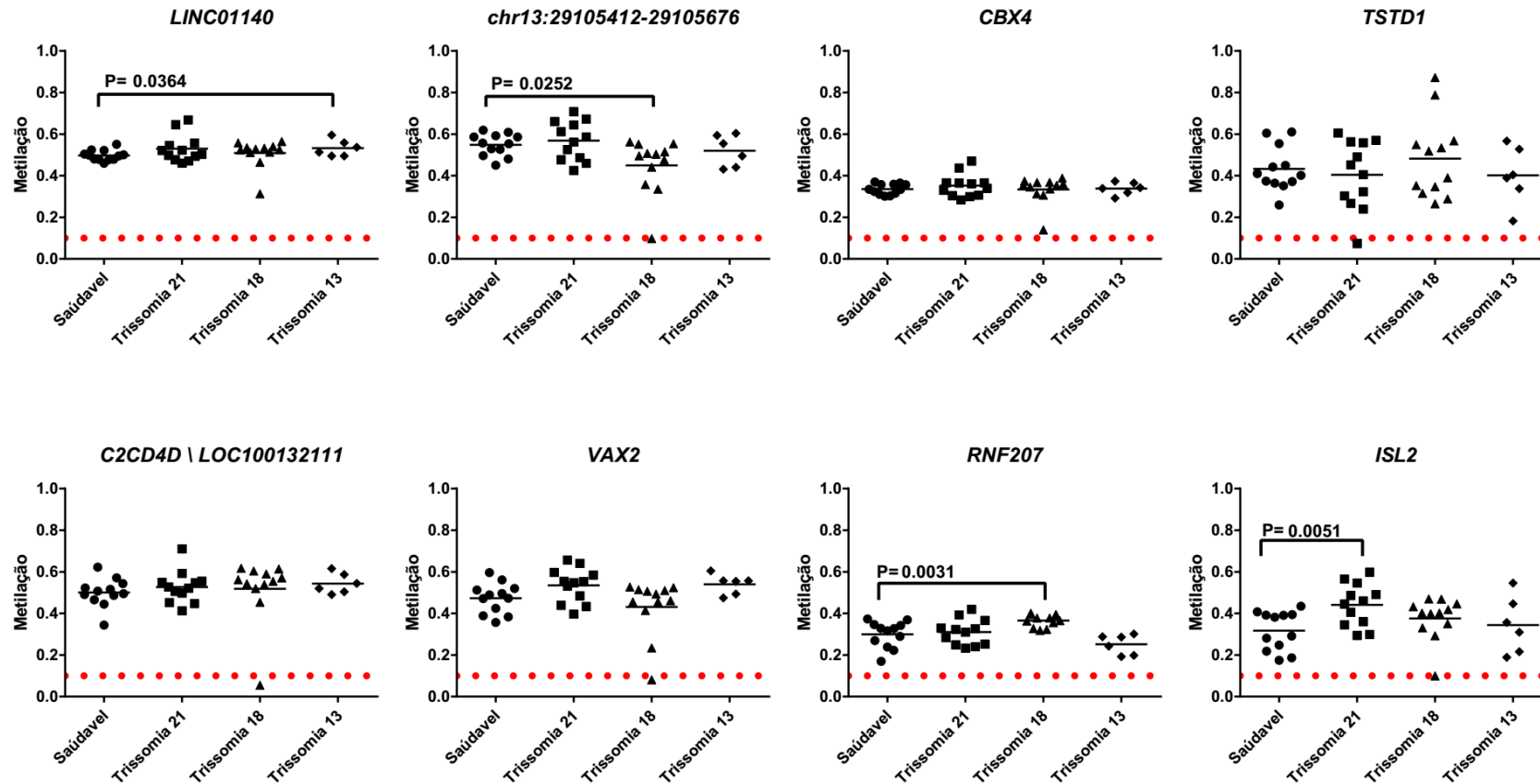


Figura 65. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados quatro não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto a DMR presente no gene *LINC01140* demonstrou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 13, a DMR presente no gene *RNF207* e a posição física chr13:29105412-29105676 demonstrou aumento de metilação estatisticamente significativo para amostras de trissomia 13 enquanto a DMR presente no gene *ISL2* demonstrou aumento de metilação estatisticamente significativo para amostras de trissomia 21.

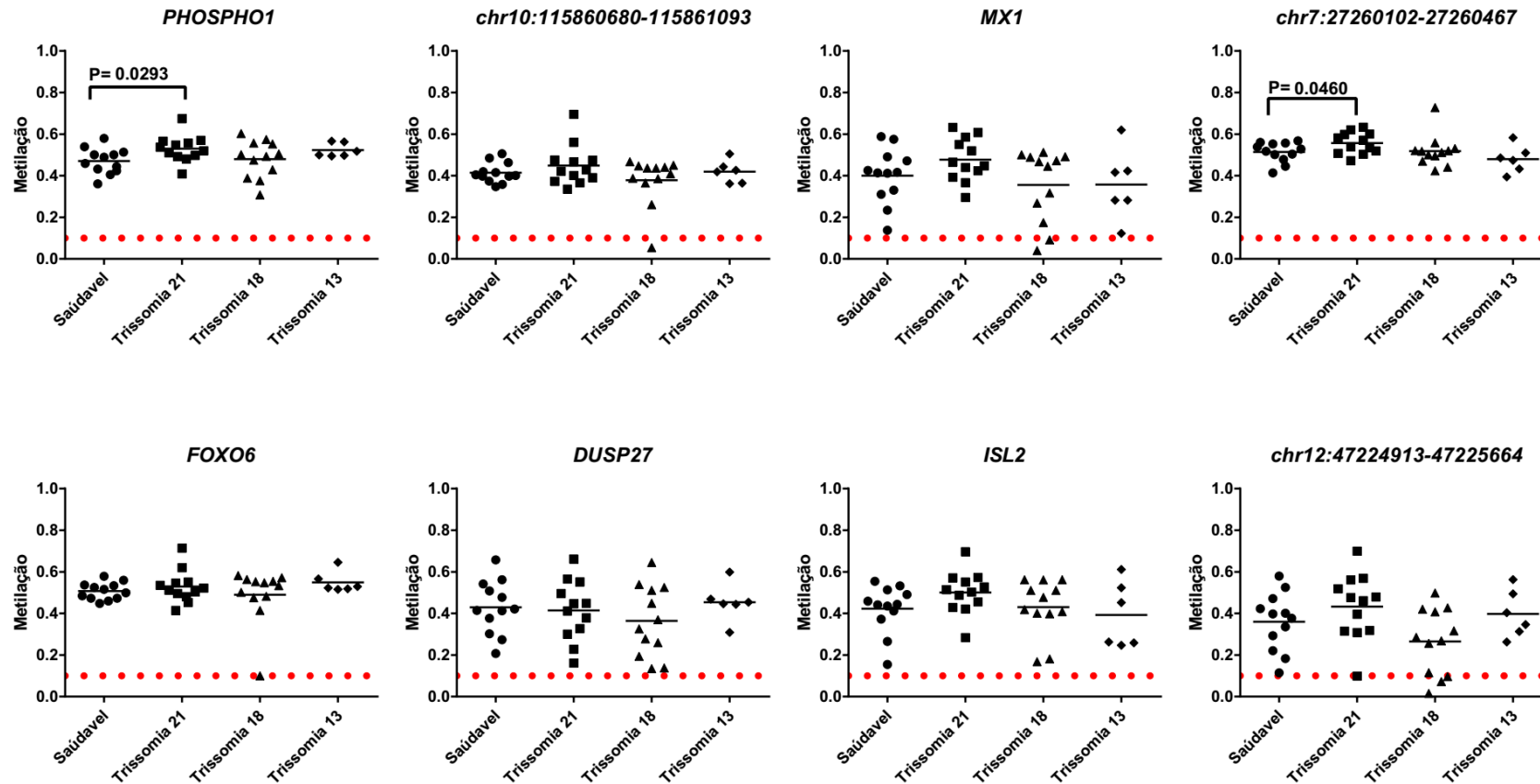


Figura 66. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados seis não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto a DMR presente *PHOSPHO1* e a posição física chr7: 27260102-27260467 apresentaram aumento de metilação estatisticamente significativo para as amostras de trissomia 21.

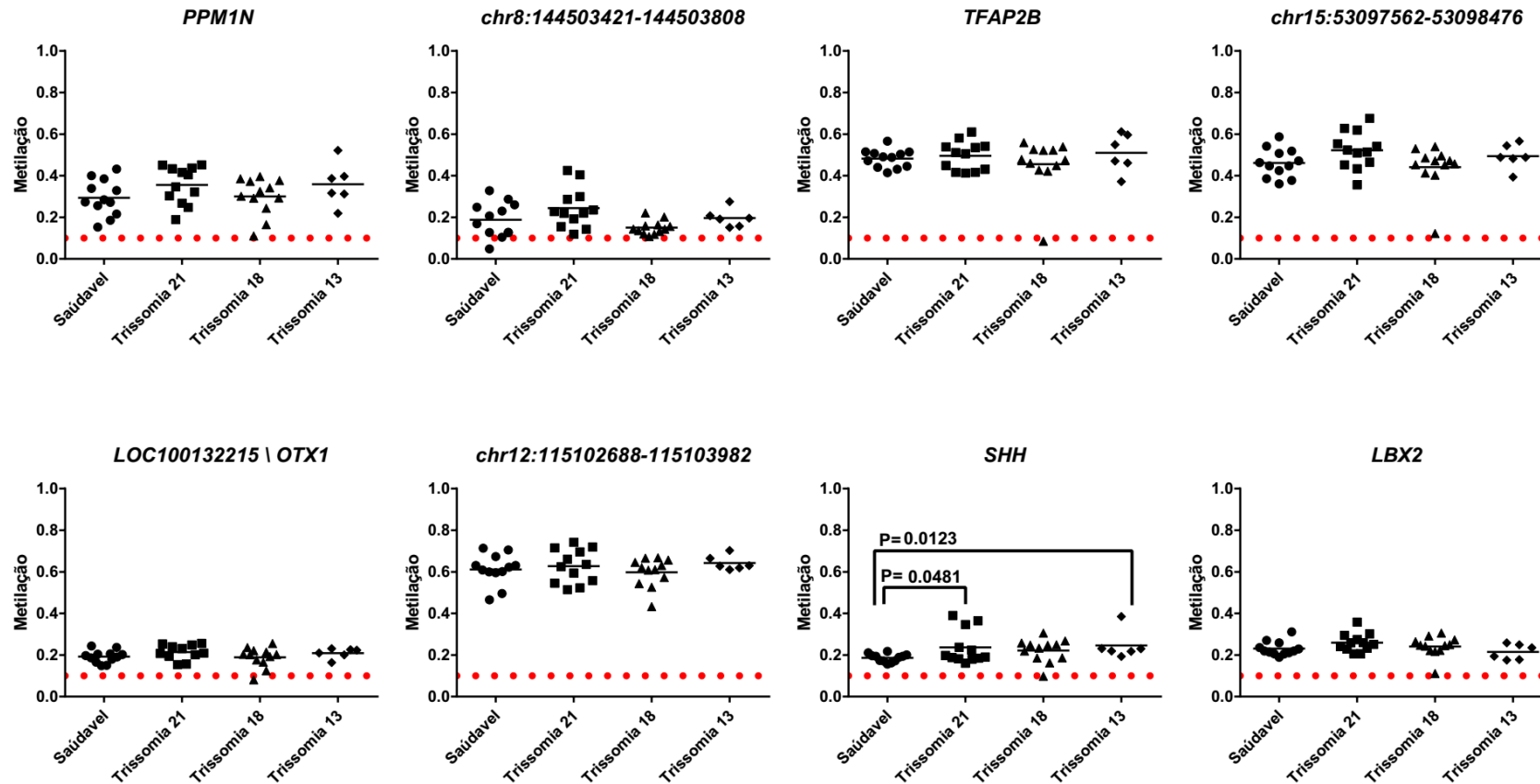


Figura 67. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados sete não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto a DMR presente no gene *SHH* demonstrou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 21 e 13.

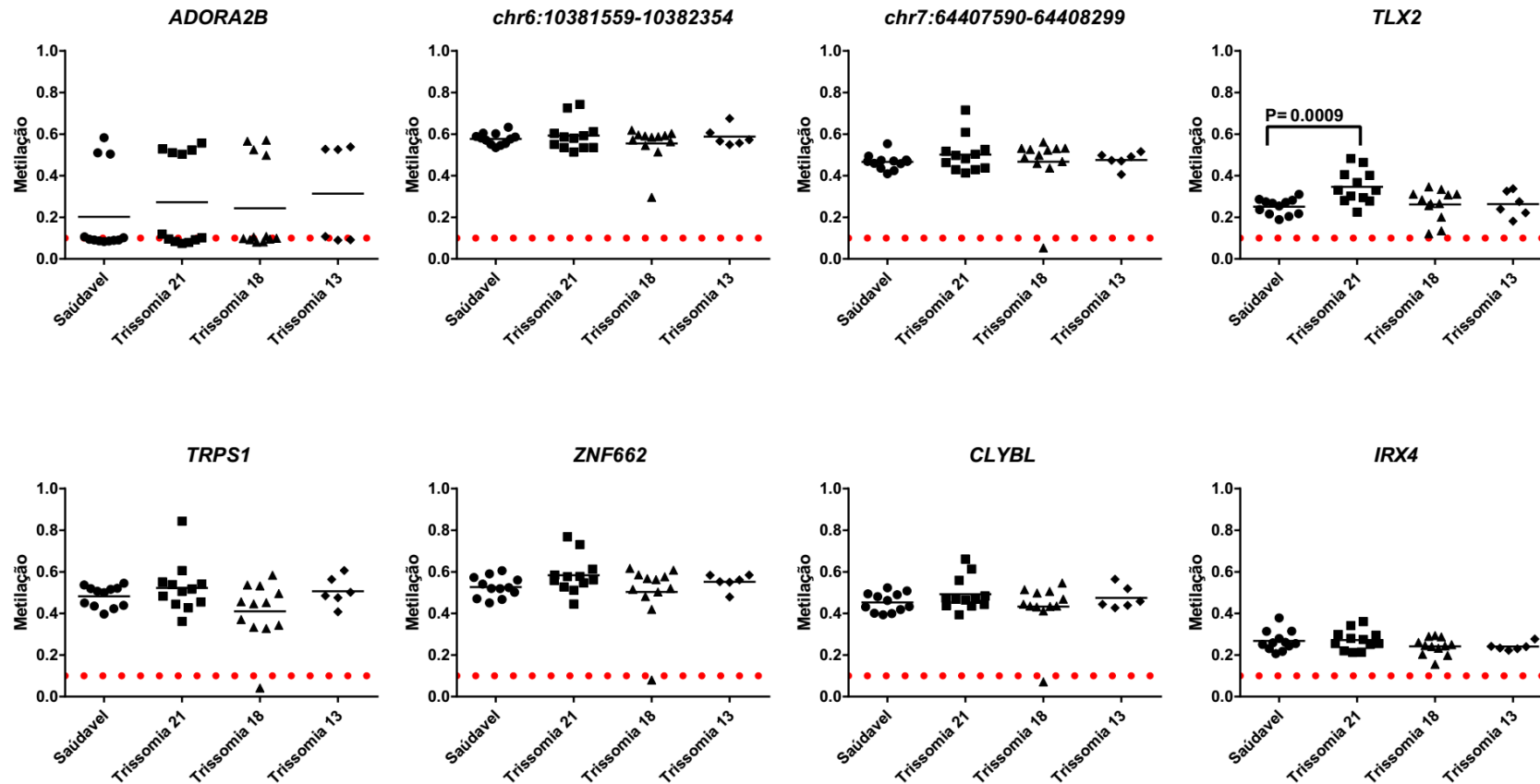


Figura 68. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados sete não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto a DMR presente no gene *TLX2* demonstrou aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 21.

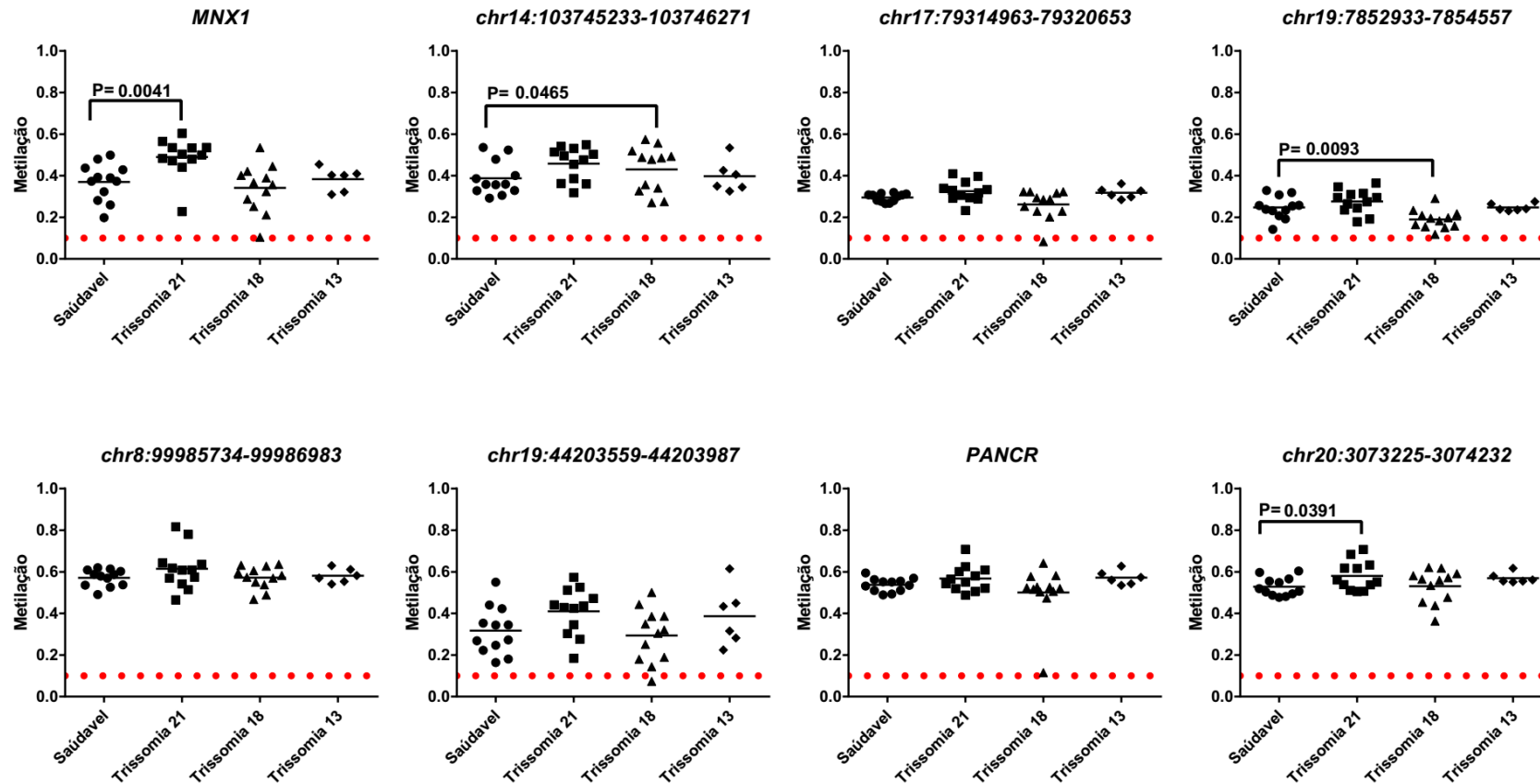


Figura 69. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da média dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados quatro não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saudáveis e trissômicas enquanto as DMRs presentes nas posições físicas *chr19:7852933-7854557* e *chr14:103745233-103746271* demonstraram aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 18 enquanto a DMR presente na posição física *chr20:3073225-3074232* e no gene *MNX1* demonstrou aumento de metilação estatisticamente significativo para as amostras de trissomia 21.

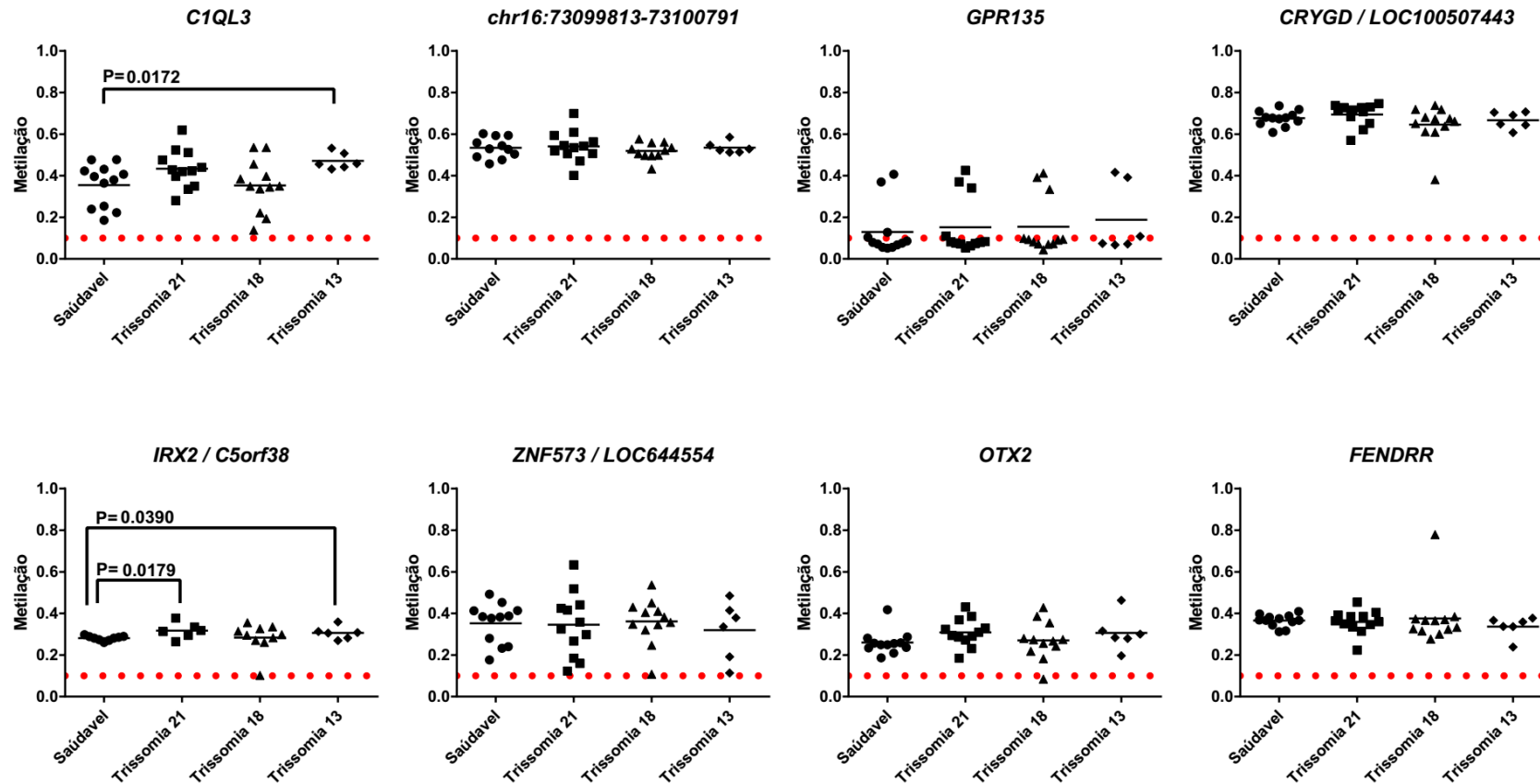


Figura 70. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados seis não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto as DMRs presentes nos genes *C1QL3* e *IRX2 / C5orf38* demonstraram aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 13 enquanto apenas a DMR presente no gene *IRX2 / C5orf38* demonstrou aumento estatisticamente significativo para as amostras de trissomia 21.

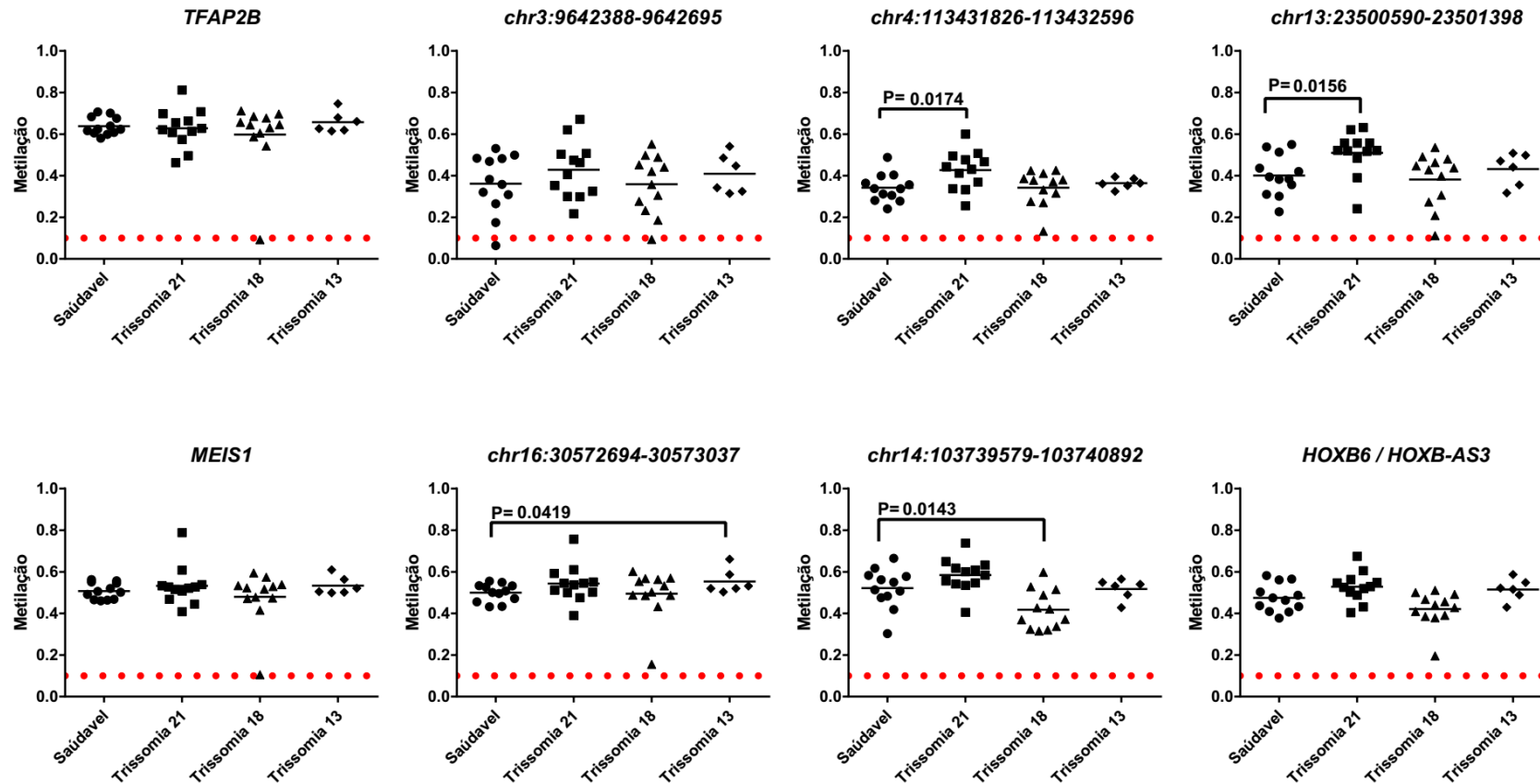


Figura 71. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da média dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados cinco não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saudáveis e trissômicas enquanto as DMRs presentes nas posições físicas *chr4:113431826-113432596* e *chr13:23500590-23501398* demonstraram aumento de metilação estatisticamente significativo nas amostras de trissomia 21 enquanto as DMRs presentes nas posições físicas *chr16:30572694-30573037* e *chr14:103739579-103740892* demonstraram respectivamente aumento de metilação na trissomia 13 e redução da metilação nas amostras de trissomia 18.

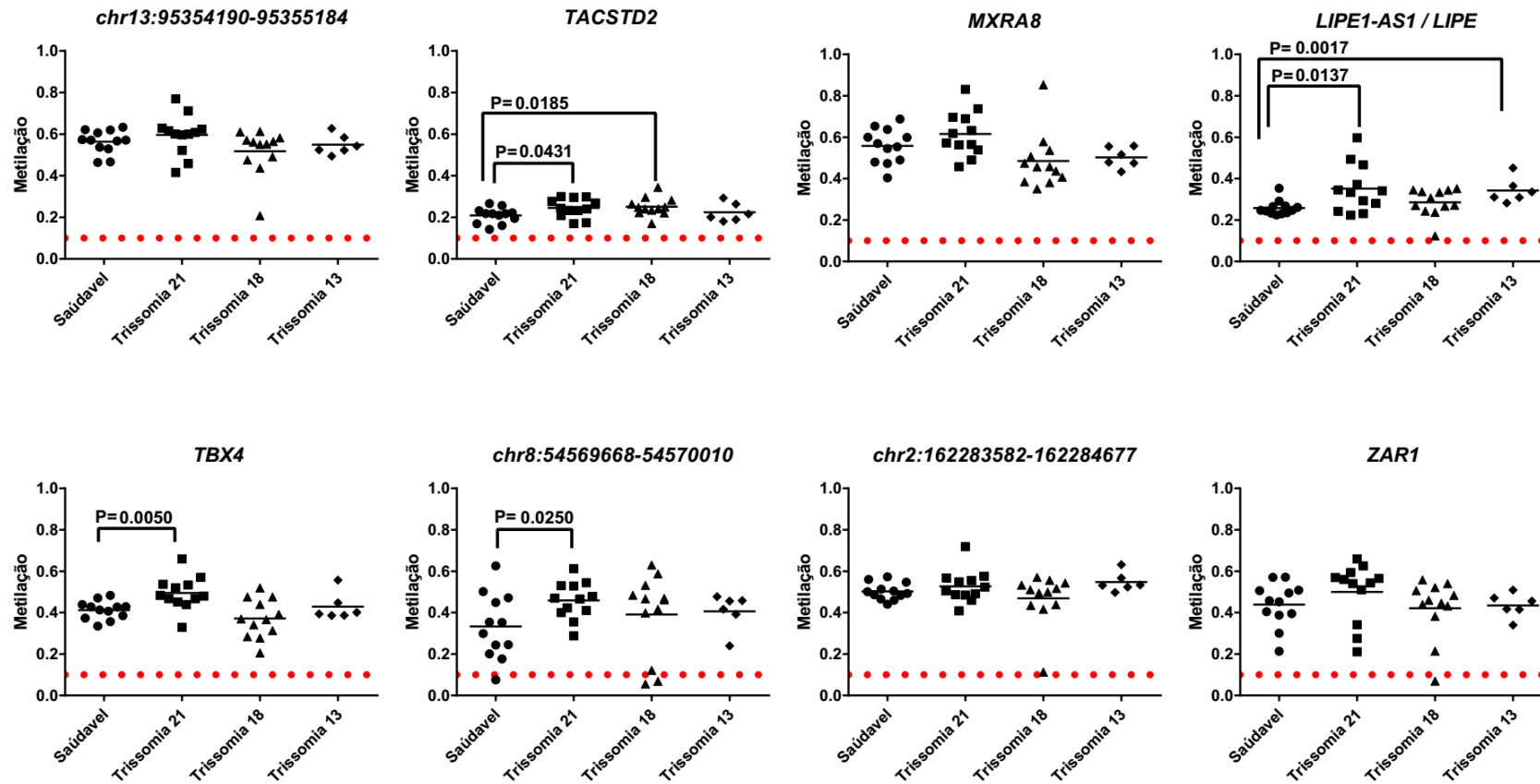


Figura 72. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da média dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados quatro não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saudáveis e trissômicas enquanto as DMRs presentes nos genes *TACSTD2*, *LIPE1-AS1 / LIPE* e *TBX4* e posição física *chr8:54569668-54570010* demonstraram aumento de metilação nas amostras de trissomia 21 enquanto a DMR presente no gene *TACSTD2* demonstrou aumento de metilação nas amostras de metilação de trissomia 18 enquanto o gene *LIPE1-AS1 / LIPE* demonstrou aumento de metilação para as amostras de trissomia 13.

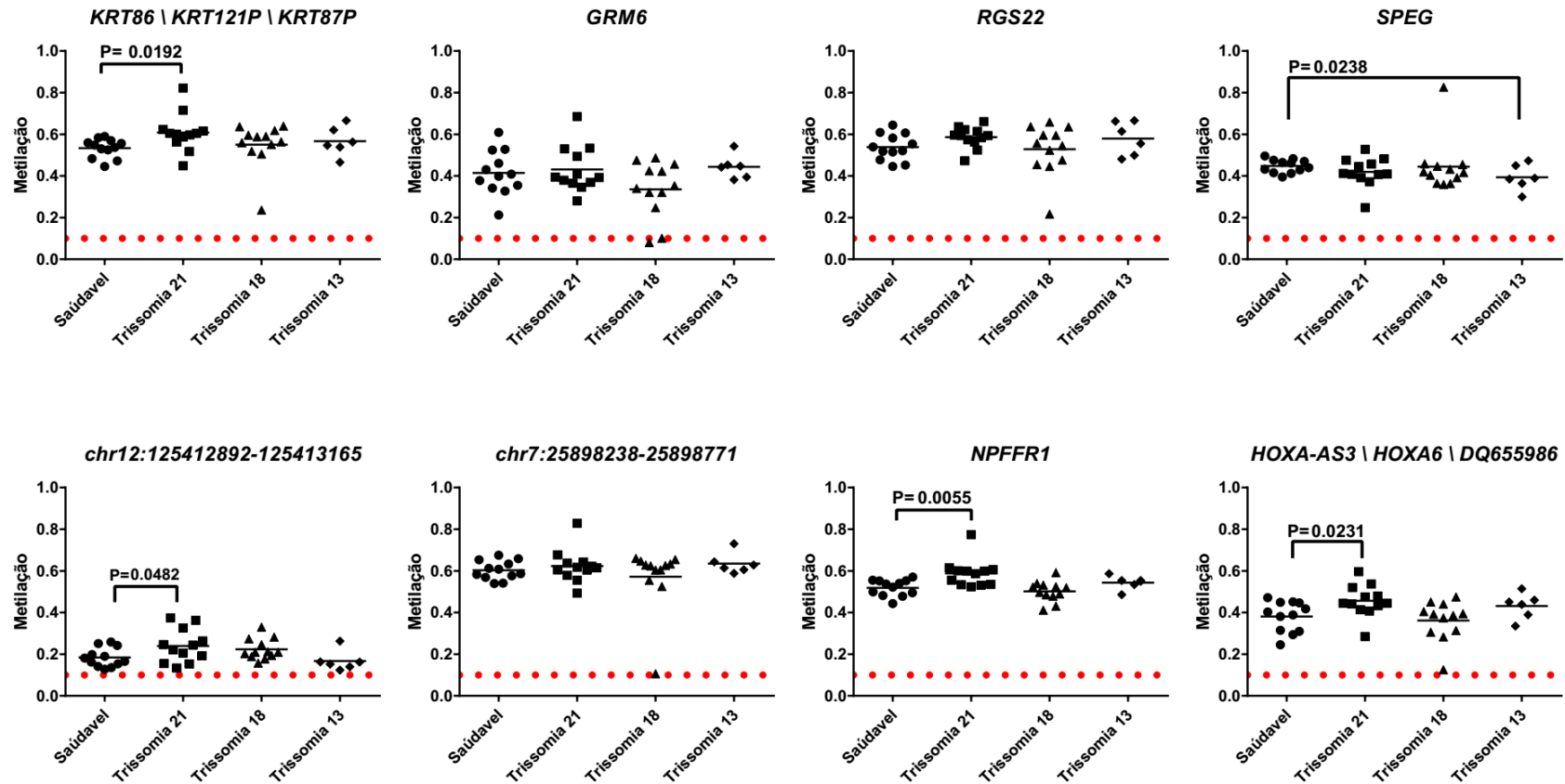


Figura 73. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da média dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados três não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saudáveis e trissômicas enquanto as DMRs presentes nos genes *KRT86 \ KRT121P \ KRT97P*, *HOXA-AS3 \ HOXA6 \ DQ655986*, *NPFFR1* e posição física *chr12:125312892-125413165* demonstraram aumento de metilação para as amostras de trissomia 21 enquanto a DMR presente no gene *SPEG* demonstrou redução de metilação nas amostras de trissomia 13.

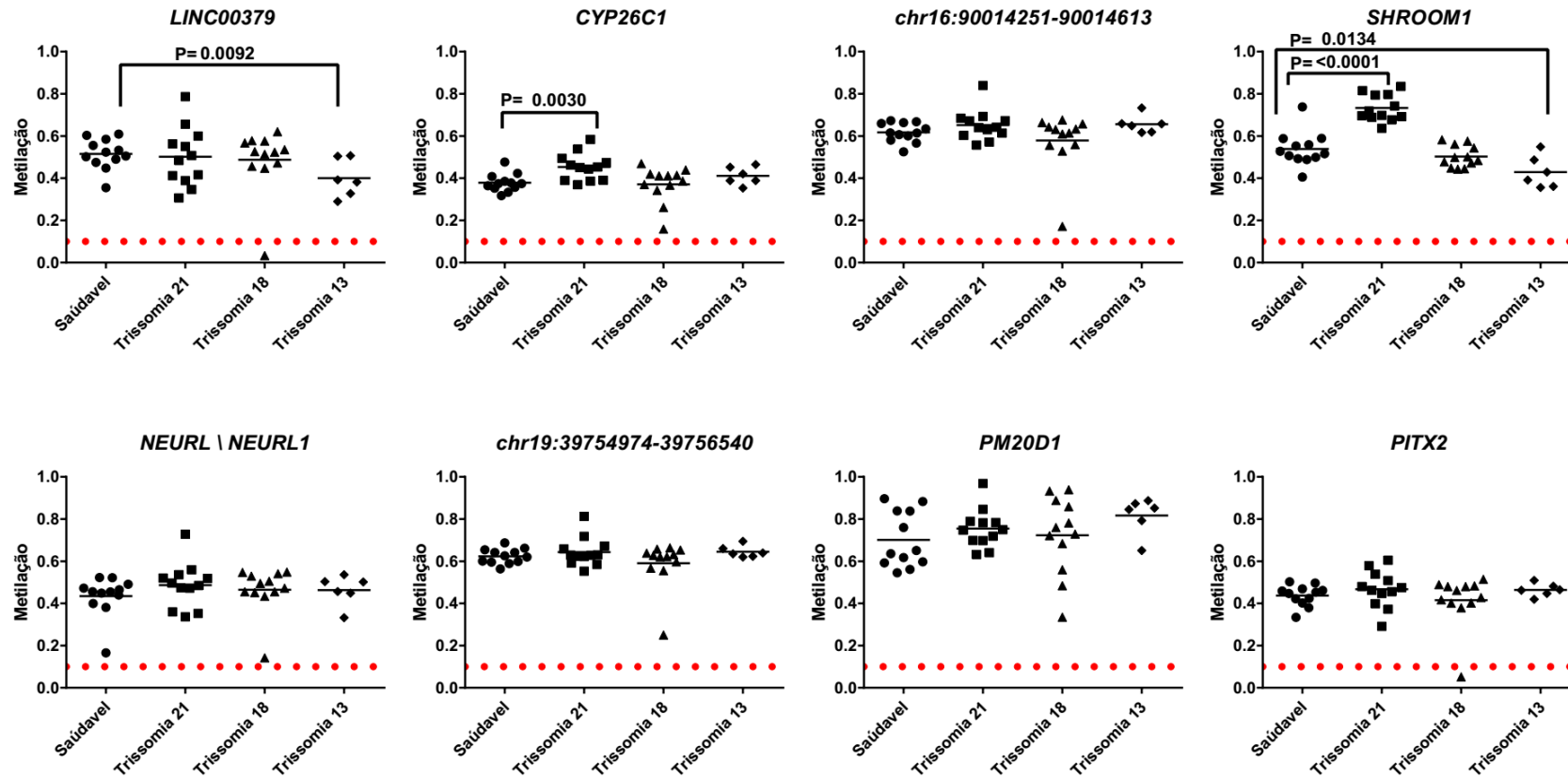


Figura 74. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados cinco não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto as DMRs presentes nos genes *SHROOM 1* e *CYP26C1* demonstraram aumento de metilação nas amostras de trissomia 21 enquanto as DMRs presentes nos genes *LINC00379* e *SHROOM1* demonstraram redução de metilação nas amostras de metilação de trissomia 13.

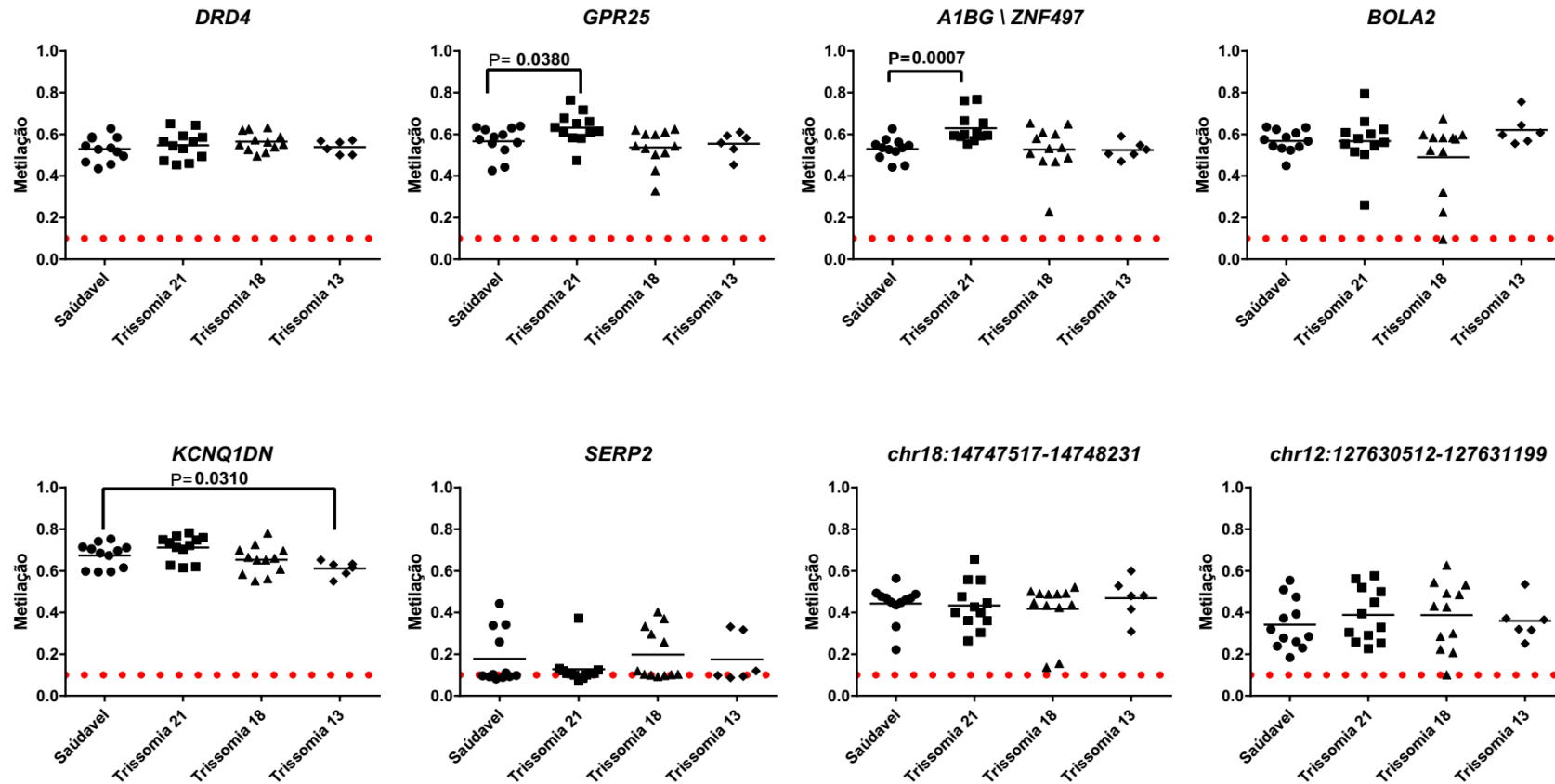


Figura 75. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados cinco não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto as DMRs presentes nos genes *GPR25* e *A1BG \ ZNF497* demonstraram aumento de metilação nas amostras de trissomia 21 enquanto a DMR presentes no gene *KCNQ1DN* demonstrou redução de metilação nas amostras de metilação de trissomia 13.

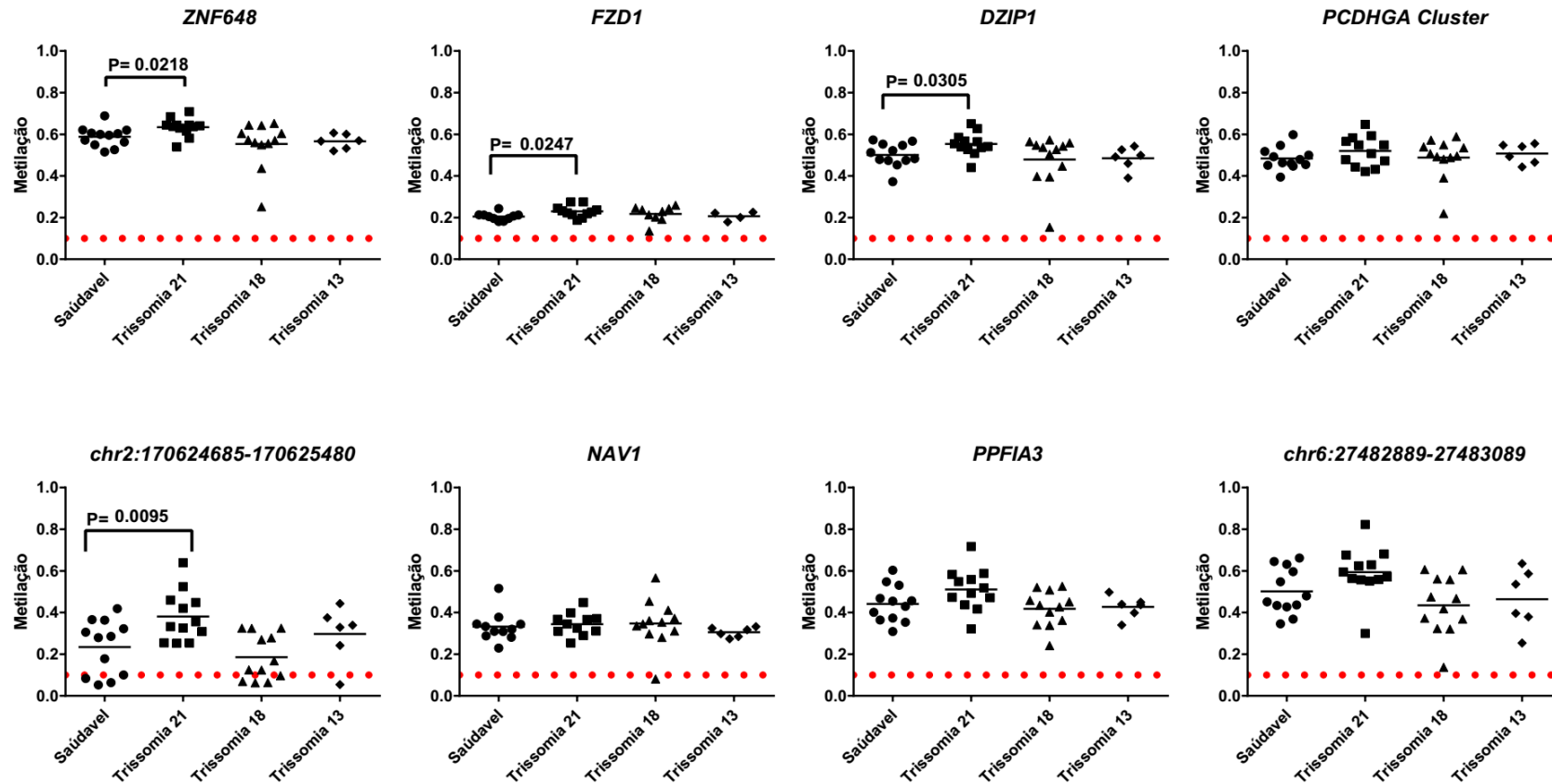


Figura 76. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados quatro não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto as DMRs presentes nos genes *ZNF648*, *FZD1*, *DZIP1* e posição física *chr2:170624685-170625480* demonstraram aumento de metilação nas amostras de trissomia 21.

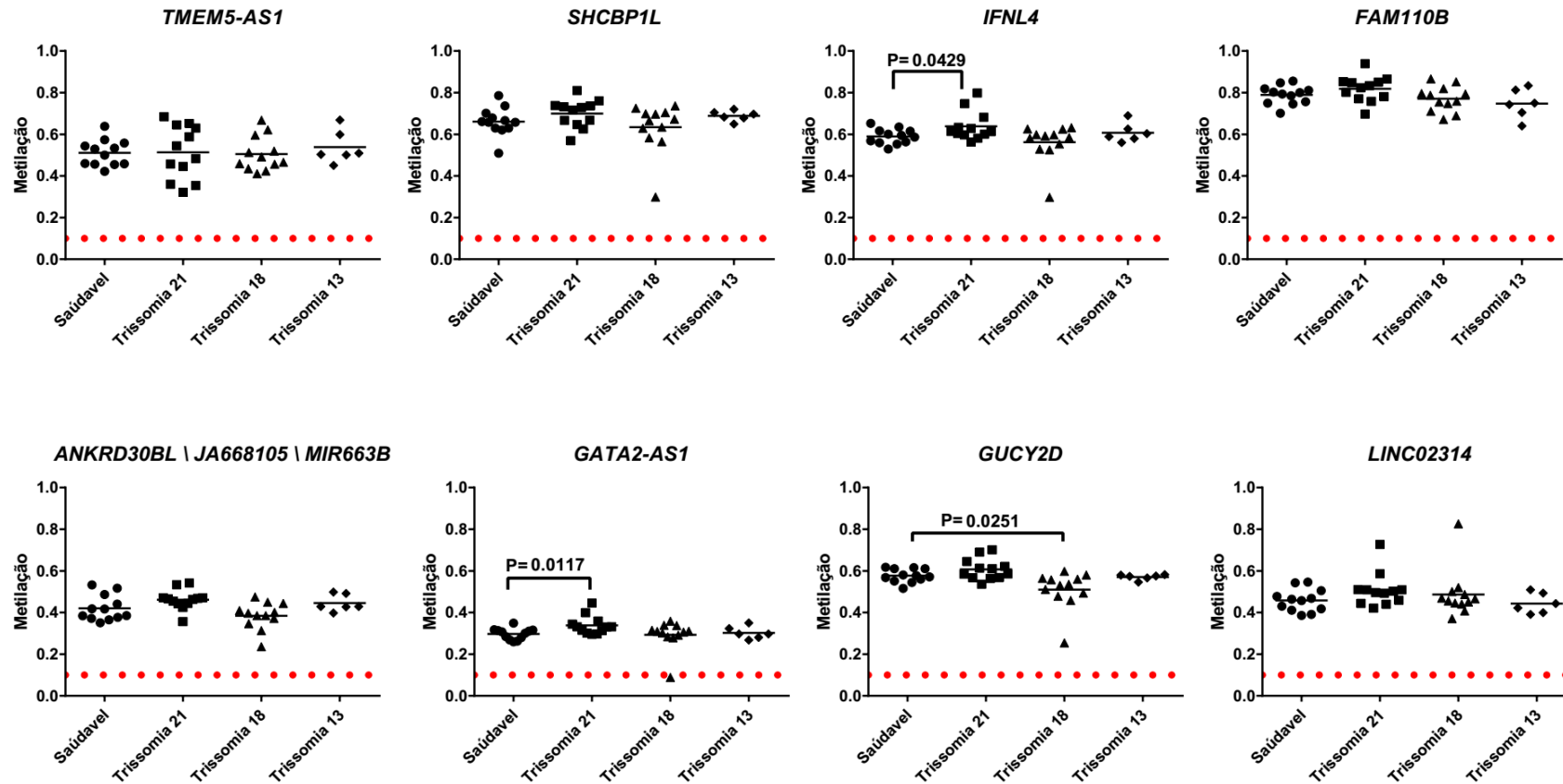


Figura 77. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da média dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados cinco não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saudáveis e trissômicas enquanto as DMRs presentes nos genes *IFNL4* e *GATA2-AS1* demonstraram aumento de metilação nas amostras de trissomia 21 enquanto a DMR presente no gene *GUCY2D* demonstrou redução de metilação nas amostras de metilação de trissomia 13.

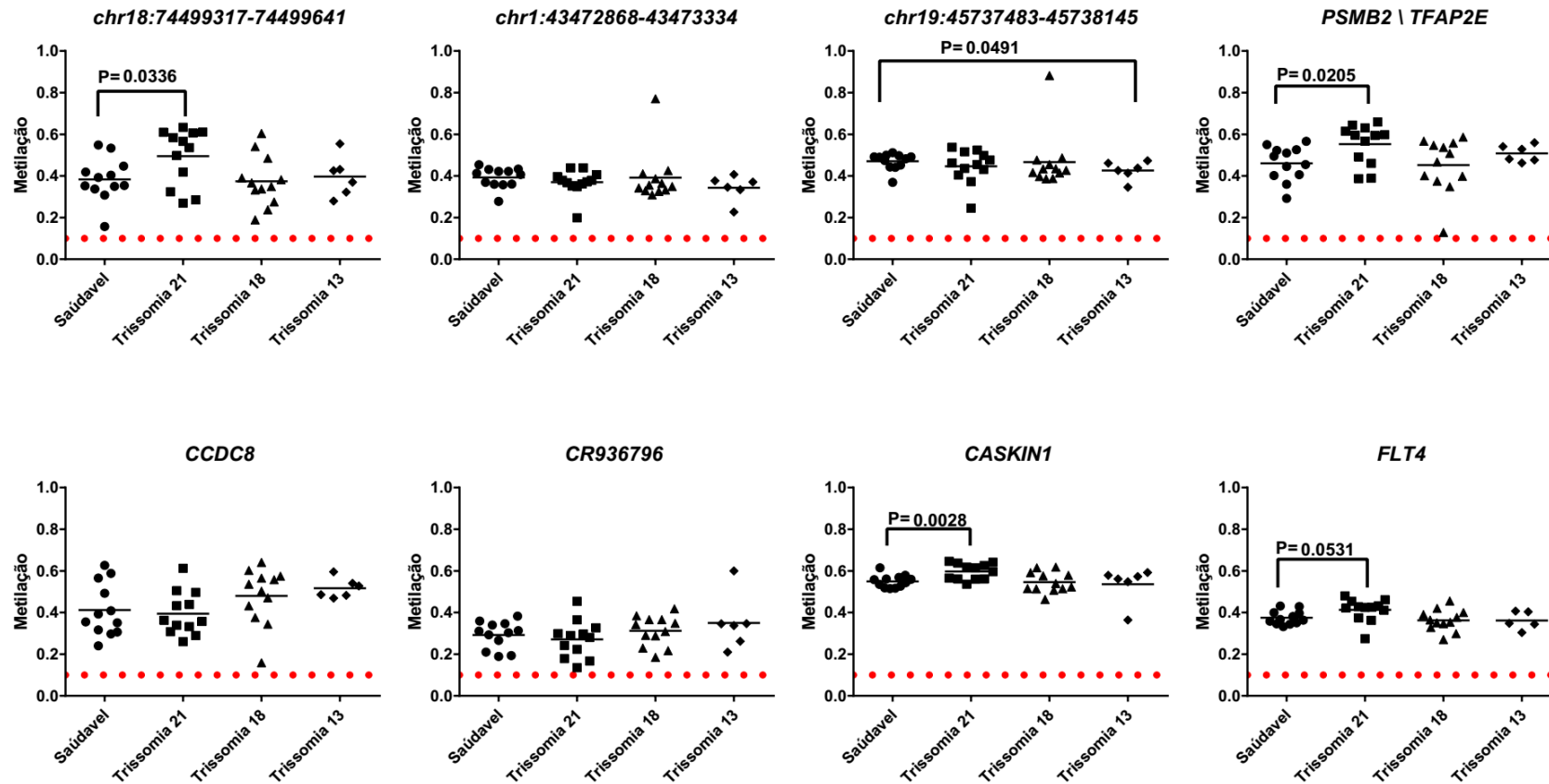


Figura 78. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados quatro não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto as DMRs presentes nos genes *PSMB2 \ TFAP2E*, *CASKIN1*, *FLT4* e a posição física *chr18:74499317-74499641* demonstraram aumento de metilação nas amostras de trissomia 21 enquanto a DMR presente na posição física *chr19:45737483-45738145* demonstrou redução de metilação nas amostras de metilação de trissomia 13.

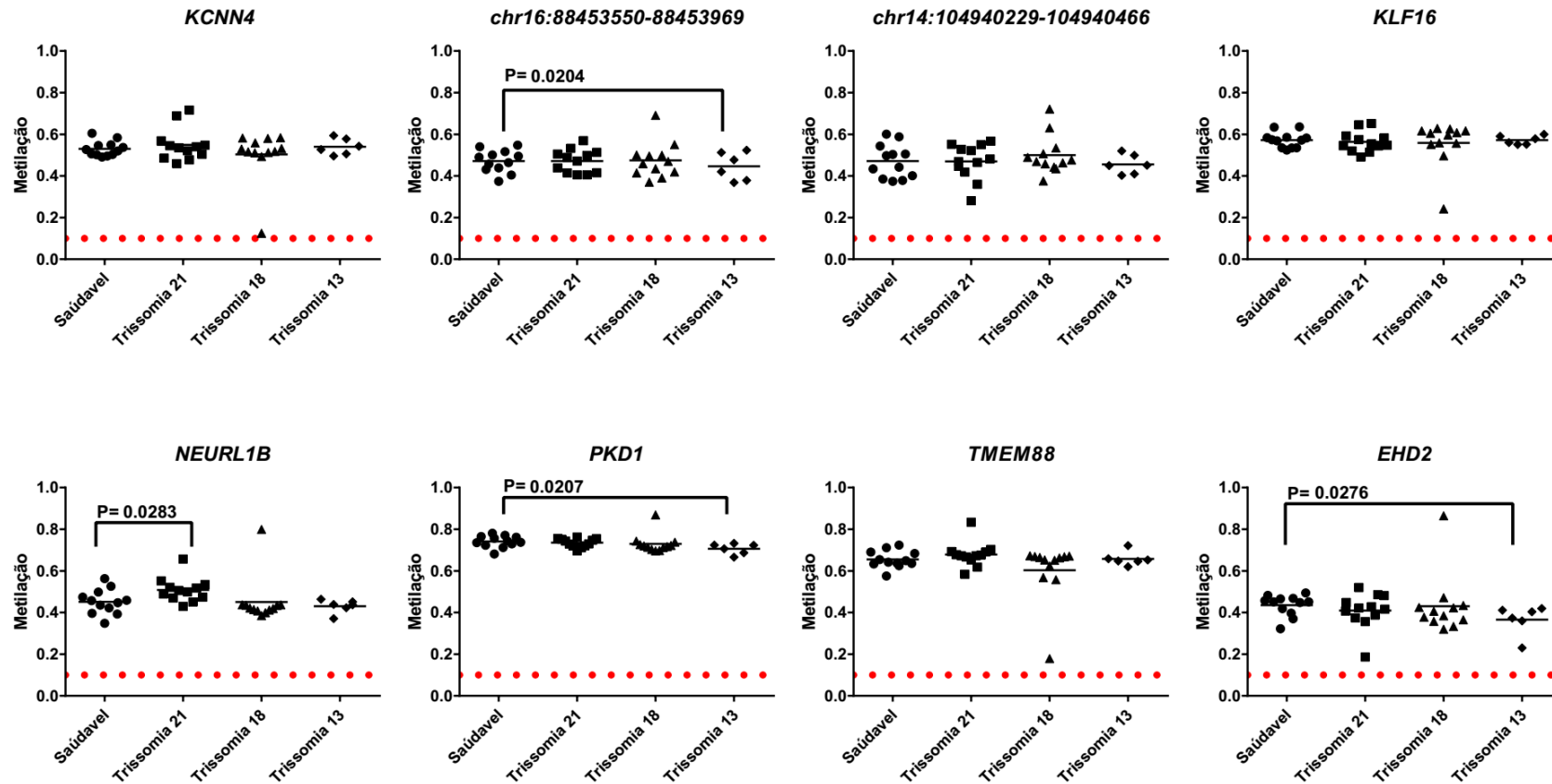


Figura 79. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados quatro não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto as DMRs presentes nos genes *EHD2*, *PKD1* e a posição física *chr16:88453550-88453969* demonstraram redução de metilação nas amostras de trissomia 13 enquanto a DMR presente no gene *NEURL1B* demonstrou aumento de metilação nas amostras de metilação de trissomia 21.

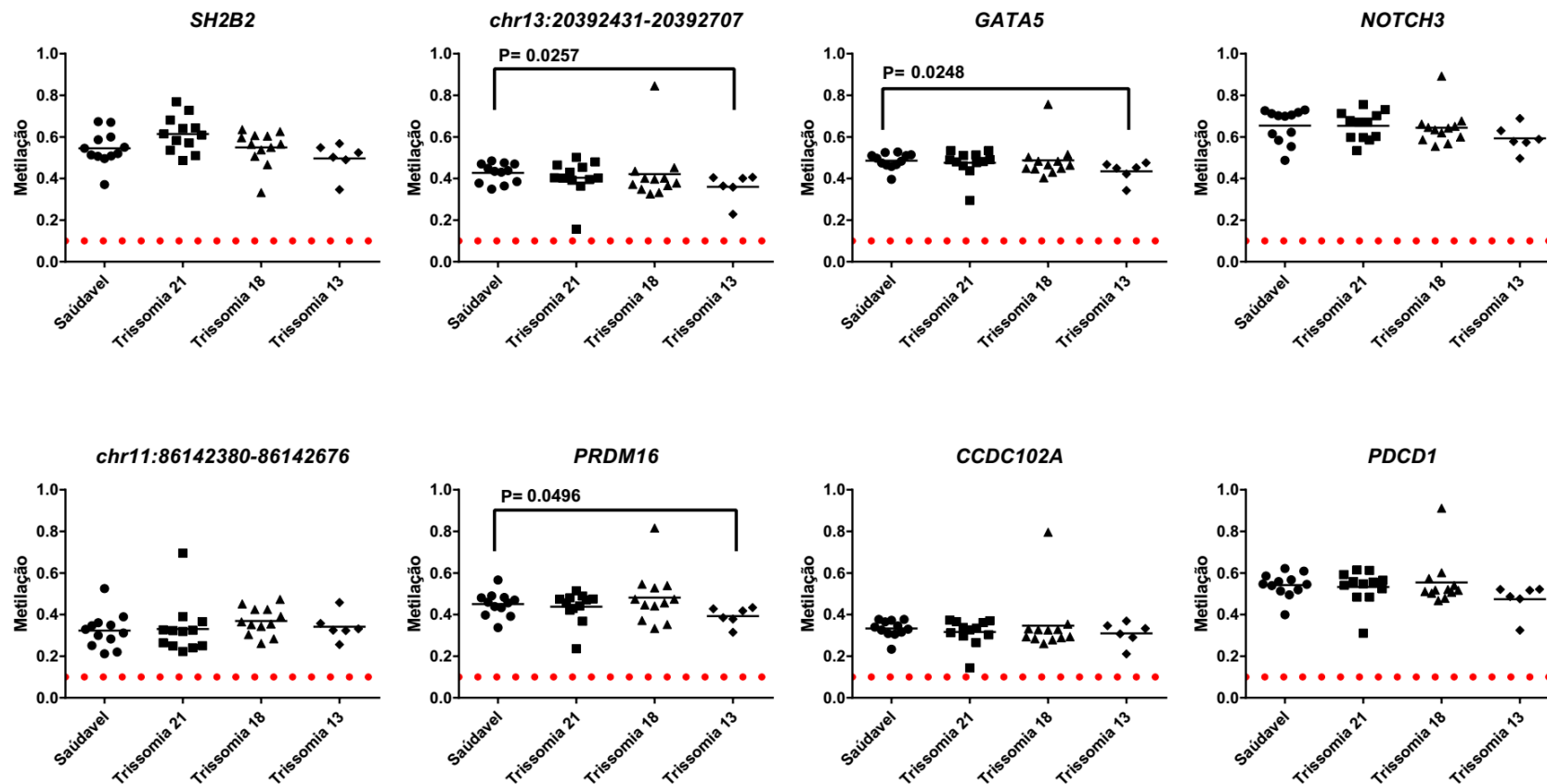


Figura 80. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados cinco não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto as DMRs presentes nos genes *PRDM16*, *GATA5* e a posição física *chr13:20392431-20392707* demonstraram redução de metilação nas amostras de trissomia 13.

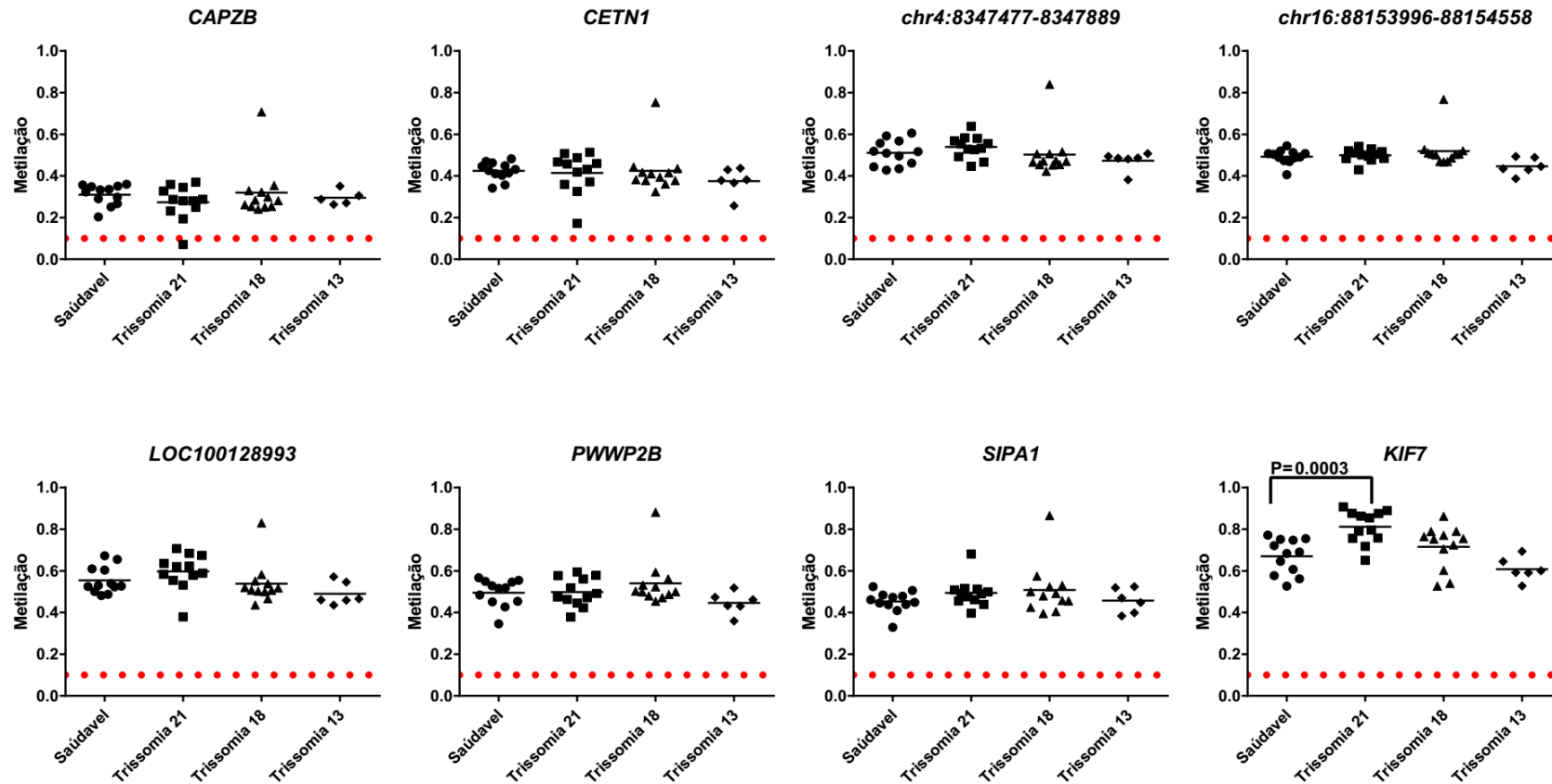


Figura 81. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados sete não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saúdaes e trissômicas enquanto a DMR presente no gene *KIF7* demonstrou aumento de metilação em amostras de trissomia 21.

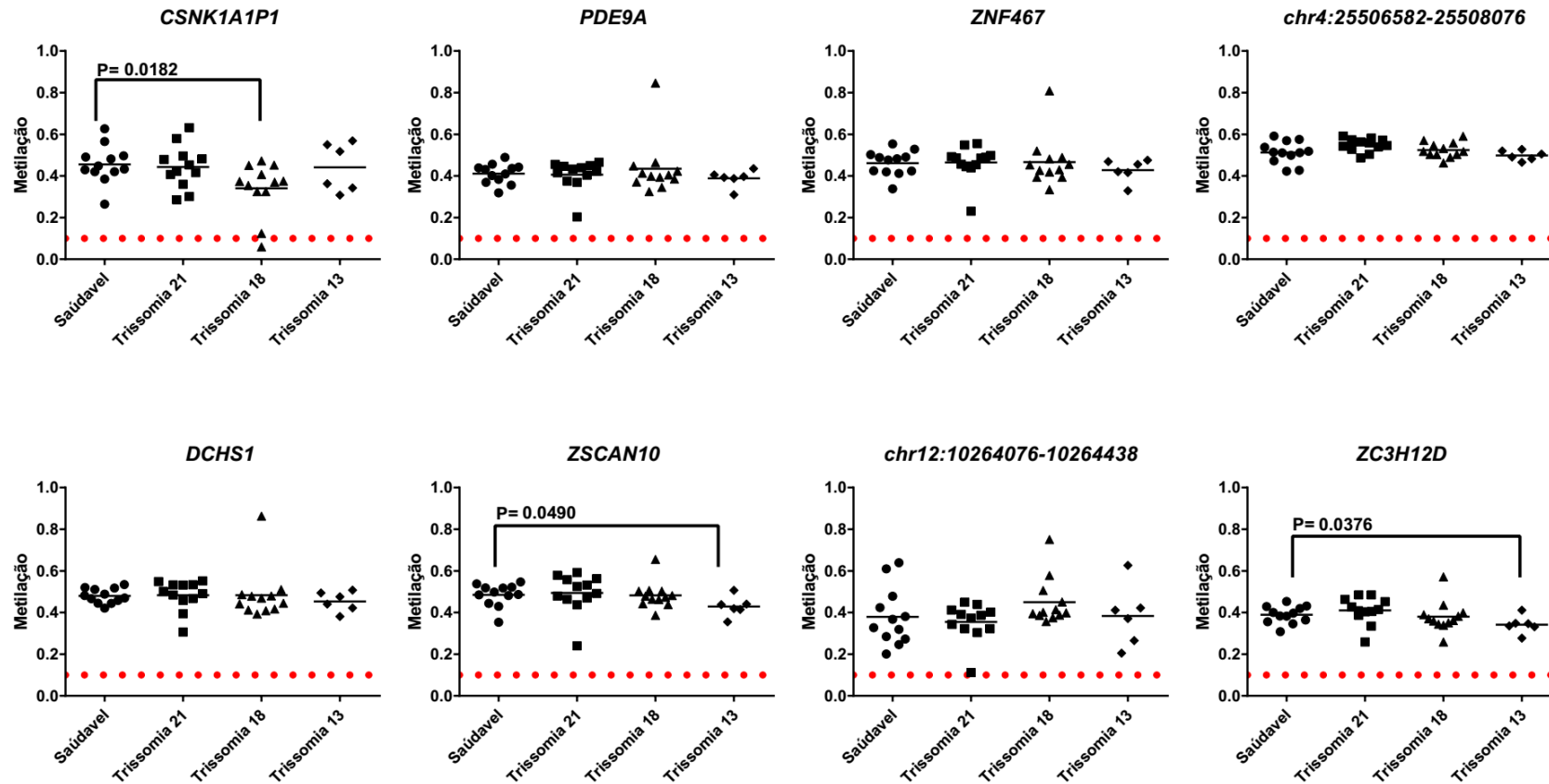


Figura 82. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saudáveis e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da média dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Dentre os oito candidatos estudados quatro não apresentaram diferença estatística significativa entre as amostras saudáveis e trissômicas enquanto as DMRs presentes nos genes *ZSCAN10*, *ZC3H12D* demonstraram redução de metilação em amostras de trissomia 13 enquanto a DMR presente no gene *CSNK1A1P1* demonstrou redução de metilação em amostras de trissomia 18.

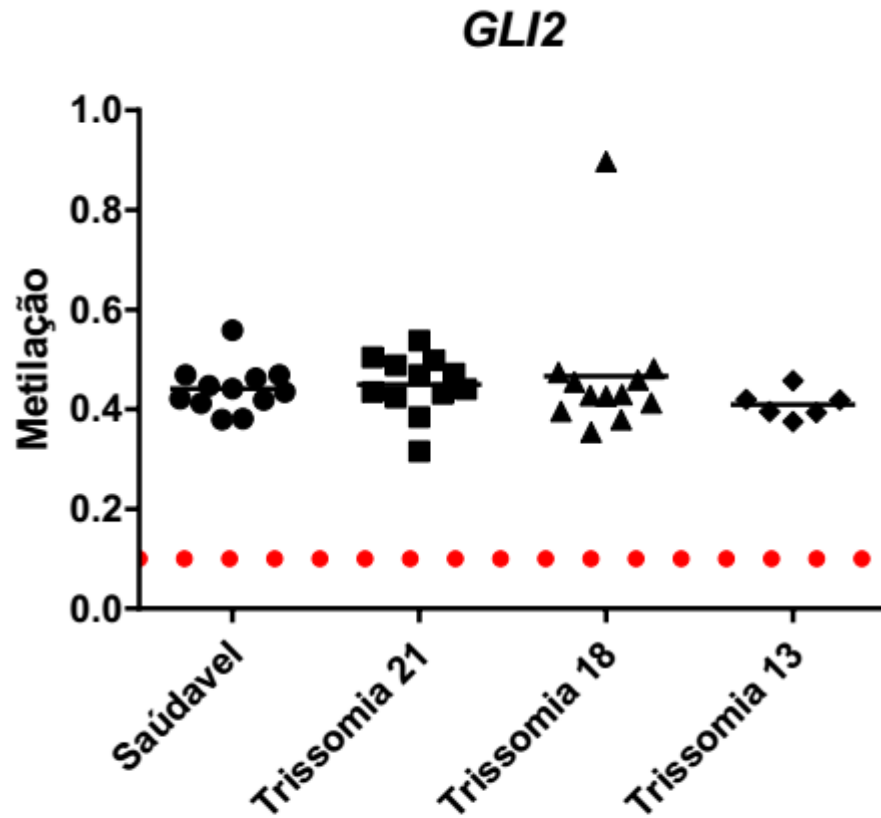


Figura 83. Comparação das DMRs secundárias candidatas entre amostras saúdaes e trissômicas.

No eixo X se encontram os tipos de amostras utilizadas após o corte de qualidade de amostras com sondas com valor de $p > 0.01$ enquanto no eixo Y se encontra o valor da metilação obtido através da media dos pontos presentes nas DMRs primárias candidatas. As Diferenças entre amostras saúdaes e trissômicas com valor de $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas. O gene estudado não demonstrou diferença estatística entre as amostras saúdaes e trissômicas.

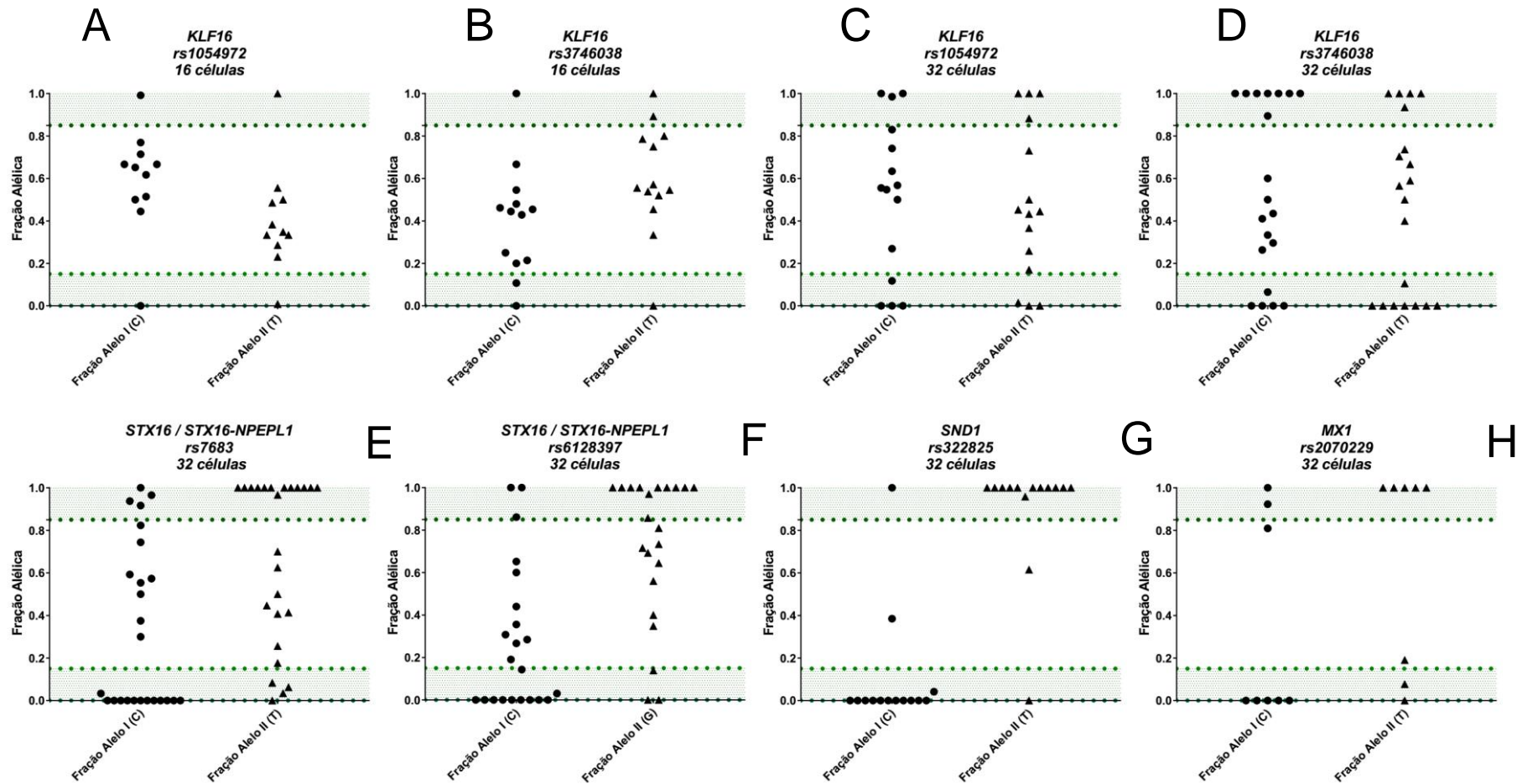


Figura 84. Frações alélicas de genes candidatos sujeitos ao *imprinting* genômico.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y e à esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula “READS ALELO I/ READS TOTAIS” para a fração alélica I e “READS ALELO II/READS TOTAIS” para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condizentes com expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condizentes com expressão bialélica. Em **A**, **B**, se encontram análises referentes a transcriptomas de 16 células, enquanto para **C**, **D**, **E**, **F**, **G** e **H** se encontram análises referentes a transcriptomas de 32 células. O gene *KLF16* demonstrou evidência de expressão bialélica para os SNPs rs1054972 (**A**), rs3746038 (**B**), rs1054972 (**C**), rs3746038 (**D**) em estudos de transcriptoma de 16 e 32 células

enquanto O genes *STX16* \ *STX16-NPÉL1* demonstrou evidência de expressão bialélica apenas em estudos de 32 células (**E, F**). Os genes *SND1* e *MX1* demonstraram evidência de expressão monoalélica em estudos de transcriptoma de 32 células (**G, H**) considerando corte de 10% de expressão bialélica em amostras de 32 células.

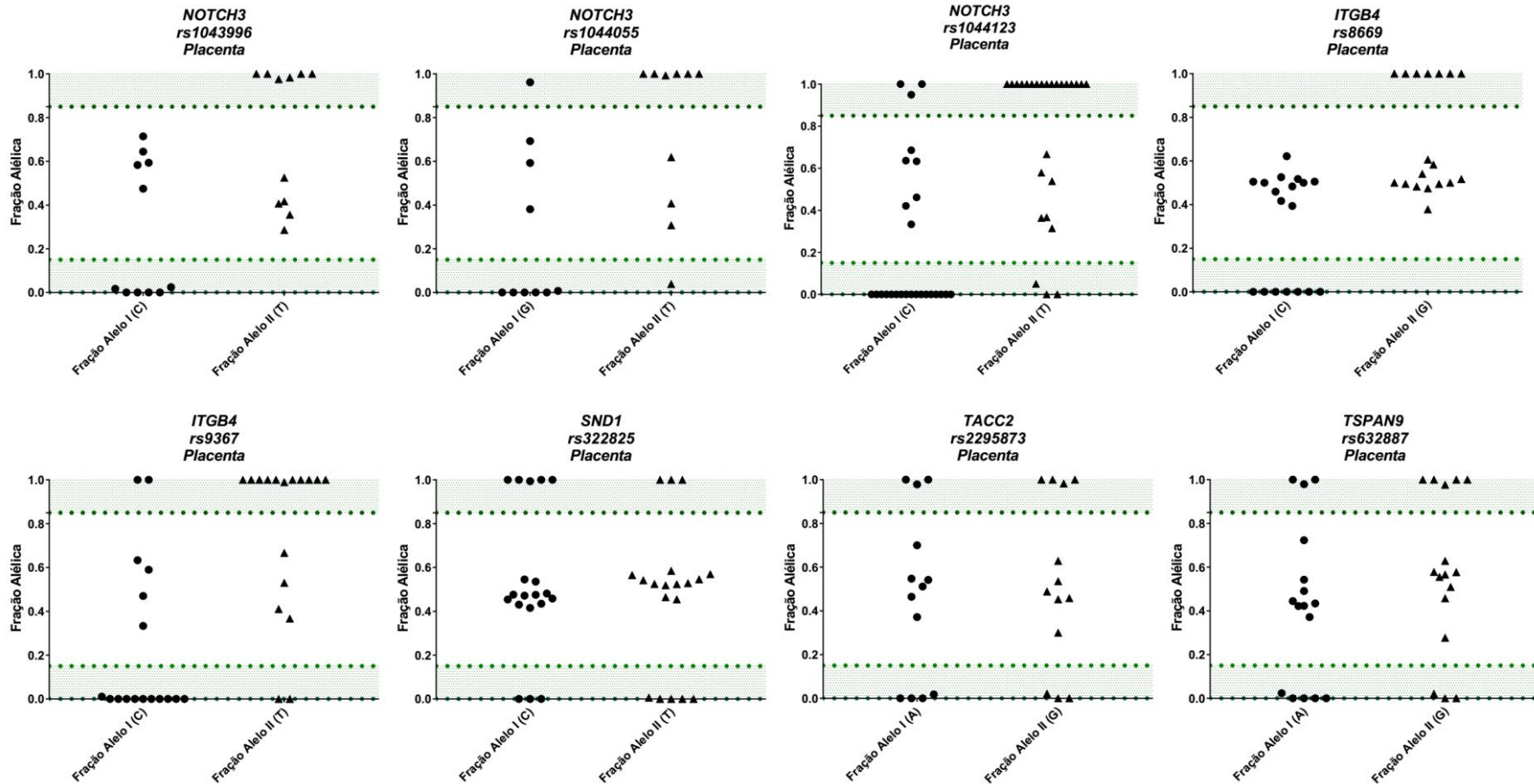


Figura 85. Frações alélicas de genes candidatos sujeitos ao *imprinting* genômico.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula "READS ALELO I/ READS TOTAIS" para a fração alélica I e "READS ALELO II/READS TOTAIS" para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condiscntes como expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condiscntes como bialélico. Os oito SNPs presentes apresentaram valores de frações alélicas condiscntes como expressão bialélica em amostras de transcriptoma de placenta.

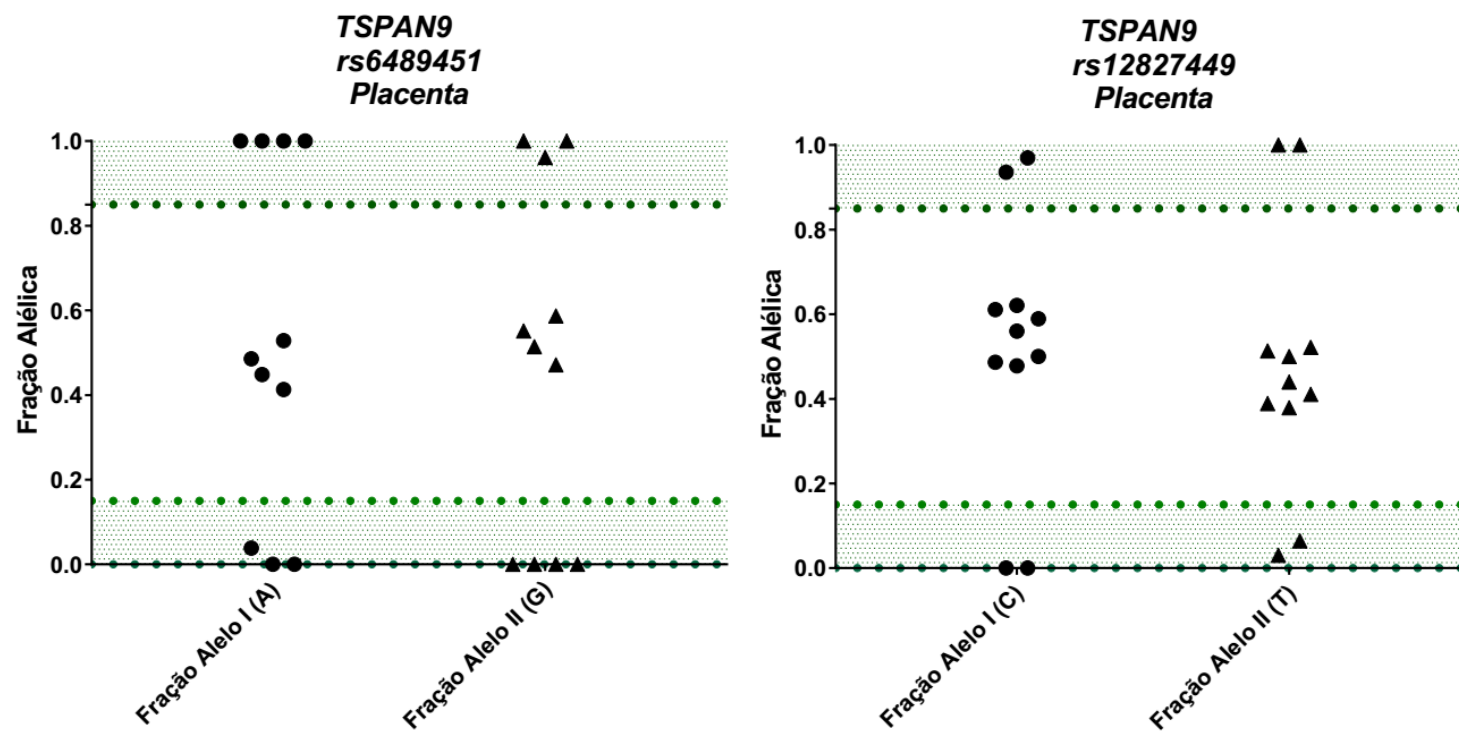


Figura 86. Frações alélicas de genes candidatos sujeitos ao *imprinting* genômico.

No eixo X se encontram as frações alélicas I e II referentes ao SNP utilizado, no eixo Y a esquerda se encontra os valores de frações alélicas obtidos entre 0 e 1 através da fórmula "READS ALELO I/ READS TOTAIS" para a fração alélica I e "READS ALELO II/READS TOTAIS" para a fração alélica II. As amostras que apresentarem fração alélica ≥ 0.85 ou ≤ 0.15 foram consideradas condiscuentes como expressão monoalélica, enquanto os valores restantes foram considerados condiscuentes como bialélico. Os oito SNPs presentes apresentaram valores de frações alélicas condiscuentes como expressão bialélica em amostras de transcriptoma de placenta.

Tabela 2. Cross-reference de DMRs candidatas secundárias com dados de expressão alélica presentes no artigo de Hamada 2016.

Cross-reference entre genes presentes em DMRs primárias candidatas ao *imprinting* que apresentaram valores de expressão alélica oriundos do artigo de Hamada 2016 (*Allele-Specific Methylome and Transcriptome Analysis Reveals Widespread Imprinting in the Human Placenta.*) e interpretações oriundas de transcriptoma selecionados (16 células, 32 células e Placenta) feitas na plataforma SRA.

Nome do Gene	Transcriptoma Hamada et al. (2016)	Estado 16 células	Estado 32 células	Estado Placenta
<i>KLF16</i>	Não estudado	Expressão consistente com bialélica	Expressão consistente com bialélica	Ausência de reads necessários para análise
<i>IRX4</i>	2 Placentas Consistentes com expressão monoalélica materna, 1 Placenta Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Expressão consistente com bialélica
<i>MT1E</i>	1 Placenta Consistente com expressão monoalélica materna	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>NOTCH3</i>	1 Placenta Consistente com expressão monoalélica paterna	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>GPX7</i>	1 Placenta Consistente com expressão monoalélica paterna / 1 Consistente com expressão monoalélica materna	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>MXRA8</i>	1 Placenta Consistente com expressão monoalélica paterna / 1 Consistente com expressão monoalélica materna	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>PKD1</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>RIN3</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise

<i>PWWP2B</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>SIPA1</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>GNE</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>VGLL4</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>ITGB4</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Expressão consistente com bialélica
<i>SND1</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Consistente com expressão monoalélica	Expressão consistente com bialélica
<i>ZC3H4</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>TACC2</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Expressão consistente com bialélica
<i>TSPAN9</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>PRR15</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>PRR15</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>RNF207</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>PHOSPHO1</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>MX1</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Consistente com expressão monoalélica	Ausência de reads necessários para análise
<i>FOXO6</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>CLYBL</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise

<i>TACSTD2</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Expressão consistente com bialélica	Ausência de reads necessários para análise
<i>OBSL1</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>SHROOM1</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>NEURL \</i> <i>NEURL1</i>	Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>STX16 /</i> <i>STX16-</i> <i>NPEPL1</i>	Consistente com expressão bialélica / Consistente com expressão bialélica	Ausência de reads necessários para análise	Expressão consistente com bialélica	Ausência de reads necessários para análise
<i>IRX2 /</i> <i>C5orf38</i>	Consistente com expressão bialélica / Não estudado	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise
<i>TP53TG1 \</i> <i>CROT</i>	Não estudado / 1 Consistente com expressão monoalélica paterna	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Expressão consistente com bialélica
<i>TSPAN9</i>	Não estudado	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise	Ausência de reads necessários para análise

6 - Dados suplementares

Essa dissertação inclui seis tabelas suplementarias de extenso comprimento e, portanto, serão apresentadas on-line no link da dissertação, disponível exclusivamente para os revisores no endereço:
URL: <https://sites.google.com/site/pedrothyagomozerrodrigues/>

Tabela S1. Amostras utilizadas de metilação e RNA-Seq.

Tabela S2. Estado de metilação de DMRs sabidamente imprintadas em estudos de WGBS.

Tabela S3. Estado de metilação de DMRs sabidamente imprintadas em estudos de Illumina 450k.

Tabela S4. Novas regiões diferencialmente metiladas primárias identificadas e análises de metilação realizadas em tais regiões.

Tabela S5. Novas regiões diferencialmente metiladas secundárias identificadas e análises de metilação realizadas em tais regiões.

Tabela S6. Visão geral das análises utilizando repositórios de RNA-Seq feitas nesse estudo. Sendo elas o controle, análises feitas em genes presentes em DMRs primárias e genes presentes em DMRs secundárias.

7 - DISCUSSÃO

A primeira etapa desse trabalho foi encontrar uma maneira de trabalhar com grandes séries de dados de metilação e RNA-Seq. Geralmente para a metilação se utiliza que scripts que buscam sequências específicas, sendo um exemplo o trabalho de Court e colaboradores (2014) que procurou 25 CpGs consecutivas que apresentavam metilação intermediária em três tecidos distintos ou pacotes pré-determinados publicados anteriormente que efetuam o que um script faria, evitando a necessidade de se escrever o código na mão, um desses exemplos é o pacote *MethPipe* que demonstra regiões diferencialmente metiladas entre 2 metilomas distintos (Song *et al.*, 2013), sendo que essas DMRs podem ou não ser imprintadas sendo necessário estudo de sequências específicas. No entanto não possuímos a capacidade computacional para efetuar as metodologias citadas anteriormente, logo utilizamos uma metodologia que se baseia em utilizar o browser UCSC sendo que parte dessa metodologia foi publicada recentemente (Alves Da Silva *et al.*, 2016) onde inserimos dados de metilação do genoma abrangente na nuvem (nesse caso a plataforma UCSC), e conferimos o estado de metilação de uma iDMR sabidamente sujeita ao imprinting no cromossomo 21, presente no gene *WRB*.

Nossa metodologia foi eficaz em não só verificar o estado de metilação intermediário como também identificar a origem da metilação gamética de tal gene sabidamente sujeito ao imprinting, que havia sido caracterizada erroneamente como iDMR secundária mesmo apresentando assimetria de metilação gamética (Metilação no ovócito, ausência de metilação no esperma e metilação no blastocisto). No entanto os dados inseridos na nuvem anteriormente eram otimizados para trabalhar como *imprinting* constitutivo e não específico da placenta. Com isso foi necessário adicionar mais estudos de metilação de placenta na nuvem, e conferir em iDMRs específicas da placenta se nossa janela UCSC era capaz de identificar domínios imprintados apenas na placenta.

Como mostrado na Figura 3, foi possível identificar com nossa metodologia a metilação intermediária polimórfica presente na iDMR conhecida, assimetria de metilação gamética (ovócito metilado, esperma demetilado e metilação intermediária no blastocisto) e ausência de metilação em um exemplo de tecidos não placentário (nesse caso o sangue), todas as características descritas até então de imprinting específico da placenta (Sanchez-Delgado *et al.*, 2016). Além de testar a capacidade

de identificar iDMRs específicas da placenta a Figura 3 demonstra um teste piloto de stress para o algoritmo que será utilizado para identificar novas DMRs candidatas ao imprinting, tal teste foi feito integrando na janela dados de AMRs (barra lilás) e HMRs (barra azul) que são referentes respectivamente a possível placenta metilada e placenta desmetilada, como os estudos de origem dessas barras vieram de placentas distintas nossa hipótese seria que um domínio que apresentasse as 2 barras seriam metilações polimórficas sujeitas ao imprinting, e como observado na (Figura 3) uma iDMR específica da placenta apresenta as 2 barras.

Para evitar falsa identificação, chamar uma iDMR constitutiva de específica da placenta e vice versa, calculamos a médiade metilação de diversas iDMRs primárias e secundárias constitutivas (Figura 5) em diversos tecidos, sendo possível discernir as características de iDMRs primárias (Figura 5, A) onde DMRs apresentam assimetria de metilação gamética e metilação no blastocisto e metilação intermediária nos tecidos como descritas por (Okoe *et al.*, 2014), e as características das iDMRs secundárias que apresentam ausência de assimetria gamética e ausência de metilação no blastocisto (Figura 5,B), tais características foram descritas por (Okoe *et al.*, 2014).

Uma das grandes diferenças entre as iDMRs constitutivas e as específicas da placenta é o domínio de metilação polimórfico, que é extensivo e aparentemente específico da placenta (Hanna *et al.*, 2016). No entanto existe evidência de perda de expressão monoalélica para o gene H19 em placentas de terceiro trimestre, tal perda de imprinting não é acoplado aparentemente a perda de metilação (Rancourt *et al.*, 2013), perda de expressão é surpreendente visto que a alteração da metilação de tal gene está associada a síndrome de Silver Russell e a BeckwithWiedemann (Frost e Moore, 2010). Tentando encontrar perda de metilação que possivelmente alteraria a expressão alélica um teste de polimorfismo de metilação utilizando estudos de Illumina 450k foi feito sendo que consideramos como amostra polimórfica aquela que apresentar metilação na DMR menor que 0.1.

O teste de polimorfismo de metilação feito nas iDMRs primárias (Figura 6, 7, 8, 9) surpreendentemente não encontrou evidência de polimorfismo de metilação em amostras de primeiro trimestre, terceiro trimestre e idade não categorizada. Com isso reforçamos a estabilidade das iDMRs primárias mesmo em um tecido tão instável como a placenta e inferimos que mesmo caso haja evidência de perda de imprinting em nível de expressão como descrito anteriormente, o nível da metilação deve

permanecer entre os descritos para se evitar doenças de *imprinting* (Frost e Moore, 2010). Interessantemente o teste de polimorfismo feito para as iDMRs secundárias (Figura 10, 11) demonstrou evidência de polimorfismo para duas DMRs presentes no gene SNRPN (Figura 10). A iDMR presente no gene SNRPN é de extrema importância clínica visto que ela está relacionada com a síndrome congênita de Angelman e Prader-Willi (White *et al.*, 2006). Uma das DMRs apresenta um caso de polimorfismo em placentas do primeiro trimestre, enquanto a DMR presente na CpG40 demonstrou evidência de polimorfismo para placentas do primeiro, terceiro e idade indeterminada, com isso podemos afirmar que para CpG a evidência de polimorfismo é extensa e real ou as marcas de metilação na CpG40 do gene *SNRPN* não são imprintadas na placenta. O estudo que identificou o estado de imprinting das 2 DMRs apenas testou a metilação alélica de leucócito e cérebro, não testando a metilação na placenta (Court *et al.*, 2014). Futuramente estudos deverão ser feitos para provar a origem parental de tais DMRs em placentas e confirmando assim que a fenomenologia de polimorfismo de metilação placentária acontece não só em iDMRs específicas da placenta como também em iDMRs secundárias.

Com intuito solidificar a capacidade da plataforma de identificar iDMRs específicas da placenta a média de metilação de diversos tecidos em mais iDMRs conhecidas específicas foram feitas (Figura 12, A), sendo que essa análise demonstrou a existência de polimorfismo de metilação nos três estudos de genoma abrangente de placenta utilizados, tais resultados eram esperados visto que o fenômeno de polimorfismo de metilação já foi descrito anteriormente para iDMRs específicas da placenta (Hanna *et al.*, 2016), essa análise foi feita com intuito de demonstrar que nossas amostras de placenta apresentam o fenômeno de polimorfismo de metilação, que consequentemente podem ser utilizadas para identificar regiões não descritas até então que apresentam polimorfismo placentário.

Como controle negativo de metilação, três *housekeeping* genes placentários foram analisados (Figura 12, B) (Meller *et al.*, 2005). *Housekeeping* genes apresentam como característica a ausência de metilação em suas ilhas CpGs em tecidos que são expressos (Lim e Maher, 2010), e podemos observar que nos genes escolhidos encontramos a ausência de metilação em todos os tecidos testados, provando assim que nossas amostras de metilação não apresentam metilação aberrante devido há problemas quaisquer de sequenciamento. Além de apresentar evidência de polimorfismo em sequenciamento de bissulfato abrangente as iDMRs específicas da

placenta apresentaram evidência de polimorfismo em amostras de metilação oriundas do *chip Illumina 450k* (Figura 14, 15, 16, 17), a evidência de polimorfismo encontrado reforça que a ausência de polimorfismo nas iDMRs constitutivas testadas anteriormente não está relacionado com problemas nas amostras. Interessantemente encontramos taxas de polimorfismo maiores do que as descritas até então para a iDMR presente no gene *PURA*, que apresentou cinco de sete placentas do primeiro trimestre polimórficas (41% de polimorfismo).

Anteriormente quando o fenômeno de polimorfismo de metilação placentária foi descrito os autores observaram que a idade da placenta não está relacionada com o evento de perda de metilação (Hanna *et al.*, 2016), e até então o máximo de polimorfismo encontrado para uma iDMR placentária se encontrava no gene *LIN28B*, que em 55 placentas saudáveis apresentou polimorfismo em 5 (Uma taxa de 10%) (Sanchez-Delgado *et al.*, 2016). Podemos assim então concluir que com um grupo de 36 placentas existem 3 tipos de polimorfismo de metilação placentário, sendo eles o raro (figura 13) que representam as iDMRs que em 36 placentas não apresentam evidência de polimorfismo de metilação, o polimorfismo comum (figura 14, 15, 16, 17) que representam as iDMRs que não ultrapassam o limite de 10% de polimorfismo e o polimorfismo extremo, que representam iDMRs que apresentam mais de 30% de taxa de polimorfismo (Figura 16, gene *THAP3* e figura 17, gene *PURA*).

Além da metilação intermediária polimórfica as iDMRs específicas da placenta apresentam expressão monoalélica em tecidos placentários e bialélica em tecidos somáticos (Court *et al.*, 2014), visando identificar expressão alélica específica da placenta este trabalho utilizou a metodologia presente no trabalho de (Alves Da Silva *et al.*, 2016) que se baseia em extrais reads de estudos de RNA-Seq presentes na plataforma SRA, sem a necessidade de possuir grande capacidade computacional. No entanto tal metodologia foi aplicada apenas para iDMRs constitutivas, visando testar a capacidade de identificar expressão monoalélica e em iDMRs específicas da placenta aplicamos a metodologia em vários genes sabidamente imprintados apenas na placenta (Figura 18, 19).

Em 134 SNPs conseguimos *reads* informativos para apenas 16, no controle, é sabido que dependendo da composição da sequência e da estrutura do gene os estudos de RNA-Seq apresentam certo vies de sequenciamento para regiões específicas do genoma (Zheng *et al.*, 2011) no entanto não esperávamos tamanha falta de SNPs informativos (≥ 10 amostras de RNA-Seq com ao menos 20 *reads*).

Mesmo assim a metodologia conseguiu encontrar expressão monoalélica para diversos genes sabidamente imprintados sendo eles *LIN28B*, *ZFAT* (Figura 18) e *DNMT1* (Figura 19). Interessantemente o gene *LIN28B* que apresentou recentemente 10% de polimorfismo de metilação apresentou apenas em uma placenta polimórfica no SNP rs221635 e nenhuma evidência de polimorfismo no SNP rs221634, tal ausência de polimorfismo no SNP rs221634 pode ser justificada como: problemas de cobertura dos estudos de RNA-Seq utilizados ou alteração interindividual relacionado a população de uma área. O fenômeno de metilação relacionado ao haplótipo já foi descrito por Do e colaboradores (2016), no entanto até então não se sabe qual o impacto desse fenômeno no polimorfismo de metilação sendo necessário que estudos focados em responder essa pergunta sejam feitos futuramente.

Além desses dois genes sabidamente sujeitos ao imprinting apresentaram expressão bialélica em nossa metodologia sendo eles *AIM1* e *RHOBT3*. A expressão bialélica do *AIM1* pode ser explicada através dos SNPs que apresentaram *reads* informativos, quando descrito como imprintado os autores utilizaram o SNP rs11152999 que é isoforma específica (Court *et al.*, 2014), enquanto os SNPs informativos nesse trabalho rs3747790 e rs1057433 não são isoforma específico. Com isso pegamos tantos *reads* da isoforma monoalélica como a bialélica. Já a expressão bialélica do gene *RHOBT3* é mais complicada de ser explicada, visto que os autores que identificaram a expressão monoalélica de tal gene utilizaram o SNP rs34896 (Sanchez-Delgado *et al.*, 2015) e encontramos evidência de expressão bialélica para tal SNP. A explicação para tal expressão bialélica se encontra na restringência aplicada em nossa metodologia, visto que não apresentamos genótipo das amostras de RNA-Seq utilizadas consideramos um máximo de 10% das amostras como polimórficas baseando-se no que foi descrito recentemente (Sanchez-Delgado *et al.*, 2016), sendo que em um grupo de amostras RNA-Seq podemos encontrar muito mais amostras polimórficas do que visto. No entanto se aumentarmos a proporção de possíveis amostras polimórficas corremos o risco de determinar falsa expressão monoalélica. Para responder esse dilema utilizamos amostras de RNA-Seq de células pré implantadas (2 células, 4 células, 8 células, 16 células) e implantadas (32 células) tendo como base a fenomenologia descrita anteriormente por Sanchez-Delgado e colaboradores (2016) onde os autores determinaram que um gene especificamente imprintado na placenta apresenta expressão bialélica entre 2 e 8 células e expressão monoalélica em 16 e 32 células. No entanto as amostras de RNA-Seq utilizados por

(Sanchez-Delgado *et al.*, 2016) não são acessíveis na plataforma SRA. Com isso utilizamos as amostras de RNA-Seq presentes no estudo (Dang *et al.*, 2016) e testamos as frações alélicas para diversos genes sabidamente imprintados apenas na placenta em 2, 4, 8, 16 e 32 células (Figura 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26). Para os genes testados nas amostras entre 2 células a 8 células encontramos evidência de expressão bialélica assim como o esperado, em 16 células encontramos evidência de expressão monoalélica e surpreendentemente bialélica para o SNP rs34896 presente no gene *RHOBT3*. A expressão bialélica de tal SNP pode ser explicada através de duas maneiras, sendo uma delas um polimorfismo desconhecido até então em células pré implantadas ou a amostra que apresentou evidência de expressão bialélica apresenta algum tipo de instabilidade cromossômica, visto que já se é sabido que embriões nesse estágio apresentem aneuploidias, dissomias uniparentais e triploidias em mosaico (Vanneste *et al.*, 2009).

Mesmo que os autores que publicaram as bibliotecas de RNA-Seq entre 2 e 32 células não conferiram o número de cromossomos das células utilizadas não significa que tais estudos não sejam validos para esse trabalho, visto que foi possível encontrar no gene *DNMT1* (Figura 26) a troca de expressão bialélica de 2, 4 e 8 células para a monoalélica em 16 células demonstrando que nossa metodologia é capaz de identificar expressão monoalélica e o *flip*. Além disso, nossos dados dão força para a hipótese proposta anteriormente (Hanna *et al.*, 2016; Sanchez-Delgado *et al.*, 2016), que entre 2 e 8 células a expressão é consistente como bialélica, podendo assim dizer que para encontrar expressão monoalélica utilizando dados de embriões pré implantados o recomendado seria utilizar estudos de 16 células.

Com o controle de metilação e RNA-Seq pronto, iniciamos o processo de identificação de novas regiões diferencialmente metiladas possivelmente sujeitas ao imprinting. A etapa inicial do algoritmo para encontrar DMRs possivelmente sujeitas ao imprinting encontrou 694 posições (Figura 4) através da interseção de domínios AMR e HMR, um número humilde quando se comparado a monstruosidades feita por (Sanchez-Delgado *et al.*, 2016) que identificou mais de 5000 DMRs possivelmente sujeitas ao imprinting na placenta, no entanto o número de candidatas encontradas não é ruim quando se comparado a outros estudos, como por exemplo o estudo de (Court *et al.*, 2014) que identificou 356 posições em sua primeira etapa do algoritmo ou o estudo de (Sanchez-Delgado *et al.*, 2016) que identificou 591 posições possivelmente sujeitas ao imprinting. A próxima etapa é qualificar as posições

encontradas como iDMRs primárias e secundárias, e para isso efetuamos algo até então não feito na área do *imprinting* genômico, começamos a identificação através da metilação presente no blastocisto e não nos gametas.

Canonicamente a metilação das iDMRs primárias apresentam como origem os gametas e as iDMRs secundárias ganham sua metilação após a fecundação (Ferguson-Smith, 2011), com o sequenciamento de metilação genoma abrangente do ovócito, esperma e blastocisto os autores de (Okoe *et al.*, 2014) provaram em várias iDMRs conhecidas que de fato tal fenomenologia é real e determinaram que toda iDMR primária além de apresentar assimetria de metilação gamética também apresentam metilação intermediária no blastocisto e as iDMRs secundárias apresentar ausência de metilação gamética com ausência de metilação no blastocisto demonstrando assim a capacidade do blastocisto de identificar regiões iDMRs quando se pareado com as outras características descritas até então do *imprinting* genômico. No entanto tal caracterização ignora uma possibilidade biológica, que seria uma das metilações oriundas de 2 gametas metilados são sujeitas ao *imprinting*. Tal hipótese se baseia no fato de grupos de proteínas protegerem iDMRs primárias nas ondas de desmetilação (Strogantsev e Ferguson-Smith, 2012), se um grupo protege a perda de metilação em um contexto de assimetria de metilação gamética, nada impede que tal fenômeno não aconteça em uma situação onde o ovócito e o esperma estão metilados. Testando nossa hipótese o algoritmo proposto que considera as todas as possíveis variações de metilação identificou 30 novas DMRs primárias candidatas (Figura 27), sendo 10 não canônicas (Gametas metilados, com metilação intermediária no blastocisto) e 20 canônicas (Presença de assimetria de metilação gamética e metilação intermediária no blastocisto). Das 30 DMRs candidatas 7 foram categorizadas como DMRs candidatas constitutivas por apresentarem metilação intermediária no sangue enquanto as 23 DMRs candidatas restantes foram categorizadas como DMRs primárias candidatas específicas da placenta. Tal número não surpreende visto que recentemente diversos estudos foram feitos com intuito de identificar DMRs primárias específicas da placenta (Court *et al.*, 2014; Sanchez-Delgado *et al.*, 2015; Hamada *et al.*, 2016; Sanchez-Delgado *et al.*, 2016). Nosso estudo conseguiu identificar novas DMRs primárias candidatas porque utilizamos três amostras de metilação placentário genoma abrangente, considerando o fenômeno de polimorfismo de metilação placentário, enquanto recentemente o estudo de (Sanchez-Delgado *et al.*, 2016) só utilizou uma amostra de metilação genoma abrangente. Além

disso ao considerarmos todas as características de *imprinting* específico da placenta, sendo elas polimorfismo, ausência de metilação em tecidos não placentários e metilação intermediária no blastocisto, encontramos regiões onde o único sequenciamento de metilação genoma abrangente de ovócito falha. A DMR presente no gene *CBR1* (Figura 27) é um exemplo disso, ela apresenta polimorfismo de metilação, ausência de metilação em tecidos somáticos e metilação intermediária no blastocisto, no entanto tal DMR não foi pega anteriormente por (Hamada *et al.*, 2016; Sanchez-Delgado *et al.*, 2016) porque a média de metilação do ovócito se encontra entre 60% aproximadamente e não $\geq 90\%$. Tais características são importantes para inferir que uma DMR é imprintada sem provar sua origem parental dependente devido, isso pode ser feito devido as características de metilação da citosina presentes no genoma humano. A maior parte do genoma humano é hipermetilada, enquanto as regiões restantes ou não apresentam metilação ou apresentam metilação intermediária. As regiões hipometiladas geralmente são sítios de transcrição (Deaton e Bird, 2011), enquanto as metilações intermediárias estão relacionadas com o *imprinting* genômico (Court *et al.*, 2014), metilação haplótipo dependente (Do *et al.*, 2016) ou metilação tecido específico (Lokk *et al.*, 2014). Dentre as metilações intermediárias anteriormente, apenas o *imprinting* específico da placenta e a metilação dependente de haplótipo são polimórficas, com intuito de ampliar o número de amostras de metilação o teste de polimorfismo foi feito para as DMRs primárias candidatas em amostras saudáveis (Figura 28, 29, 30) e trissômicas (Figura 31, 32, 33, 34) utilizando amostras de metilação oriundas do chip comercial Illumina 450k. Encontramos evidência de polimorfismo de metilação em amostras saudáveis para os genes *MECOM*, *MIR155HG*, *CBR1*, *STARD13* (Figura 28) e *VTNRA2-1* (Figura 29). Já para as amostras trissômicas encontramos evidência de polimorfismo para os genes *MECOM*, *MIR155HG*, *CBR1* (Figura 31), *STARD13*, *VTNRA2-1* E *TMEM175* (Figura 32). Dentre os genes que apresentaram polimorfismo em trissomias apenas o gene *TMEM175* demonstrou diferença estatística entre as amostras saudáveis e as amostras que apresentaram trissomias do cromossomo 13 (Figura 32). Além do gene *TMEM175* mais três DMRs candidatas apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre placentas saudáveis e trissômicas, sendo elas as DMRs presentes nos genes *C21orf81* (Figura 32), *MSH4* (Figura 33), *TTYH3* (Figura 34). Isso significa que tais regiões apresentaram média de metilação diferente das placentas saudáveis e que tais diferenças não são ao acaso. Nosso grupo conseguiu

encontrar tais diferenças porque procuramos DMRs saudáveis que são diferencialmente metiladas quando se comparadas a DMRs trissômicas, além disso nós consideramos a possibilidade de polimorfismo sendo que recentemente (Hatt *et al.*, 2016) quando buscaram diferenças entre placentas saudáveis e trissômicas os autores desconsideraram essa possibilidade, perdendo potenciais regiões. As diferenças entre amostras saudáveis e trissômicas acontece provavelmente devido a interações *cis-trans* oriundas da cópia extra em seus respectivos cromossomos, tal fenômeno já foi descrito antes por Kerkel e colaboradores (2010) e a identificação de novas regiões alteradas será útil para compreender o impacto de uma cópia extra como todo na placenta humana. No entanto tais regiões devem ser interpretadas com muito cuidado visto que não se sabe a aplicação dessas regiões como kit de diagnóstico ou como seriam as médias em uma população maior, além disso devemos considerar a possibilidade de diferença interindividual de polimorfismo de metilação. Estudos populacionais devem ser feitos no futuro testando a capacidade dessas regiões como marcadores moleculares de identificação de trissomias.

Com isso temos seis DMRs polimórficas possivelmente sujeitas ao imprinting na placenta ou seis DMRs relacionadas a haplótipo. As DMRs imprintadas específicas da placenta apresentam além do domínio de metilação intermediário a capacidade de controlar a expressão alélica de genes ao redor (Sanchez-Delgado *et al.*, 2016) com isso utilizamos estudos de placenta, 32 células e 16 células para verificar as frações alélicas de não só dos seis genes candidatos como todos os genes perto das 30 DMRs primárias identificadas anteriormente. Infelizmente encontramos poucos SNPs informativos segundo nossos critérios restritivos (Figura 35) e para as SNPs que encontramos achamos apenas evidência de expressão bialélica para os genes *EGFL8* e *KIF26A*. A evidência de expressão bialélica de tais genes é consistente com a ausência de polimorfismo presente em tais DMRs, com isso propomos que tais DMRs não estão relacionadas com o fenômeno de *imprinting* genômico, e que são falsos positivos. A identificação de regiões não sujeitas ao imprinting não inviabiliza o algoritmo ou este trabalho visto que isso já aconteceu antes, sendo um exemplo o trabalho de Sanchez-Delgado e colaboradores (2016) que identificou diversas regiões sujeitas ao imprinting e diversas regiões intermediárias não imprintadas. Buscando complementar nossa análise utilizamos os dados de expressões alélicas publicadas no artigo de Hamada e colaboradores (2016) e o cross-reference entre as DMRs primárias candidatas se encontra na (Tabela 1). Dentre os dados de expressão alélica

os autores de (Hamada *et al.*, 2016) determinaram que as chances do gene *CBR1* serem sujeitas ao imprinting com suas evidências de expressão alélicas são extremamente grandes, no entanto não conseguiram identificar a possível DMR controladora de tal perfil de expressão monoalélico.

Com as evidências encontradas nesse trabalho de polimorfismo (Figura 28, 31) de metilação combinados com expressão alélica publicada recentemente propomos que a DMR primária encontrada no gene *CBR1* seja imprintada. O *crossreference* identificou expressão monoalélica materna para o os genes *MECOM* e *SPON1*, no entanto ambos os genes apresentaram gDMR de origem materna (Figura 27), por isso propomos que essa expressão monoalélica representa na verdade uma possível contaminação de sangue materno nas amostras de transcriptoma de (Hamada *et al.*, 2016) e sejam desconsideradas. A DMR presente no gene *VAMP5* não apresentou evidências de polimorfismo, no entanto podemos estar lidando com uma DMR que apresenta uma rara frequência de polimorfismo, por isso determinamos que tal DMR seja possivelmente sujeita ao imprinting e propomos que mais estudos sejam feitos no futuro com intuito de validar essa possibilidade.

Além de identificar DMRs candidatas primárias nosso algoritmo foi capaz de identificar DMRs candidatas secundárias específicas da placenta, tais DMRs não foram encontradas devido as peculiaridades das iDMRs secundárias de apresentarem ausência de metilação gamética. Os grandes estudos feitos recentemente utilizaram como base metilação gamética para encontrar novas regiões sujeitas ao imprinting na placenta, focando na assimetria de metilação gamética e ignorando a possibilidade de um imprinting específico secundário (Hamada *et al.*, 2016). Nosso trabalho conseguiu identificar DMRs secundárias porque utilizamos como critério de determinação de DMR a extensão das ilhas CpGs *MASKED* (UCSC 2017), calculamos a metilação do blastocisto e por último observamos a metilação gamética. Além disso como não haviam identificado até então as iDMRs específicas da placenta secundárias partimos do preceito que as características de polimorfismo encontrado nas iDMRs primárias (Hanna *et al.*, 2016) e a características de metilação gamética (Figura 5) presente nas iDMRs secundárias constitutivas (Okoe *et al.*, 2014) estariam presente nas futuras iDMRs secundárias candidatas. Utilizando tais características 208 DMRs secundárias foram identificadas (Figura 36, 37, 38, 39) sendo 45 delas constitutivas e 163 específicas da placenta. Nossas DMRs secundárias candidatas apresentaram evidência de polimorfismo de metilação em estudos de genoma abrangente e

apresentaram perfil de metilação gamética parecido com o descrito na literatura (Gametas hipermetilados, hipometilados ou com hipermetilação em um dos gametas e ausência de metilação no blastocisto) (Okae *et al.*, 2014). Para aumentar o número de placentas testadas o teste de polimorfismo de metilação utilizando amostras saudáveis de metilação oriundos do chip comercial *illumina 450k* foi feito (Figura 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61) e encontramos evidência de polimorfismo para 13 DMRs secundárias candidatas (Figura 40, 42, 45, 46, 48, 49, 50, 52, 53, 54) presentes nos genes *TP53TG1\CROT*, *NUDT19*, *TSPAN9*, *MT1E*, *ADORA2B*, *GPR135*, *OBSL1*, *SERP2* e nas posições físicas chr13:53174029-53174674, chr8:144503421-144503808, chr3: 9642388 – 964269550, chr8: 54569668 – 54570010, chr2:170624685-170625480. O teste de polimorfismo utilizando amostras trissômicas de metilação também foi feito com intuito de complementar o estudo feito anteriormente (Figura 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83) e encontramos na total evidência de polimorfismo para 55 genes / posições distintas sendo elas: *JAK3*, *TP53TG1 \ CROT*, *GNE*, *NUDT19*, *DENND2D*, *TSPY26P*, chr17: 33700990-33701657, *VGGL4*, *STX16 / STX16 - NPEPL1*, *SND1*, *GPX7*, *RCSD1*, *ZNF442*, chr2: 85664695-85665055, *TACC2*, *TSPAN9*, chr13: 53174029 - 53174674, *MT1E*, *TSTD1*, chr13:29105412-29105676, *C2CD4D \ LOC100132111*, *VAX2*, *ISL2*, chr10:115860680-115861093, *MX1*, *FOXO6*, chr12:47224913–47225664, *TFAP2B*, chr15:53097562-53098476, *LOC100132215 \ OTX1*, *SHH*, *ADORA2B*, chr7:64407590-64408299, *TRPS1*, *ZNF662*, *CLYBL*, chr17:79314963-79320653, chr19:44203559-44203987, *GPR135*, *OTX2*, *TFAP2B*, chr13:9642388-9642695, chr8:54569668-54570010, *ZAR1*, *GRM6*, *LINC00379*, *PITX2*, *BOLA2*, *SERP2*, chr2:170624685-170625480, *NAV1*, *GATA-AS1*, *CAPZB*, *CSNK1A*.

Além disso encontramos evidência de diferença estatística entre amostras saudáveis e trissômicas em 65 DMRs sendo elas: *JAK3*, chr1:8013994-8014651, *EHD2*, *DENND2D*, *GNE*, *TSPY26P*, chr17:33700990- 33701657, *STX16 / STX16-NPEPL1*, chr5:42951077-42952410, *TACC2*, *LINC01140*, *RNF207*, *ISL2*, *NEURL1B*, chr13:29105412-29105676, *PHOSPHO1*, chr7: 27260102-27260467, *SHH*, *TLX2*, *MNX1*, chr20:3073225-3074232, chr14:103745233-103746271, chr19:7852933-7854557, *C1QL3*, *IRX2 / C5orf38*, chr4:113431826-113432596, chr13:23500590-23501398, chr16:30572694-30573037, chr14:103739579-103740892, *TACSTD2*, *LIPE1-AS1 / LIPE*, *TBX4*, chr8:54569668-54570010, *KRT86 \ KRT121P *

KRT97P, HOXA-AS3 \ HOXA6 \ DQ655986, NPFFR1, chr12:125312892-125413165, SHROOM1, CYP26C1, LINC00379, GPR25, KCNQ1DN, A1BG \ ZNF497, chr2:170624685-170625480, ZNF648 FZD1, DZIP1, IFNL4, GATA2-AS1, GUCY2D, PSMB2 \ TFAP2E, CASKIN1, FLT4, chr18:74499317-74499641, chr19:45737483-45738145, , PKD1, chr16:88453550-88453969, NEURL1B, PRDM16, GATA5, chr13:20392431-20392707, KIF7, CSNK1AP1, ZSCAN10, ZC3H12D. Dentre as 65 DMRs uma quase se demonstrou perfeita como diagnóstico de trissomias 21, sendo ela a DMR presente no gene *SHROOM1*. Tal DMR apresentou amostras de trissomias 21 com metilação mais elevada do que a maior parte das amostras saudáveis ($p < 0.0001$), no entanto uma amostra saudável demonstrou nível de metilação equiparável as amostras trissômicas (Figura 74). Portanto é necessário que mais estudos sejam feitos nessa DMR com intuito de determinar se o ponto que saiu da curva é comum ou raro e como tal região estaria em outras populações. Com intuito de verificar o estado de expressão alélica, das DMRs secundárias candidatas, utilizamos 188 SNPs e observamos quais deles apresentaram os *reads* mínimos para serem interpretados, infelizmente conseguimos encontrar apenas informações para oito genes distintos (Figura 84, 85, 86) sendo que para seis genes (*KLF16, STX16 / NPEPL1, NOTCH3, IGB4, SND1, TSPAN9*) encontramos evidência de expressão bialélica e para dois genes (*SND1 e MX1*) encontramos evidência de expressão monoalélica (considerando 10% de amostras polimórficas em 32 células). O *cross-reference* com o estudo de transcriptoma publicado por (Hamada *et al.*, 2016) (Tabela 2) revelou mais seis genes (*IRX4, MT1E, NOTCH3, GPX7, MXRA8, CROT*) com expressão enviesada para um único alelo e 24 (*PKD1, RIN3, PWWP2B, SIPA1, GNE, VGLL4, ITGB4, SND1, ZC3H4, TACC2, TSPAN9, PRR15, RNF207, PHOSPHO1, MX1, FOXO6, CLYBL, TACSTD2, OBSL1, SHROOM1, NEURL \ NEURL1, STX16 / STX16-NPEPL1, IRX2 / C5orf38*) genes com expressão consistente como bialélica. Interessantemente o estudo efetuado por (Hamada *et al.*, 2016) identificou os genes *SND1, MX1* descritos por nós como monoalélicos como expressão bialélica além disso encontramos evidência de expressão bialélica em nossos estudos de transcriptoma para um o gene *NOTCH3*, que apresentou expressão monoalélica no estudo de (Hamada *et al.*, 2016). Duas possibilidades podem explicar tais resultados: imprinting isoforma específica ou polimorfismo de metilação. Como não temos acesso aos SNPs testados por Hamada e colaboradores (2016) não podemos identificar e conferir as isoformas testadas. A hipótese do polimorfismo vem do preceito que as

amostras de transcriptoma utilizadas nesse estudo não estavam polimórficas enquanto as amostras testadas por (Hamada *et al.*, 2016). Com isso concluímos que as evidências de expressão bialélica para vários genes são gritantes, enquanto a evidência de expressão monoalélica consiste apenas nas DMRs presente nos genes *MT1E*, *GPX27*, *CROT* que demonstraram polimorfismo de metilação em nossos estudos e evidência de expressão alélica no estudo de (Hamada *et al.*, 2016). O gene *MT1E* apresentou evidência de expressão monoalélica de origem materna, no entanto como não podemos provar que a expressão alélica não é oriunda de uma contaminação materna determinamos assim que essa região seja uma forte candidata a imprinting específico da placenta e recomendamos que estudos futuros sejam feitos em tal região. Já o gene *GPX27* demonstrou evidência de expressão alélica materna e paterna, algo surpreendente visto que estamos lidando com domínios possivelmente relacionados a imprinting. Uma das possibilidades da presença da expressão alélica materna é a contaminação de sangue materno, sendo a segunda um novo tipo de imprinting não descrito até então. Estudos deverão ser efetuados futuramente com intuito de responder o resultado ambíguo. O gene *CROT*, demonstrou evidência de expressão alélica paterna, sendo assim não afetada por possível contaminação, e metilação polimórfica. Devido a essas características inferimos que a DMR presente no gene *CROT* é extremamente provável de ser sujeita ao imprinting específico da placenta. Aos genes restantes que apresentaram evidência de expressão monoalélica no cross-reference (*IRX4*, *NOTCH3*, *MXRA8*,) e deixaram de apresentaram evidência de polimorfismo em nossas amostras podemos não devem ser descartados visto que podemos estar lidando com o tipo de polimorfismo de metilação raro. Devido ao número de genes acoplados a DMRs secundárias polimórficas identificadas nesse estudo que apresentaram expressão bialélica propomos que tal fenômeno se assemelha a um descrito recentemente, onde iDMRs sujeitas ao *imprinting* não apresentaram genes com expressão monoalélica em diversos tecidos (Ref Gal / WRB)

8 - CONCLUSÕES

Nosso trabalho encontrou duas iDMRs polimórficas acopladas a expressão monoalélica extremamente possíveis de serem sujeitas ao imprinting genômico, sendo uma primária (CBR1) e uma secundária (*CROT*)

Encontramos seis DMRs primárias polimórficas específicas da placenta, possivelmente sujeitas ao imprinting genômico.

Encontramos quatro DMRs primárias candidatas que apresentam diferença de metilação entre amostras saudáveis e trissômicas, ampliando o conhecimento básico referente ao fenômeno de aneuploidias.

Identificamos 55 DMRs secundárias polimórficas específicas da placenta, possivelmente sujeitas ao imprinting genômico.

Identificamos 65 DMRs secundárias que apresentam diferença de metilação entre amostras saudáveis e trissômicas, ampliando o conhecimento básico referente ao fenômeno de aneuploidias. Além dessa uma dessas posições apresenta real potencial para utilização em kits de diagnóstico.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOWITZ, L. K.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. **Curr Opin Genet Dev**, v. 22, n. 2, p. 72-8, Apr 2012. ISSN 1879-0380 (Electronic)

0959-437X (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22195775>>.

ALVES DA SILVA, A. F.et al. Trisomy 21 Alters DNA Methylation in Parent-of-Origin-Dependent and -Independent Manners. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0154108,2016. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27100087>>.

BARAN, Y.et al. The landscape of genomic imprinting across diverse adult human tissues. **Genome Res**, v. 25, n. 7, p. 927-36, Jul 2015. ISSN 1549-5469 (Electronic)

1088-9051 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25953952>>.

CANTONE, I.; FISHER, A. G. Epigenetic programming and reprogramming during development. **Nat Struct Mol Biol**, v. 20, n. 3, p. 282-9, Mar 2013. ISSN 1545-9985 (Electronic)

1545-9985 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463313>>.

CHEN, Y. A.et al. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. **Epigenetics**, v. 8, n. 2, p. 203-9, Feb 2013. ISSN 1559-2308 (Electronic)

1559-2294 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23314698>>.

COURT, F.et al. Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment. **Genome Res**, v. 24, n. 4, p. 554-69, Apr 2014. ISSN 1549-5469 (Electronic)

1088-9051 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402520>>.

DANG, Y.et al. Tracing the expression of circular RNAs in human pre-implantation embryos. **Genome Biol**, v. 17, n. 1, p. 130, Jun 17 2016. ISSN 1474-760X (Electronic)

1474-7596 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27315811>>.

DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes Dev**, v. 25, n. 10, p. 1010-22, May 15 2011. ISSN 1549-5477 (Electronic)

0890-9369 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576262>>.

DO, C. et al. Mechanisms and Disease Associations of Haplotype-Dependent Allele-Specific DNA Methylation. **Am J Hum Genet**, v. 98, n. 5, p. 934-955, May 5 2016. ISSN 1537-6605 (Electronic)

0002-9297 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27153397>>.

EGGERMANN, T. et al. Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 123, 2015. ISSN 1868-7075 (Print)

1868-7075 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26583054>>.

ENGREITZ, J. M. et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. **Nature**, v. 539, n. 7629, p. 452-455, Nov 17 2016. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27783602>>.

FERGUSON-SMITH, A. C. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 8, p. 565-75, Jul 18 2011. ISSN 1471-0064 (Electronic)

1471-0056 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765458>>.

FROST, J. M.; MOORE, G. E. The importance of imprinting in the human placenta. **PLoS Genet**, v. 6, n. 7, p. e1001015, Jul 1 2010. ISSN 1553-7404 (Electronic)

1553-7390 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20617174>>.

GUO, J. U. et al. Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 2, p. 215-22, Feb 2014. ISSN 1546-1726 (Electronic)

1097-6256 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24362762>>.

HAMADA, H. et al. Allele-Specific Methylome and Transcriptome Analysis Reveals Widespread Imprinting in the Human Placenta. **Am J Hum Genet**, v. 99, n. 5, p. 1045-1058, Nov 3 2016. ISSN 1537-6605 (Electronic)

0002-9297 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27843122>>.

HANNA, C. W.; KELSEY, G. The specification of imprints in mammals. **Heredity (Edinb)**, v. 113, n. 2, p. 176-83, Aug 2014. ISSN 1365-2540 (Electronic)

0018-067X (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24939713>>.

HANNA, C. W. et al. Pervasive polymorphic imprinted methylation in the human placenta. **Genome Res**, v. 26, n. 6, p. 756-67, Jun 2016. ISSN 1549-5469 (Electronic)

1088-9051 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26769960>>.

HATT, L. et al. Microarray-Based Analysis of Methylation of 1st Trimester Trisomic Placentas from Down Syndrome, Edwards Syndrome and Patau Syndrome. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0160319, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27490343>>.

KAMESWARAN, V.; KAESTNER, K. H. The Missing lnc(RNA) between the pancreatic beta-cell and diabetes. **Front Genet**, v. 5, p. 200, 2014. ISSN 1664-8021 (Print)
1664-8021 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071830>>.

KANEKO-ISHINO, T. et al. Complementation hypothesis: the necessity of a monoallelic gene expression mechanism in mammalian development. **Cytogenet Genome Res**, v. 113, n. 1-4, p. 24-30, 2006. ISSN 1424-859X (Electronic)
1424-8581 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16575159>>.

KAROLCHIK, D. et al. The UCSC Table Browser data retrieval tool. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Database issue, p. D493-6, Jan 1 2004. ISSN 1362-4962 (Electronic)
0305-1048 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681465>>.

KELSEY, G.; FEIL, R. New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 368, n. 1609, p. 20110336, Jan 5 2013. ISSN 1471-2970 (Electronic)
0962-8436 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23166397>>.

KENT, W. J. et al. The human genome browser at UCSC. **Genome Res**, v. 12, n. 6, p. 996-1006, Jun 2002. ISSN 1088-9051 (Print)
1088-9051 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045153>>.

KERKEL, K. et al. Altered DNA methylation in leukocytes with trisomy 21. **PLoS Genet**, v. 6, n. 11, p. e1001212, Nov 18 2010. ISSN 1553-7404 (Electronic)
1553-7390 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124956>>.

LEINONEN, R. et al. The sequence read archive. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. Database issue, p. D19-21, Jan 2011. ISSN 1362-4962 (Electronic)
0305-1048 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21062823>>.

LESSING, D.; ANGUERA, M. C.; LEE, J. T. X chromosome inactivation and epigenetic responses to cellular reprogramming. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 14, p. 85-110, 2013. ISSN 1545-293X (Electronic)
1527-8204 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23662665>>.

LIM, D. H. K.; MAHER, E. R. DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. **The Obstetrician & Gynaecologist**, v. 12, n. 1, p. 37-42,2010. ISSN 14672561. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1576/toag.12.1.037.27556>>.

LOKK, K.et al. DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. **Genome Biol**, v. 15, n. 4, p. r54, Apr 1 2014. ISSN 1474-760X (Electronic)
1474-7596 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690455>>.

MALTEPE, E.; FISHER, S. J. Placenta: the forgotten organ. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 31, p. 523-52,2015. ISSN 1530-8995 (Electronic)
1081-0706 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26443191>>.

MELLER, M.et al. Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. **Placenta**, v. 26, n. 8-9, p. 601-7, Sep-Oct 2005. ISSN 0143-4004 (Print)
0143-4004 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16085039>>.

MENG, H.et al. DNA methylation, its mediators and genome integrity. **Int J Biol Sci**, v. 11, n. 5, p. 604-17,2015. ISSN 1449-2288 (Electronic)
1449-2288 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25892967>>.

MIRI, K.et al. The imprinted polycomb group gene Sfbmt2 is required for trophoblast maintenance and placenta development. **Development**, v. 140, n. 22, p. 4480-9, Nov 2013. ISSN 1477-9129 (Electronic)
0950-1991 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24154523>>.

MONK, D.et al. Reciprocal imprinting of human GRB10 in placental trophoblast and brain: evolutionary conservation of reversed allelic expression. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 16, p. 3066-74, Aug 15 2009. ISSN 1460-2083 (Electronic)
0964-6906 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487367>>.

NAG, A.et al. Chromatin signature of widespread monoallelic expression. **Elife**, v. 2, p. e01256, Dec 31 2013. ISSN 2050-084X (Print)
2050-084X (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24381246>>.

OKAE, H.et al. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. **PLoS Genet**, v. 10, n. 12, p. e1004868, Dec 2014. ISSN 1553-7404 (Electronic)
1553-7390 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25501653>>.

PERVJAKOVA, N.et al. Imprinted genes and imprinting control regions show predominant intermediate methylation in adult somatic tissues. **Epigenomics**, v. 8, n. 6, p. 789-99, Jun 2016. ISSN 1750-192X (Electronic)
1750-192X (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004446>>.

RAISSIG, M. T.et al. Genomic imprinting in the Arabidopsis embryo is partly regulated by PRC2. **PLoS Genet**, v. 9, n. 12, p. e1003862,2013. ISSN 1553-7404 (Electronic)
1553-7390 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24339783>>.

RANCOURT, R. C.et al. The prevalence of loss of imprinting of H19 and IGF2 at birth. **FASEB J**, v. 27, n. 8, p. 3335-43, Aug 2013. ISSN 1530-6860 (Electronic)
0892-6638 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23620526>>.

RANEY, B. J.et al. Track data hubs enable visualization of user-defined genome-wide annotations on the UCSC Genome Browser. **Bioinformatics**, v. 30, n. 7, p. 1003-5, Apr 1 2014. ISSN 1367-4811 (Electronic)
1367-4803 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24227676>>.

ROADMAP EPIGENOMICS, C.et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. **Nature**, v. 518, n. 7539, p. 317-30, Feb 19 2015. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25693563>>.

SANCHEZ-DELGADO, M.et al. Human Oocyte-Derived Methylation Differences Persist in the Placenta Revealing Widespread Transient Imprinting. **PLoS Genet**, v. 12, n. 11, p. e1006427, Nov 2016. ISSN 1553-7404 (Electronic)
1553-7390 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27835649>>.

SANCHEZ-DELGADO, M.et al. Absence of Maternal Methylation in Biparental Hydatidiform Moles from Women with NLRP7 Maternal-Effect Mutations Reveals Widespread Placenta-Specific Imprinting. **PLoS Genet**, v. 11, n. 11, p. e1005644, Nov 2015. ISSN 1553-7404 (Electronic)
1553-7390 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26544189>>.

SAVOVA, V.; VIGNEAU, S.; GIMELBRANT, A. A. Autosomal monoallelic expression: genetics of epigenetic diversity? **Curr Opin Genet Dev**, v. 23, n. 6, p. 642-8, Dec 2013. ISSN 1879-0380 (Electronic)
0959-437X (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24075575>>.

SCHROEDER, D. I.et al. The human placenta methylome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 15, p. 6037-42, Apr 9 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23530188>>.

SCHULTZ, M. D.et al. Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. **Nature**, v. 523, n. 7559, p. 212-6, Jul 9 2015. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26030523>>.

SHEN, L.; WATERLAND, R. A. Methods of DNA methylation analysis. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 10, n. 5, p. 576-81, Sep 2007. ISSN 1363-1950 (Print)

1363-1950 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17693740>>.

SMALLWOOD, S. A.; KELSEY, G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. **Trends Genet**, v. 28, n. 1, p. 33-42, Jan 2012. ISSN 0168-9525 (Print)

0168-9525 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019337>>.

SONG, Q.et al. A reference methylome database and analysis pipeline to facilitate integrative and comparative epigenomics. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81148,2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324667>>.

SOOD, R.et al. Gene expression patterns in human placenta. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 14, p. 5478-83, Apr 4 2006. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567644>>.

STROGANTSEV, R.; FERGUSON-SMITH, A. C. Proteins involved in establishment and maintenance of imprinted methylation marks. **Brief Funct Genomics**, v. 11, n. 3, p. 227-39, May 2012. ISSN 2041-2657 (Electronic)

2041-2649 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22760206>>.

TANG, W. W.et al. Specification and epigenetic programming of the human germ line. **Nat Rev Genet**, v. 17, n. 10, p. 585-600, Oct 2016. ISSN 1471-0064 (Electronic)

1471-0056 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27573372>>.

VANNESTE, E.et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. **Nature Medicine**, v. 15, p. 577, 04/26/online 2009. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1038/nm.1924>>.

VARLEY, K. E.et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. **Genome Res**, v. 23, n. 3, p. 555-67, Mar 2013. ISSN 1549-5469 (Electronic)

1088-9051 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325432>>.

VENKATESH, S.; WORKMAN, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 16, n. 3, p. 178-89, Mar 2015. ISSN 1471-0080 (Electronic)
1471-0072 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25650798>>.

WEAVER, J. R.; BARTOLOMEI, M. S. Chromatin regulators of genomic imprinting. **Biochim Biophys Acta**, v. 1839, n. 3, p. 169-77, Mar 2014. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345612>>.

WHITE, H. E. et al. Quantitative analysis of SNRPN (correction of SRNPN) gene methylation by pyrosequencing as a diagnostic test for Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. **Clin Chem**, v. 52, n. 6, p. 1005-13, Jun 2006. ISSN 0009-9147 (Print)
0009-9147 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16574761>>.

ZHENG, W.; CHUNG, L. M.; ZHAO, H. Bias detection and correction in RNA-Sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 290, Jul 19 2011. ISSN 1471-2105 (Electronic)
1471-2105 (Linking). Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21771300>>.