



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

GISLENE PEREIRA GIL

ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO EM PLACENTAS DE MULHERES
PORTADORAS DE DOENÇA FALCIFORME

CAMPINAS
2020

GISLENE PEREIRA GIL

ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO EM PLACENTAS DE MULHERES
PORTADORAS DE DOENÇA FALCIFORME

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutora em Ciências, na área de concentração de Clínica Médica.

ORIENTADOR: MÔNICA BARBOSA DE MELO
COORIENTADOR: MARIA LAURA COSTA DO NASCIMENTO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA GISLENE PEREIRA GIL E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MÔNICA BARBOSA DE MELO.

CAMPINAS
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G37a Gil, Gislene Pereira, 1985-
Análise do perfil de metilação em placentas de mulheres portadoras de
doença falciforme / Gislene Pereira Gil. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Mônica Barbosa de Melo.
Coorientador: Maria Laura Costa do Nascimento.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Epigenética. 2. Metilação de DNA. 3. Doença falciforme. 4. Gravidez. 5.
Placenta. I. Melo, Mônica Barbosa de, 1968-. II. Nascimento, Maria Laura
Costa do, 1979-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of methylation profile in placentas from pregnant women with sickle cell disease

Palavras-chave em inglês:

Epigenetics

DNA methylation

Sickle cell disease

Pregnant women

Placenta

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Mônica Barbosa de Melo [Orientador]

Adriana Gomes Luz

Aline Cristiane Planello

Daniela Sanchez Basseres

Anderson Ferreira da Cunha

Data de defesa: 21-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7683-6192>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7759713603414782>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

GISLENE PEREIRA GIL

ORIENTADOR: MÔNICA BARBOSA DE MELO

COORIENTADOR: MARIA LAURA COSTA DO NASCIMENTO

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. MÔNICA BARBOSA DE MELO

2. PROFA. DRA. ADRIANA GOMES LUZ

3. PROFA. DRA. ALINE CRISTIANE PLANELLO

4. PROFA. DRA. DANIELA SANCHEZ BASSERES

5. PROF. DR. ANDERSON FERREIRA DA CUNHA

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 21/02/2020

DEDICATÓRIA

À minha família:

Aos meus pais Roselaine e Roberto pelo ensinamento de vida: simplicidade, honestidade, solidariedade, justiça e ao mais sublime de todos, o amor incondicional.

Aos meus queridos e admiráveis irmãos Vanessa, Simone e Murilo pelo carinho e apoio sempre constantes. Exemplos de dedicação, responsabilidade e muita generosidade.

“A família é a base da sociedade e o lugar onde as pessoas aprendem pela primeira vez os valores que as guiarão durante toda a vida”

João Paulo II

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para chegar até aqui. Depois de tantos momentos tristes e desafiadores foi Ele quem me deu forças para seguir e concluir esta importante etapa da minha vida.

Agradeço à Dra Mônica Barbosa de Melo pela confiança depositada em meu trabalho, a qual foi de extrema importância para a conclusão deste projeto, pela atenção, paciência, ajuda em todos os momentos e a amizade construída ao longo desses anos.

À Dra Maria Laura Costa, pela paciência, atenção e disponibilidade em ajudar sempre, mesmo depois de horas de plantão médico.

Agradeço imensamente a minha finada, querida e amada mãe, Roselaine Gil, que tanto me incentivou, apoiou e acreditou que eu pudesse chegar até aqui. Hoje, sem sombra de dúvida, ela está alegre e radiante por eu ter alcançado essa conquista ‘Muito obrigada por todo seu apoio e amor, minha mãe querida’.

Agradeço aos meus irmãos Vanessa, Simone e Murilo e ao meu pai, Roberto, pela confiança e apoio em todos os momentos.

Agradeço também ao Gabriel, com quem frequentemente compartilhei o meu cansaço, preocupação e os vários momentos de alegria. Agradeço pelo seu apoio, atenção e incentivo.

Aos amigos de laboratório, Gabi, Mirta, Sueli, Danizinha, Vinícius, Thiago, Victor, Yuri, Francisco, Letícia, pelo apoio, atenção e os momentos de descontração.

À Mariana Maschietto e Galina Ananina, pela enorme ajuda nas análises de bioinformática e estatística.

À Dulcineia pela ajuda nos experimentos de Real Time.

À Sheila Coelho pelo apoio nos ensaios de pirosequenciamento realizados no Instituto Nacional de Câncer no Rio de Janeiro.

Às secretárias do CBMEG Sandra, Tânia e Gabriela, as quais sempre foram prestativas e atenciosas com todos.

Ao Yuri da pós-graduação da FCM, pelos inúmeros esclarecimentos e ajuda quando precisei.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (número do processo 2014/00984-3), ao CNPq (número do processo 424607/2016-6) e à CAPES pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

“Sempre parece impossível até que seja feito”

Nelson Mandela (1918 - 2013)

RESUMO

A doença falciforme (DF) constitui um grupo de doenças genéticas que tem como característica comum a presença da hemoglobina S (HbS), a qual pode estar em combinação com outras hemoglobinas anormais, como por exemplo, a hemoglobina C (HbC). A gravidez de mulheres com DF é acompanhada por incidência aumentada de episódios de dor, infecções e várias complicações sistêmicas. A placenta de mulheres com DF apresenta uma série de anormalidades e disfunções, as quais podem levar à insuficiência placentária, favorecendo resultados fetais desfavoráveis. Essas anormalidades placentárias são bem conhecidas e reportadas, no entanto pouco se sabe em relação ao comportamento dos mecanismos moleculares, como por exemplo, os mecanismos epigenéticos no tecido placentário na presença da DF. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o perfil de metilação do DNA em placentas de mulheres com DF (genótipos HbSS e HbSC) em comparação a placentas de gestantes saudáveis. Para isso, propusemos um estudo caso e controle, onde foram avaliados três grupos: grupo 1 (caso) composto por gestantes com genótipo HbSS (n=11); grupo 2 (caso) composto por gestantes com genótipo HbSC (n=11); grupo 3 (controle) composto por gestantes sem DF com genótipo HbAA (n=21). Os microarranjos Illumina Methylation EPIC BeadChip 850K foram usados para avaliar a metilação global do DNA das placentas. As análises de pirosequenciamento foram realizadas para validação dos dados dos microarranjos de metilação e a PCR em Tempo Real foi aplicada para as análises de expressão gênica. Os resultados revelaram uma frequência maior de sítios CpGs hipermetilados para ambos os grupos analisados, onde o grupo HbSS apresentou 73,5% e o grupo HbSC apresentou 76,2%. As regiões diferencialmente metiladas (DMRs) também apresentaram um predomínio de regiões hipermetiladas com 89% e 86% para os grupos HbSS e HbSC, respectivamente. Dentre as DMRs selecionadas para validação da metilação (4 = HbSS e 3 = HbSC), três foram validadas por pirosequenciamento no grupo HbSS e nenhuma validada no grupo HbSC. A análise da expressão gênica mostrou uma diferença de expressão estatisticamente significativa para os genes *PTGFR* (-2,97 vezes) e *GPR56* (3,0 vezes) no grupo HbSS, e os genes *SPOCK1* (-2,40 vezes) e *ADCY4* (1,80 vezes) no grupo HbSC. Os genes que se revelaram diferencialmente expressos estão envolvidos com processos de migração, invasão e proliferação celular, mecanismos que são de grande importância para as atividades trofoblásticas. Sendo assim, a mudança de expressão desses genes poderia alterar as funções dos trofoblastos e consequentemente afetar a fisiologia normal placentária.

A partir desses resultados, podemos sugerir que a DF (genótipos HbSS e HbSC) pode alterar a metilação do DNA placentário, levando a mudanças na expressão gênica, o que

poderia possivelmente contribuir para o desenvolvimento inadequado da placenta. Esses achados são de grande importância e lançam novas perspectivas para estudos futuros que poderão contribuir para uma melhor compreensão das complicações clínicas e terapia para mulheres com DF.

Palavras-chave: Epigenética; Metilação do DNA; Placenta; Doença Falciforme; Gravidez; Hipermetilação; Illumina Methylation EPIC 850K.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) comprehends a group of inherited diseases, which have in common the presence of hemoglobin S (HbS). HbS may be in combination with other abnormal hemoglobins, such as a hemoglobin C (HbC). Pregnancy in SCD women is accompanied by an increased incidence of pain episodes, infections and several systemic complications. SCD placenta shows several abnormalities and dysfunction, which may lead to placental insufficiency, favoring adverse fetal outcome. These placental abnormalities are well known and reported, however little is known about the molecular mechanisms, such as epigenetics mechanisms in the placental tissue in the presence of SCD. Thus, the aim of this research was to evaluate the DNA methylation profile in placentas from women with SCD (HbSS and HbSC genotypes) compared to healthy pregnant women. We proposed a case-control study, in which three groups were evaluated: group 1 (case) composed of pregnant women with HbSS genotype (n = 11); group 2 (case) composed of pregnant women with HbSC genotype (n = 11); group 3 (control) composed of pregnant women without SCD with HbAA genotype (n = 21). Illumina Methylation EPIC BeadChip 850K microarrays were used to assess the whole placental DNA methylation. Pyrosequencing was performed to validate the data of the methylation microarrays and Real-Time PCR was applied for the analysis of gene expression. The results showed high frequency of hypermethylated CpGs sites in both HbSS and HbSC groups with 73.5% and 76.2% respectively. Differentially methylated regions (DMRs) also showed increased hypermethylation status with 89% and 86% for the HbSS and HbSC groups, respectively. From the selected DMRs for methylation validation (HbSS=4 and HbSC=3) three were validated by pyrosequencing in the HbSS group, and none validated in the HbSC group. The gene expression analysis showed statistically significant difference for the *PTGFR* (-2.97-fold) and *GPR56* (3.0-fold) genes in the HbSS group, and for the *SPOCK1* (-2.40-fold) and *ADCY4* (1.80-fold) genes in the HbSC group. Differentially expressed genes are involved in processes of cell migration, invasion and proliferation, mechanisms that are of great importance for trophoblastic activities. Thus, the change in expression of these genes could affect trophoblast functions and consequently normal placental physiology. From these results, we can suggest that SCD (HbSS and HbSC genotypes) may alter placental DNA methylation, leading to changes in gene expression, which could possibly contribute to inadequate placental development. These findings are of great importance and launch new perspectives for future studies that may contribute to a better understanding of clinical complications and therapy for women with SCD.

Keywords: Epigenetics; DNA methylation; Placenta; Sickle Cell Disease; Pregnancy; Hypermethylation; Illumina Methylation EPIC 850K.

Lista de Figuras

Figura 1. Molécula de hemoglobina e suas quatro subunidades, sendo duas delas α e duas delas β com seus respectivos grupos heme ao centro.....	20
Figura 2. A: <i>Cluster</i> do gene da α -globina localizado no braço curto do cromossomo 16. B: <i>Cluster</i> do gene da β -globina localizado no braço curto do cromossomo 11.....	20
Figura 3. A hemoglobina normal é formada por duas cadeias de α -globina e duas cadeias de β -globina, sendo estas últimas codificadas pelo gene da β -globina (<i>HBB</i>). A HbS é decorrente da substituição de uma adenina por uma timina no sétimo códon do gene da β -globina, levando a troca do aminoácido ácido glutâmico por valina. A anemia falciforme ocorre quando o indivíduo apresenta os dois alelos do gene <i>HBB</i> alterados (HbSS). Nos indivíduos com essa doença, durante a desoxigenação das hemácias, as moléculas de HbS tendem a se aglomerarem formando longos polímeros, o que altera o formato das hemácias, tornando-as falcizadas.....	22
Figura 4. Mecanismo de vaso-oclusão na Doença Falciforme. A vaso-oclusão em pacientes com DF ocorre a partir de uma complexa interação entre eritrócitos falcizados, eritrócitos normais, células endoteliais, leucócitos e plaquetas, bem como fatores de coagulação e outras proteínas do plasma, levando a obstrução parcial ou total do vaso, geralmente por períodos transitórios, acarretando danos em tecidos e órgãos.....	24
Figura 5. Desenho representativo de uma secção transversal de placenta humana.....	30
Figura 6: A metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil (CH ₃) ao carbono 5 de uma citosina, a partir da ação de enzimas da família DNMT, formando o composto 5-metilcitosina.....	33
Figura 7: Representação esquemática do efeito da metilação em um promotor gênico: promotores que apresentam hipermetilação em ilhas CpGs podem inibir a ligação de fatores de transcrição à fita de DNA, levando à inativação desses genes.....	34
Figura 8. Tratamento do DNA com bissulfito. As citosinas não metiladas são convertidas em uracila, enquanto as citosinas metiladas não sofrem alteração. Quando o DNA tratado é submetido à amplificação por PCR as uracilas presentes na sequência são substituídas pela base timina. Com isso, as citosinas presentes podem ser identificadas e quantificadas, para cada sítio de interesse, obtendo-se assim os níveis de metilação dos sítios CpGs.....	39

Figura 9. Classificação dos sítios CpGs em relação ao gene e em relação a Ilha CpG. **A:** A classificação em relação ao gene é dada em TSS1500 (até 1500 bases do sítio de início de transcrição - TSS), TSS200 (até 200 bases do sítio de início de transcrição); 5' e 3' UTR (*untranslated region*), primeiro éxon, corpo de gene e região intergênica. **B:** A classificação em relação à Ilha CpG (CpG Island) é dada em S_Shelf e N_Shelf (de 2000 a 4000 bases à jusante ou à montante da Ilha CpG, respectivamente), S_Shore e N_Shore (até 2000 bases à jusante ou à montante da Ilha CpG, respectivamente), Ilha CpG e por último as regiões Open Sea (superior a 4000 bases em relação à ilha), as quais são consideradas fora de uma região de Ilha CpG.....40

Figura 10. Sondas de metilação referentes aos ensaios *Infinium I* e *II*. **A:** O ensaio *Infinium I* apresenta duas sondas, as quais são específicas para o *status* metilado e não metilado. Após a hibridização das mesmas no DNA tratado por bissulfito, inicia-se a amplificação de base única marcada. **B:** O ensaio *Infinium II* apresenta uma única sonda, a qual pode se ligar tanto a sequência metilada quanto a sequência não metilada. O *status* de metilação do locus se dará através da inserção da base seguinte à sonda; quando esta é guanina obtém-se o *status* metilado, quando é adenina obtém-se o *status* não metilado.....41

Figura 11. Demonstração do processo enzimático da reação de pirosequenciamento. Na reação, a DNA polimerase incorpora um dNTP complementar à fita molde, ocorrendo a liberação do PPi. A enzima ATP sulfurilase, na presença de APS, converte o PPi em ATP. A luciferase utiliza o ATP gerado e catalisa a luciferina em oxiluciferina que gera luz. A enzima apirase degrada os nucleotídeos não incorporados, assim como o ATP. A luz produzida é detectada e o resultado é exibido em um pirograma que indica a sequência de nucleotídeos incorporados durante o sequenciamento.....47

Figura 12. Exemplo da padronização dos *primers* para a amplificação do gene *GPR56*. **A:** Curvas de diluições para as seis concentrações de cDNA (10 ng, 20 ng, 40 ng, 80 ng, 160 ng e 320 ng). **B:** Curvas de *melting* para o par de *primers* testado, apresentando pico na temperatura de 81°C. **C:** A curva de eficiência > 99%, indicando a especificidade da amplificação.....52

Figura 13. *Heatmap* gerado a partir das 396 DMPs obtidas no grupo HbSS em comparação ao grupo controle. As linhas representam cada DMP e as colunas cada paciente do grupo

HbSS e controles (CTL). As cores representam os níveis de metilação; quanto mais vermelho mais metilado e quando mais azul menos metilado.....56

Figura 14. *Heatmap* gerado a partir das 581 DMPs obtidas no grupo HbSC em comparação ao grupo controle. As linhas representam cada DMP e as colunas cada paciente do grupo HbSC e controles (CTL). As cores representam os níveis de metilação; quanto mais vermelho mais metilado e quando mais azul menos metilado.....56

Figura 15. Gráfico da distribuição das DMPs entre as regiões genômicas relacionadas ao gene e à Ilha CpG no grupo HbSS. DMPs hipermetiladas estão significativamente mais frequentes nas regiões TSS200, Ilhas CpG e S_Shore e DMPs hipometiladas estão significativamente mais frequentes nas regiões do Corpo do Gene e Open Sea. Teste Qui-quadrado; *p-valor <0,05; ***p-valor<0,001.....57

Figura 16. Gráfico da distribuição das DMPs entre as regiões genômicas relacionadas ao gene e à Ilha CpG no grupo HbSC. DMPs hipermetiladas estão significativamente mais frequentes nas regiões de Ilha CpG e S_Shore, enquanto que as DMPs hipometiladas estão significativamente mais frequentes em regiões Open Sea. Teste Qui-quadrado; *p-valor <0,05; ***p-valor<0,001.....58

Figura 17. Resultados da análise de metilação dos sítios CpGs avaliados por pirosequenciamento. **A:** Níveis de metilação dos sítios: cg03949391-*PTGFR*, cg03989617-*GPR56*, cg07274618-*GALR2* e cg23179456-*ADCY4* para o grupo HbSS. **B:** Níveis de metilação dos sítios: cg24847829-*SPOCK1*, cg24676244-*THSD7A* e cg23179456-*ADCY4* para o grupo HbSC. Teste de t Student; *p-valor<0,05; **p-valor<0,01.....61

Figura 18. **A:** Perfil de expressão dos genes *PTGFR*, *GPR56*, *GALR2* e *ADCY4* no grupo HbSS comparado ao grupo controle. **B:** Perfil de expressão dos genes *THSD7A*, *SPOCK1* e *ADCY4* no grupo HbSC comparado ao grupo controle. (a) Teste de Mann-Whitney, (b) Teste de t Student não pareado; *p-valor<0,05; **p-valor<0,01.....62

Figura 19. Análises de correlação entre os dados de metilação por pirosequenciamento e expressão gênica. **A:** Análise dos genes *PTGFR*, *GPR56*, *GALR2* e *ADCY4* no grupo HbSS. **B:** Análise dos genes *SPOCK1*, *THSD7A* e *ADCY4* no grupo HbSC Teste de correlação de Spearman; valores de p <0,05 estão indicados em negrito.....63

Lista de tabelas

Tabela 1. DMRs selecionadas para a validação da metilação. Em negrito estão os CpGs submetidos à análise por pirosequenciamento.....	45
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para as reações de PCR e pirosequenciamento. Os <i>primers</i> F e R foram utilizados na amplificação das regiões contendo os sítios CpGs. Os <i>primers</i> Seq foram utilizados nos ensaios de pirosequenciamento.....	48
Tabela 3. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para qRT-PCR.....	51
Tabela 4. Características clínicas das mães e recém-nascidos (RN).....	55
Tabela 5. Análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO) dos genes relacionados às DMRs provenientes da comparação HbSS vs. HbAA.....	59
Tabela 6. Análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO) dos genes relacionados às DMRs provenientes da comparação HbSC vs. HbAA.....	59
Tabela 7. DMRs selecionadas para a validação da metilação.....	60
Tabela 8. Análises de correlação entre os dados de metilação do microarranjo e do pirosequenciamento.....	61

Lista de abreviaturas e siglas

ACTB: Actin beta

ADCY4: Adenylate cyclase 4

APS: Adenosina 5' fosfosulfato

ATP: Adenosina trifosfato

CAISM Centro de Atenção Integral da Saúde da Mulher

cDNA: DNA complementar

DF: Doença Falciforme

DMP: Posições diferencialmente metiladas

DMR: Regiões diferencialmente metiladas

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: dideoxinucleotídeos

FDR: Taxa de falsa descoberta

GALR2: Galanin receptor 2

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GO: Gene Ontology

GPR56: adhesion G protein-coupled receptor G1

Hb: Hemoglobina

HbAA: Genótipo da hemoglobina de estrutura normal em indivíduos saudáveis

HBB: beta globin gene

HbS: Hemoglobina com alteração para a doença falciforme

HbSC: Genótipo da hemoglobina em pacientes com hemoglobinopatia SC

HbSS: Genótipo da hemoglobina em pacientes com anemia falciforme

IDAT: Extensão de arquivo obtido da leitura dos chips de metilação

IMC: Índice de massa corpórea

MgCL: Cloreto de magnésio

N_Shore: Até 2000 pares de base a montante da Ilha CpG

N_Shelf: Entre 2000 a 4000 pares de base a montante da Ilha CpG

ON: Óxido nítrico

Open Sea: Região fora de margens e Ilha CpG

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PPi: Pirofosfato

PTGFR: Prostaglandin F receptor

qPCR: PCR quantitativo

qRT-PCR: PCR quantitativo em Tempo Real

RCF: Restrição do crescimento fetal

RN: Recém-nascido

RNA: Ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

S_Shore: Até 2000 pares de base a jusante da Ilha CpG

SPOCK1: *SPARC (osteonectin)*

S-Shelf: Entre 2000 a 4000 pares de base a jusante da Ilha CpG

THSD7A: *Thrombospondin type 1 domain containing 7A*

TSS1500: 1500 pares de base do sítio de início de transcrição

TSS200: 200 pares de base do sítio de início de transcrição

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

$\Delta\beta$: diferença de metilação entre casos e controles

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	20
Hemoglobinas.....	20
Doença Falciforme.....	21
Prevalência e incidência.....	23
Fisiopatologia.....	24
Manifestações clínicas.....	25
A gravidez na Doença Falciforme.....	26
Pré-natal de alto risco.....	27
Tratamento das complicações na gestação.....	28
A placenta.....	29
A placenta em pacientes com Doença Falciforme.....	30
Mecanismos epigenéticos.....	31
Metilação do DNA.....	32
Doenças maternas como moduladores da metilação do DNA em placenta.....	35
JUSTIFICATIVA.....	36
OBJETIVOS.....	37
Geral.....	37
Específicos.....	37
MATERIAS E MÉTODOS.....	38
Seleção dos pacientes.....	38
Critérios de inclusão e exclusão.....	38
Aspéctos éticos da pesquisa.....	38
Coleta das placentas.....	39
Extração do DNA.....	39
Tratamento do DNA com bissulfito de sódio.....	39
Análise do perfil de metilação.....	40
Preparo dos microarranjos de metilação.....	42
Análise dos dados dos microarranjos de metilação.....	42
Seleção das DMRs para validação.....	44
Validação da metilação por pirosequenciamento.....	46
Desenho dos <i>primers</i> para PCR e pirosequenciamento.....	47
Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	48

Reação de pirosequenciamento.....	49
Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR).....	49
Extração de RNA.....	50
Síntese de cDNA.....	50
Desenho dos <i>primers</i> para qRT-PCR.....	50
Padronização da qRT-PCR.....	51
Reação qRT-PCR.....	52
Análise estatística dos dados de pirosequenciamento e qRT-PCR.....	53
RESULTADOS.....	54
Características clínicas.....	54
Análise dos dados dos microarranjos de metilação.....	55
Validação da metilação por pirosequenciamento.....	60
Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR.....	62
Análise de correlação entre os dados de metilação e expressão gênica.....	63
DISCUSSÃO.....	64
CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS.....	82
Anexo 1: Parecer do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp – pacientes provenientes do CAISM.....	82
Anexo 2: Parecer do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp – pacientes provenientes da Maternidade de Campinas.....	86
Anexo 3: Termo de consentimento livre e esclarecido – CAISM.....	91
Anexo 4: Termo de consentimento livre e esclarecido – Maternidade de Campinas.....	95
Anexo 5: Protocolo para coleta de placentas.....	100
Anexo 6: Artigo submetido para análise.....	108

INTRODUÇÃO

Hemoglobinas

A molécula de hemoglobina (Hb) é uma metaloproteína encontrada no interior das hemácias e apresenta um importante papel no transporte de oxigênio para os tecidos, permitindo assegurar as necessidades metabólicas das células. Além disso, também atua no transporte de dióxido de carbono e manutenção do equilíbrio ácido-base (1). A Hb é composta por quatro cadeias globínicas ($\alpha_2\beta_2$), sendo um par de cadeias tipo alfa, e um par de cadeias do tipo beta. Cada cadeia globínica possui em seu interior um radical heme que contém um átomo de ferro responsável pela ligação com o oxigênio (Figura 1) (2).

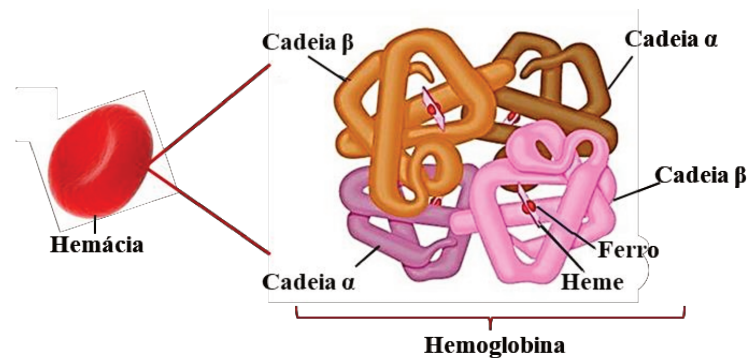


Figura 1. Molécula de hemoglobina e suas quatro subunidades, sendo duas delas α e duas delas β com seus respectivos grupos heme ao centro. **Fonte:** Adaptada de Magalhães (2015) (3)

As subunidades desta molécula são codificadas por um pequeno grupo de genes (*cluster α* e *cluster β*) que são expressos durante o desenvolvimento. Os genes do *cluster α* estão agrupados no braço curto do cromossomo 16, enquanto os genes do *cluster β* estão agrupados no braço curto do cromossomo 11, como demonstrado na figura 2 (4).

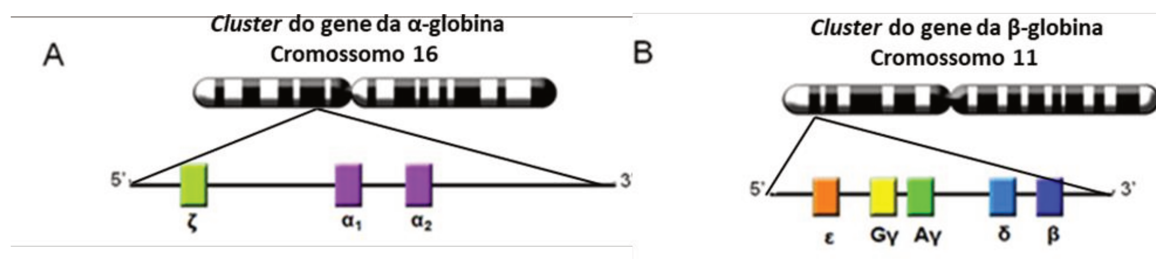


Figura 2. A: Cluster do gene da α -globina localizado no braço curto do cromossomo 16. **B:** Cluster do gene da β -globina localizado no braço curto do cromossomo 11. **Fonte:** Adaptada de Bank (2005) (5).

Para cada estágio do desenvolvimento humano (embrionário, fetal e adulto) há a produção de Hbs específicas.

Estágio embrionário:

- Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$)
- Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$)
- Hb de Portland ($\zeta_2\gamma_2$)

Estágio fetal:

- HbF ($\alpha_2\gamma_2$)

Estágio adulto:

- HbA ($\alpha_2\beta_2$)
- HbA2 ($\alpha_2\delta_2$)

No estágio embrionário inicial, o tetrâmero da Hb Gower 1 consiste de duas cadeias ζ (cluster α) e duas cadeias ε (cluster β). No período de transição entre os estágios embrionário e fetal, a Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) são detectadas. A HbF ($\alpha_2\gamma_2$) torna-se a hemoglobina predominante ao longo do período fetal restante. Após o nascimento, as cadeias γ gradualmente são substituídas pelas cadeias β e δ . Por volta do sexto mês após o nascimento 97%-98% das hemoglobinas são formadas pelo tetrâmero HbA ($\alpha_2\beta_2$), enquanto a HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) está presente em aproximadamente 2% a 3%. Pequenas quantidades de HbF são também encontradas no sangue de adultos (6–8).

Doença Falciforme

As doenças falciformes (DF) constituem um grupo de doenças genéticas que têm como característica comum a presença da hemoglobina S (HbS), a qual é decorrente de uma mutação no gene da β -globina. A principal característica da HbS é de sofrer polimerização sob baixas tensões de oxigênio (9). A HbS quando polimerizada dentro dos eritrócitos deforma-os fazendo com que os mesmos assumam um formato de foice. Esses glóbulos vermelhos falcizados são precocemente destruídos, com o consequente desenvolvimento de anemia hemolítica crônica. A HbS pode estar em combinação com outras Hbs anormais, como a hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD), hemoglobina E (HbE), beta-talassemia, entre outras. Estas combinações com a HbS, além da HbS em homozigose (HbSS), são conhecidas como doenças falciformes (10).

A DF mais comum e geralmente mais grave é a anemia falciforme caracterizada pela homozigose da HbS, onde o paciente apresenta o genótipo HbSS (11). A HbS é decorrente da

substituição de uma adenina por uma timina no códon 7 (GAG → GTG) do gene da β -globina (Human Genome Variation Society, HGVS, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=334>, acesso em: 20 de março de 2020), o que resulta na troca do aminoácido ácido glutâmico por valina, levando à polimerização das moléculas de HbS quando desoxigenadas (Figura 3) (12).

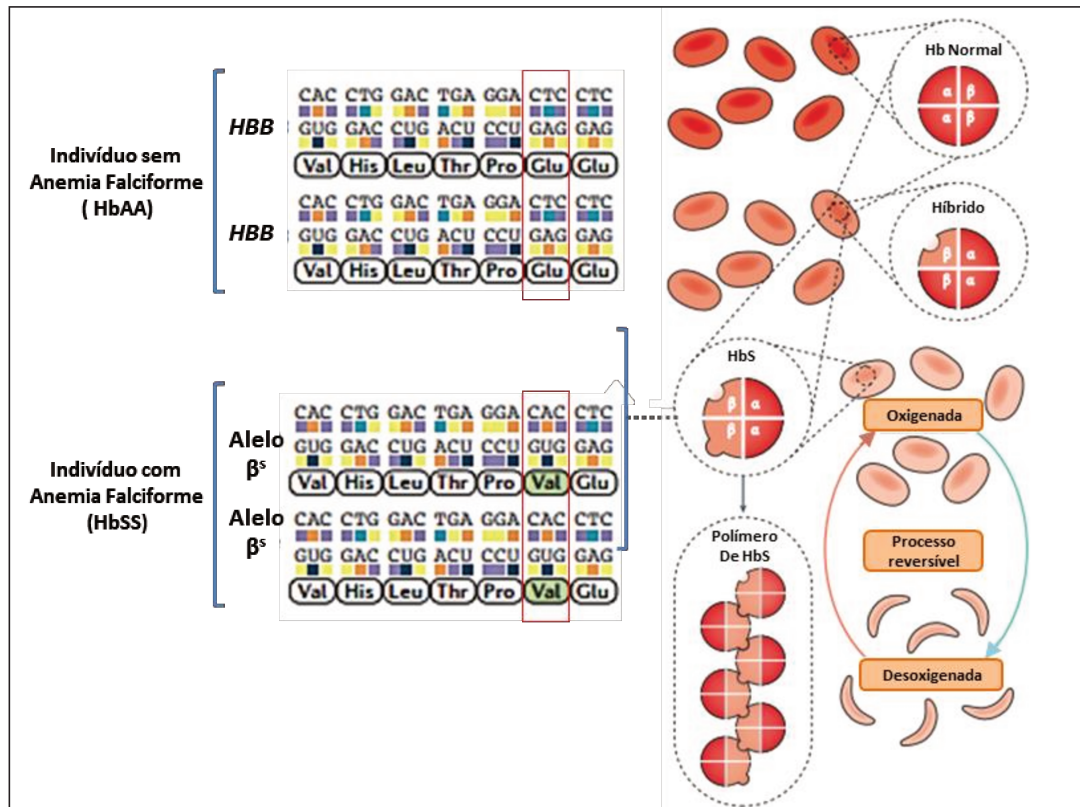


Figura 3. A hemoglobina normal é formada por duas cadeias de α -globina e duas cadeias de β -globina, sendo estas últimas codificadas pelo gene da β -globina (*HBB*). A HbS é decorrente da substituição de uma adenina por uma timina no sétimo códon do gene da β -globina, levando a troca do aminoácido ácido glutâmico por valina. A anemia falciforme ocorre quando o indivíduo apresenta os dois alelos do gene *HBB* alterados (HbSS). Nos indivíduos com essa doença, durante a desoxigenação das hemácias, as moléculas de HbS tendem a se aglomerarem formando longos polímeros, o que altera o formato das hemácias, tornando-as falcizadas. **Fonte:** Adaptada de Kato e colaboradores (2018) (13).

Na anemia falciforme ocorre o predomínio da síntese de HbS, produção normal de HbA2, aumento variável de HbF e ausência de HbA (14). A HbF desempenha um papel importante na anemia falciforme, visto que, sua alta concentração impede a polimerização da HbS e, por consequência, reduz a frequência de eventos vaso-oclusivos, complicações sistêmicas, taxas de hospitalizações e de mortalidade dos pacientes (15,16).

Quando o alelo alterado do gene da β -globina aparece em heterozigose denomina-se traço falciforme (genótipo HbAS). O indivíduo com genótipo HbAS apresenta uma condição benigna, podendo em alguns casos apresentar complicações raras e específicas deste genótipo, que incluem: hematúria (sangue na urina); hifema (sangue dentro da parte anterior do olho); carcinoma medular renal, sendo esta uma malignidade rara (17).

Na hemoglobinopatia SC (HbSC) o paciente possui ambas as Hbs (HbS e HbC), que estão presentes em proporções semelhantes. A HbC é decorrente da substituição do aminoácido ácido glutâmico por lisina ($GAG \rightarrow AAG$)) também no sétimo códon do gene da β -globina. As complicações na doença HbSC ocorrem devido ao fato da HbC apresentar predisposição à cristalização intraeritrocitária que resulta no aumento da densidade celular devido ao efluxo de K^+ e desidratação celular. Estes eventos levam ao aumento da concentração intracelular de Hb, o que aumenta a probabilidade das HbS se polimerizarem (18). Os indivíduos com o genótipo HbSC apresentam um quadro clínico semelhante ao da anemia falciforme, porém, menos grave, com crises de falcização menos frequentes e de menor intensidade (19).

Prevalência e incidência

As hemoglobinopatias hereditárias são as doenças genéticas mais frequentes da população mundial, com alta incidência na África, Índia e Arábia Saudita. A quantidade de indivíduos afetados pela DF em nível mundial é atualmente desconhecida, não podendo ser estimada com confiabilidade, devido à falta de dados epidemiológicos, em particular, informações de mortalidade em áreas de maior prevalência (20). No Brasil, as DF distribuem-se de forma heterogênea, sendo mais frequente em populações onde a proporção de antepassados negros é maior (21). A incidência de DF em recém-nascidos apresenta uma variabilidade entre os estados do Brasil, retratando a heterogeneidade étnica da população brasileira. Em 2014, no estado da Bahia a incidência foi de aproximadamente 1:650 recém-nascidos rastreados, no estado do Rio de Janeiro 1:1.300 e no estado de Santa Catarina 1:13.500. Em 2016, foram diagnosticados 1.071 nascidos-vivos com DF e estima-se que 25 a 30 mil brasileiros sejam portadores de DF (22). No Brasil a prevalência do alelo βS varia de 1,2% a 10,9%, dependendo da região, enquanto que a prevalência do alelo βC varia entre 0,15% e 7,4% (13).

Fisiopatologia

O evento mais comum na DF é a vaso-oclusão que se inicia a partir de uma complexa interação entre reticulócitos, hemácias falcizadas e normais, células endoteliais, leucócitos e plaquetas, além de fatores de coagulação e outras proteínas do plasma, levando a crises dolorosas recorrentes ao longo de toda a vida do indivíduo acometido, o qual pode apresentar isquemia e danos tecidual e funcional progressivos em órgãos e sistemas (Figura 4) (23).

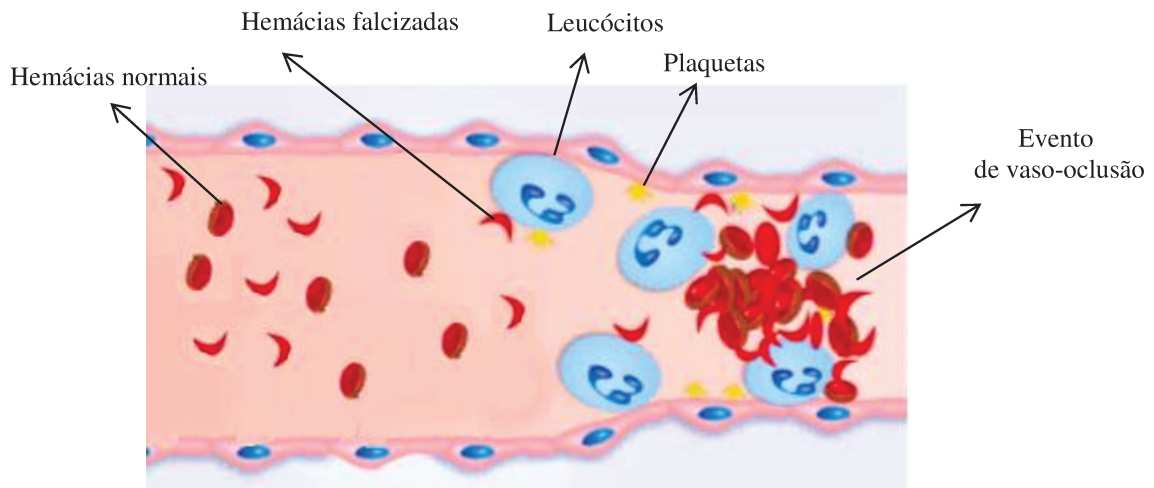


Figura 4. Mecanismo de vaso-oclusão na Doença Falciforme. A vaso-oclusão em pacientes com DF ocorre a partir de uma complexa interação entre eritrócitos falcizados, eritrócitos normais, células endoteliais, leucócitos e plaquetas, bem como fatores de coagulação e outras proteínas do plasma, levando a obstrução parcial ou total do vaso, geralmente por períodos transitórios, acarretando danos em tecidos e órgãos. **Fonte:** Adaptada de Costa e colaboradores (2013) (24).

A adesão de grande número de eritrócitos falcizados na superfície endotelial reduz a luz dos capilares, gerando estase, que poderá se acentuar pela diminuição da temperatura do ambiente. Em consequência da estase, ocorre hipóxia tecidual, levando à desoxigenação de mais moléculas de HbS, o que agrava a situação circulatória já desfavorável, podendo lesar tecidos irrigados por estes capilares. Os tecidos que apresentam perfusão prejudicada podem sofrer infartos seguidos de necrose e formação de fibrose, principalmente na medula óssea, baço e placenta (25).

Há uma alta taxa de hemólise nesses pacientes, o que causa sérios danos ao organismo, uma vez que a hemólise leva à liberação de Hb no plasma, sendo fracionada em heme e globina (26). A hemoglobina, o heme e o ferro livre catalisam a produção de radicais de oxigênio, limitando a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (27). A lise de eritrócitos libera arginase que destrói L-arginina, substrato para a produção de NO. A baixa disponibilidade de NO resulta em vasoconstrição e altera a homeostasia vascular, aumentando

a ativação plaquetária e expressão das moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais (28).

Manifestações clínicas

Os indivíduos com DF apresentam complicações em múltiplos órgãos, com o desenvolvimento de complicações agudas e crônicas. Os avanços nos cuidados médicos gerais, assim como o diagnóstico precoce e o tratamento abrangente conduziram a melhorias substanciais na expectativa e qualidade de vida dos pacientes (29,30). Entretanto, mesmo com a melhoria dos cuidados, a expectativa de vida ainda é baixa, e a rotina e o atendimento de emergência para pessoas com DF têm elevados custos financeiros (31).

Uma das características da DF é a sua variabilidade clínica. Embora os pacientes apresentem a mesma doença genética, o curso clínico pode ser variável, com a presença de complicações de evolução benigna, assintomáticas, até complicações graves e óbito. Os fatores moduladores da gravidade clínica incluem: genótipo, concentração de HbF, haplótipo relacionado ao complexo do gene beta, leucocitose, associação com talassemia alfa, síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral, insuficiência renal (32).

Os recém-nascidos são protegidos pelos elevados níveis de HbF nos eritrócitos durante as primeiras semanas de vida (entre 8ª e 10ª semana). No entanto, como estes níveis diminuem, as manifestações clínicas aparecem e são geralmente observadas após os seis meses de idade (33).

As crises de dor aguda em geral são os primeiros sintomas da doença, compreendendo a complicação mais frequente e a causa mais comum para os pacientes procurarem assistência médica. Apesar de haver uma associação geral entre a intensidade da crise vaso-oclusiva e o genótipo do paciente, existe uma grande variabilidade clínica entre portadores do mesmo genótipo, bem como no mesmo paciente com o passar do tempo (34). O sequestro esplênico e as infecções, principalmente as pulmonares, são as principais manifestações clínicas que acometem crianças. O sequestro esplênico é caracterizado pelo aumento do baço em decorrência da retenção de eritrócitos danificados, levando a sintomas como dor abdominal, fraqueza, taquicardia e diminuição no nível de Hb. Em muitos casos o sequestro esplênico é associado a infecções bacterianas e suas complicações podem comprometer a vida da criança, por isso, em alguns casos faz-se a opção pela retirada do baço (35).

As manifestações clínicas nos pacientes com o genótipo HbSC são semelhantes às observadas nos pacientes com genótipo HbSS, embora pacientes com HbSC apresentem uma evolução menos severa e com menor taxa de complicações (36). No entanto, algumas

complicações ocorrem com maior frequência em doentes com HbSC (como retinopatia proliferativa e osteonecrose) (37). No primeiro ano de vida os sintomas são raros e cerca de um quarto dos pacientes podem permanecer assintomáticos durante os primeiros 10 anos de vida (36).

As complicações na DF podem acometer múltiplos órgãos e dentre as complicações destacam-se as pulmonares (síndrome torácica aguda), neurológicas (risco aumentado de acidente vascular cerebral, ataques isquêmicos transitórios, hemorragia cerebral, convulsões), oftalmológicas (retinopatia), geniturinárias (proteinúria e priapismo), hepatobiliares, manifestações cutâneas (úlceras de perna) e complicações decorrentes da gravidez (37).

A gravidez na Doença Falciforme

Em 1941, uma primeira revisão realizada no Reino Unido relatou uma taxa de 50% de morte fetal entre recém-nascidos de mulheres portadoras de DF (38). Há indicadores de que hoje a taxa de morte fetal tenha sido reduzida, podendo variar de 4,8% a 13,4%. A mortalidade materna já foi muito elevada, alcançando 33%; no entanto, atualmente é estimada em torno de 1,6%, atingindo taxas acima de 9,2% em alguns países com alta incidência da doença (38). Esta queda significativa na mortalidade materna e fetal é consequência de avanços na terapêutica destas pacientes e no diagnóstico e intervenções transfusionais disponíveis. Entretanto, apesar deste cenário positivo a morbidade materna e neonatal permanece alta, com necessidade de seguimento pré-natal criterioso, controle clínico e laboratorial seguido por equipe multidisciplinar e verificação de vitalidade fetal frequente.

A gestação na DF representa uma situação de alto risco tanto para mãe como para o feto, sendo este risco independente do genótipo da gestante (HbSS, HbSC ou HbSβ-Talassemia) (10). Estudos têm mostrado que a gravidez de mulheres com genótipo HbSC é mais benigna quando comparada a mulheres com genótipo HbSS (10,39). É importante ressaltar, no entanto, que a gestação na hemoglobinopatia SC pode iniciar o aparecimento de complicações da doença, que até então apresentava-se oligossintomática ou até mesmo assintomática (10). Em Benin, Mohamed e colaboradores relataram que gestantes com HbSC quando não estavam grávidas apresentavam um quadro relativamente benigno, porém, durante a gravidez o risco de óbito aumentava (40).

Uma variedade de alterações fisiológicas ocorre no período gestacional, podendo interagir negativamente com a HbS promovendo a falcização das hemácias. Dentre as alterações inclui-se o comprometimento da reserva de oxigênio materna, pois há um aumento

do consumo de oxigênio o que diminui a capacidade residual funcional durante a gestação, levando a gestante à hipoxemia e, por consequência a polimerização da HbS (38).

A gestação de mulheres com genótipo HbSS é acompanhada por uma frequência aumentada de infecções, crises álgicas, pielonefrite, complicações pulmonares, eventos tromboembólicos e hemorragia no anteparto (38). Há relatos de que crises de vaso-oclusão e a anemia ocorrem mais frequentemente no período gestacional (principalmente no terceiro trimestre) e são as complicações maternas mais comuns relacionadas com a doença, ocorrendo em mais de 50% das gestantes com esta hemoglobinopatia (41).

Os eventos tromboembólicos venosos também compreendem um fator importante durante a gestação, uma vez que mulheres com genótipo HbSS apresentam 6,7 vezes mais chance de desenvolver tromboembolismo venoso durante a gravidez do que as mulheres saudáveis, com estrutura normal da hemoglobina. Entretanto, o uso de anticoagulantes de modo profilático não foi propriamente estudado nestas gestantes, dessa forma, seu uso não é aconselhado (42).

As complicações fetais observadas em gestantes com DF relacionam-se com o comprometimento do fluxo sanguíneo na placenta. Dentre as complicações destacam-se o aborto espontâneo, baixo peso ao nascimento, restrição do crescimento fetal (RCF), parto prematuro e morte fetal (43,44). Nana e colaboradores relataram uma ocorrência de RCF mais elevada em mulheres com genótipo HbSS em comparação com mulheres com genótipo HbSC, o que pode ser explicado pela anemia crônica materna e frequência aumentada de falcização, assim como pelo nível de oxigênio reduzido na circulação placentária das gestantes com HbSS (45).

Pré-natal de alto risco

Mulheres com DF que tem a gravidez confirmada necessitam de um atendimento pré-natal com uma equipe multidisciplinar. A melhora nos desfechos maternos e fetais tem sido atribuída à melhora na atenção obstétrica e hematológica, com melhor apoio ao seguimento de terapia intensiva e transfusional (42).

Durante o pré-natal de alto risco a equipe médica tem como foco a identificação dos fatores de risco para baixo peso ao nascimento, partos pré-termos e demais complicações maternas associadas à gestação na DF. Caracterizar os antecedentes clínicos e obstétricos, avaliar complicações prévias, histórico transfusional e terapêutica são fundamentais. A nutrição adequada e profilaxia de fatores que iniciem crises dolorosas devem ser enfatizadas. Além disso, o monitoramento do peso necessita ser criterioso e a medida do tamanho do baço

deve ser um cuidado adicional naquelas que apresentam esplenomegalia, com o intuito de detectar precocemente o sequestro esplênico (37,46). O cuidado pré-natal ainda inclui a triagem de infecções de forma rigorosa, bem como a realização de vacinação (incluindo vacinação para meningite e pneumococo), avaliação cardiológica (especialmente nos casos com complicações prévias e antecedente transfusional) e controle periódico de vitalidade fetal (37,40).

Finalizada a avaliação médica, a gestante receberá orientações quanto aos fatores específicos que podem influenciar o curso da gravidez como a suplementação com vitaminas, o uso de ácido fólico e as necessidades nutricionais. A suplementação de ferro é uma medida a ser realizada somente na presença de deficiência de ferro documentada (em alguns casos há o aumento de estoque de ferro decorrente de transfusões sanguíneas anteriores). O estímulo a diária de líquidos para evitar desidratação deve ser recomendada. As pacientes são orientadas a procurar atendimento médico imediato na presença de cefaléia, dor abdominal, edema, cólicas e secreção vaginal, devido à alta taxa de pré-eclâmpsia e trabalho de parto prematuro (47). O intervalo entre as consultas é programado de maneira individualizada, no geral são consultas a cada 15 dias até a 28ª semana e após esse período são realizadas semanalmente. Nestas consultas são avaliadas e monitoradas a pressão arterial, taxa de crescimento uterino e também o ganho de peso. Alguns exames são realizados a cada trimestre, como o hemograma completo, urocultura, contagem de reticulócitos, glicemia, prova de função hepática e renal, sorologias e proteínas totais (47).

Tratamento das complicações na gestação

Para as gestantes que apresentam dor de alta intensidade, a analgesia por opiáceos (codeína e morfina) é a mais indicada. Muitos relatórios não apontam evidências de teratogenicidade quanto à administração de opiáceos na gravidez; no entanto a exposição por longo prazo pode resultar em síndrome de abstinência neonatal logo após o nascimento (48).

Para as pacientes em terapia com hidroxiureia antes da gravidez há a orientação de suspensão de seu uso, visto que o Programa Nacional de Toxicologia considerou a possibilidade de comprometimento do desenvolvimento de fetos de camundongos e ratos em decorrência do uso materno de hidroxiureia no período gestacional; no entanto ainda não há relatos em humanos (49).

Estudos sobre a transfusão profilática no Brasil tem mostrado haver uma diminuição significativa de complicações maternas e fetais (50–52), sendo assim indicada, principalmente, para pacientes que desenvolvem eventos adversos, como por exemplo, uma

redução importante nos níveis de Hb (<50-60 g/L, ou uma redução de 20% da quantidade normal) ou que apresentem doenças cardíacas, crises de vaso-oclusão, problemas respiratórios, gestações gemelares ou histórico de morte fetal (53).

Cerca de 10% a 20% das pacientes estão propensas a desenvolverem pré-eclâmpsia; no entanto, as intervenções profiláticas para reduzir esta complicação são limitadas. Estudos relatam que baixas doses de aspirina iniciada na 12ª semana de gestação até o final da gravidez apontou redução da ocorrência de pré-eclâmpsia em grupos de gestantes de alto risco (54). Esses testes ainda não foram formalmente testados especificamente em mulheres com DF, mas é possível que a aspirina tenha um benefício similar para essas pacientes.

A Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea incluiu a DF entre as doenças que apresentam indicação de transplante de medula óssea, sendo este o único tratamento curativo conhecido. Recentemente, o Ministério da Saúde aumentou a faixa etária (acima de 16 anos) para transplante alogênico aparentado de medula óssea em pacientes com DF, a fim de dar melhor qualidade de vida a essas pessoas (55). No entanto, a grande maioria dos pacientes não possui doadores compatíveis relacionados e os transplantes de doadores compatíveis ainda correspondem a taxas muito altas de mortalidade (56).

A placenta

A placenta é um órgão altamente especializado, que juntamente com as membranas fetais e o líquido amniótico suportam o crescimento e desenvolvimento normal do feto. A placenta pode desempenhar vários papéis, atuando como uma interface imunológica entre a mãe e o feto, bem como servindo para o transporte de gases, nutrientes e resíduos e também sendo fonte de muitos peptídeos e hormônios esteroides que influenciam o metabolismo fetal, placentário e materno (57).

Este órgão possui uma porção fetal e uma porção materna. A porção fetal é derivada do córion viloso, enquanto que a porção materna é originada de uma parte do endométrio uterino denominada decídua basal (Figura 5) (58). O córion é constituído por tecidos originários do citotrofoblasto, sinciotrofoblasto e mesoderma extraembrionário. A partir do início da terceira semana há o desenvolvimento de vilosidades em toda a porção do córion. O saco coriônico mantém-se envolto pelas vilosidades coriônicas até o final da sétima semana. Durante o restante da gravidez, as vilosidades aumentam em sua quantidade, se ramificam, crescem e tornam-se vascularizadas (58,59). Com o crescimento constante do feto o útero se expande e a placenta aumenta seu tamanho. A placenta totalmente desenvolvida mede de 15 a 25 cm de diâmetro, com cerca de 3 cm de espessura (58). No final do 1º trimestre, a

proporção entre o peso da placenta e do feto é 1:1 e, ao final da gravidez, esta proporção é de aproximadamente 1:6 (60,61).

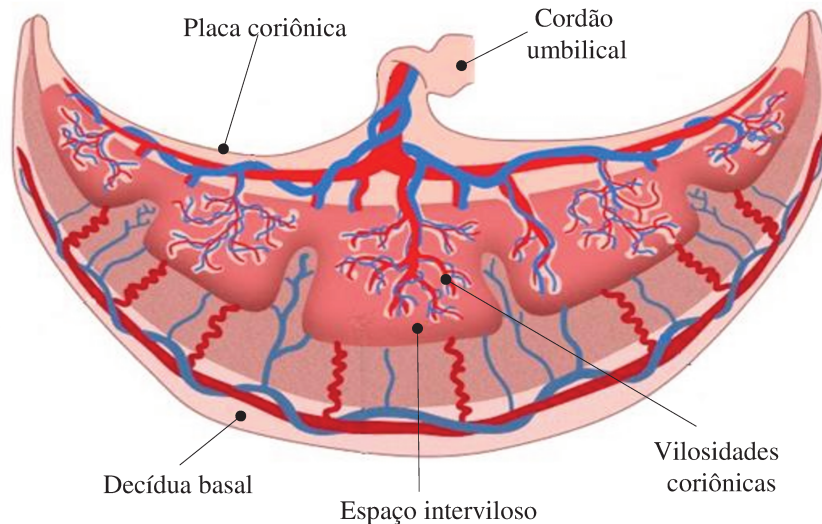


Figura 5. Desenho representativo de uma secção transversal de placenta humana. **Fonte:** Adaptada de Escomez (2019) (62).

A placenta em pacientes com Doença Falciforme

A placenta de pacientes com DF pode apresentar algumas anormalidades que estão relacionadas ao seu tamanho, aderência à parede uterina e também a histologia. Em algumas gestantes com DF há o descolamento da placenta que pode ser consequente de repetitivos eventos de vaso-oclusão, levando à trombose da arteríola decidual, necrose decidual e hemorragia venosa subsequente (63–65).

Estudos de ultrassonografia de Doppler avaliaram o fluxo sanguíneo útero-placentário em gestantes com DF e demonstraram evidências de fluxo sanguíneo restrito, o que poderia ser decorrente de possíveis lesões vasculares, estreitamento ou vasoconstrição (66). É provável que a vaso-oclusão crônica, mesmo sem crises de dor clinicamente evidentes ou síndrome torácica aguda, favoreça lesões na placenta e afete negativamente o desenvolvimento fetal (67).

Tramont e colaboradores examinaram macro e microscopicamente placentas de mulheres com DF e compararam a um grupo controle. Os autores relataram alta frequência de anomalias vasculares principalmente no parênquima entre o feto e as superfícies maternas, bem como um excesso de aglomerados sinciciais e depósitos de fibrina, associados ou não à necrose vilosa e congestão (68).

Embora as disfunções observadas nas placentas de pacientes portadoras de DF sejam conhecidas e reportadas, poucos estudos relatam o perfil molecular relacionado à expressão e regulação gênica nestes tecidos. Um dos poucos estudos de expressão gênica em placentas de portadoras de DF foi realizado por Baptista *et al.*. Neste estudo os genes, *IL1RAP*, *BCL6*, *CXCL101* e o *C3*, envolvidos na via de inflamação, apresentaram-se diferencialmente expressos no tecido de placenta de mulheres com doença falciforme quando comparados ao grupo controle, indicando que a placenta pode se tornar um ambiente de hipóxia e de inflamação aumentada, o que poderia levar ao desenvolvimento inadequado da mesma (69). Em outro estudo, um relato de caso, realizado também por Baptista *et al.*, analisou a expressão gênica em tecido de duas placentas de diferentes gestações de uma mesma paciente com DF, onde em uma das gestações a paciente apresentou pré-eclâmpsia. Após a comparação da expressão gênica das placentas foram identificados 64 genes diferencialmente expressos, sendo 59 regulados positivamente e 5 regulados negativamente, indicando que a doença falciforme associada à pré-eclâmpsia tem uma grande influência na modulação da expressão gênica do tecido da placenta destas gestantes (70).

Mecanismos epigenéticos

O conceito de epigenética foi primeiramente introduzido pelo embriologista e geneticista britânico Conrad Hal Waddington na década de 1940 para descrever o estudo das causas do desenvolvimento (71). Estudos primordiais em epigenética descreveram que a heterocromatina e a eucromatina estão associadas com o padrão de metilação do DNA e modificação das histonas, ambas relacionadas à atividade gênica, levando à ideia de que um “código epigenético” determina o estado da cromatina e consequentemente a expressão dos genes (72). A palavra epigenética significa “mudanças em adição à sequência genética”. O termo foi desenvolvido para incluir processos que modificam a atividade de determinado gene sem alterar a sequência das bases do DNA. Este mecanismo leva a modificações que podem ser transmitidas para as células filhas através das divisões celulares (mitose e meiose), além de ser um processo que pode ser reversível (73,74). As alterações epigenéticas podem ser descritas por três mecanismos: modificações das histonas, RNAs não codificadores (ncRNA) e a metilação do DNA (75,76). Esses processos interferem no acesso de diversos fatores de transcrição à fita de DNA e, consequentemente, modulam a expressão gênica podendo dar origem aos fenótipos patológicos (77).

As modificações das histonas são alterações epigenéticas frequentemente observadas em células tumorais. As histonas são proteínas conservadas que apresentam domínios

carboxi-terminais cruciais para a formação do nucleossomo, e caudas terminais flexíveis que conectam com os nucleossomos adjacentes formando e ordenando as estruturas da cromatina (78). Cerca de oito modificações pós-traducionais ocorrem nas histonas, incluindo a metilação, acetilação, ubiquitinação, fosforilação, biotinilação, sumoilação e ribosilação, as quais foram já identificadas nas histonas H2A, H2B, H3, H4, e na família das histonas ligantes H1 (79,80). Estas marcas nas histonas são de grande importância e estão envolvidas na organização da cromatina, manutenção da estabilidade do genoma, silenciamento de sequências repetitivas do DNA, reconhecimento de sítios de danos e reparo do DNA e na manutenção de expressão gênica adequada (78).

Outra classe de moléculas que participam dos eventos epigenéticos são os RNAs não codificadores (ncRNAs). De acordo com os estudos da última década, esses ncRNAs emergiram como moléculas-chave na regulação das funções celulares em mamíferos. Os ncRNAs são reguladores fundamentais relacionados a várias doenças, e regulam a transcrição de genes em nível pós-transcricional (81). Desde a primeira descoberta dos ncRNAs em *Caenorhabditis elegans*, centenas de ncRNAs foram identificados em eucariotos por influenciarem processos fisiológicos, tais como, o desenvolvimento, crescimento, diferenciação, reações imunológicas, e a adaptação ao estresse (81,82).

Metilação do DNA

A metilação do DNA é um importante mecanismo de modificação encontrado ao longo do genoma, ocorrendo em quase todos os organismos vivos desde invertebrados a vertebrados. No entanto, sua abundância e função variam entre os organismos desde o DNA fortemente metilado de muitos vertebrados até o genoma desmetilado de *Caenorhabditis elegans*. Os variados padrões da metilação do DNA encontrados entre as espécies revelam as diferentes funções que estas alterações no DNA exercem em seus genomas. A metilação do DNA em organismos eucariotos ocorre predominantemente em dinucleotídeos CpG e, dependendo a região, está associada com o estado de repressão da cromatina e a inibição da expressão gênica. Em plantas e fungos a metilação pode ocorrer em sítios diferentes, como CpNpG, e nos procariotos a metilação pode ocorrer tanto em bases citosina como adenina, fazendo parte de importantes sistemas de repressão (83,84).

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH₃) é adicionado ao carbono 5 de uma citosina em dinucleotídeos citosina-guanina (CpG), resultando na formação de um composto chamando 5-metilcitosina (m5C) (Figura 6). A adição do grupo metil à citosina é realizada pela ação de enzimas da família DNA

metiltransferases (DNMT). As DNMTs estão envolvidas em processos específicos de metilação, como por exemplo, a enzima DNMT1 envolvida na metilação de fitas hemimetiladas do DNA (fitas de DNA em processo de replicação). Já as enzimas, DNMT3A e DNMT3B1 estão envolvidas nos processos de metilação *de novo*, que ocorre em sítios com nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia (85). Outro grupo de enzimas é responsável pela desmetilação do DNA. O processo denominado de desmetilação ativa envolve as desmetilases e parece ser necessário para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvimento ou em respostas a perturbações ambientais (86).

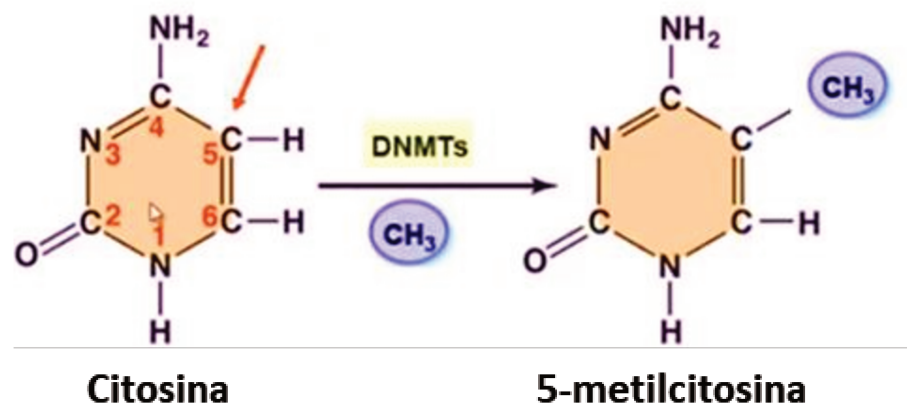


Figura 6: A metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil (CH₃) ao carbono 5 de uma citosina, a partir da ação de enzimas da família DNMT, formando o composto 5-metilcitosina. **Fonte:** Adaptada de Matos (2016) (87).

Os dinucleotídeos CpG compõem aproximadamente 2-5% do genoma, porém não são igualmente distribuídos (88). Eles são encontrados principalmente em sequências repetitivas, como nas SINEs e LINEs (*short interspersed nuclear elements* e *long interspersed nuclear elements*), e em regiões promotoras de genes, formando as chamadas ilhas CpGs (75,88). Em regiões promotoras estas ilhas CpGs podem estender-se até o primeiro éxon, podendo variar de 0,5 a 5Kb e frequentemente não estão metiladas. As ilhas CpGs estão presentes em aproximadamente metade de todos os genes humanos, podendo ser encontradas tanto em genes constitutivos como em genes com expressão tecido-específico (89,90).

A metilação do DNA pode controlar diferentes processos do genoma, como por exemplo, a recombinação durante a meiose, controle da replicação, estabilização e manutenção da expressão gênica, regulação da diferenciação celular, *imprint* genômico e inativação do cromossomo X, sendo estas funções essenciais durante a morfogênese para que

ocorra o desenvolvimento normal do organismo. No entanto, modificações no padrão de metilação em regiões regulatórias de genes podem levar à alteração na expressão ou até mesmo à perda da função gênica. Fatores como, a exposição prolongada a um conjunto de agentes químicos, físicos ou biológicos, bem como fatores relacionados ao estilo de vida, podem induzir mudanças na metilação do DNA que podem contribuir para o desenvolvimento de patologias (91,92).

Importantes hipóteses foram propostas para explicar o mecanismo pelo qual a metilação inibe a expressão gênica. O primeiro deles sugere que os grupamentos metil em promotores inibam a ligação de fatores de transcrição e a RNA polimerase seja impedida de transcrever o gene (Figura 7) (93). O segundo propõe que a metilação pode ter consequências diretas no posicionamento do nucleossomo, reunindo, por exemplo, uma série de estruturas nucleossômicas especializadas em DNA metilado que silenciam a transcrição mais efetivamente do que a cromatina convencional (94). O terceiro sugere que a metilação leva ao recrutamento de fatores especializados que se ligam ao DNA metilado, os quais competem com os fatores de transcrição por seus sítios de ligação, tornando a cromatina menos acessível (95).

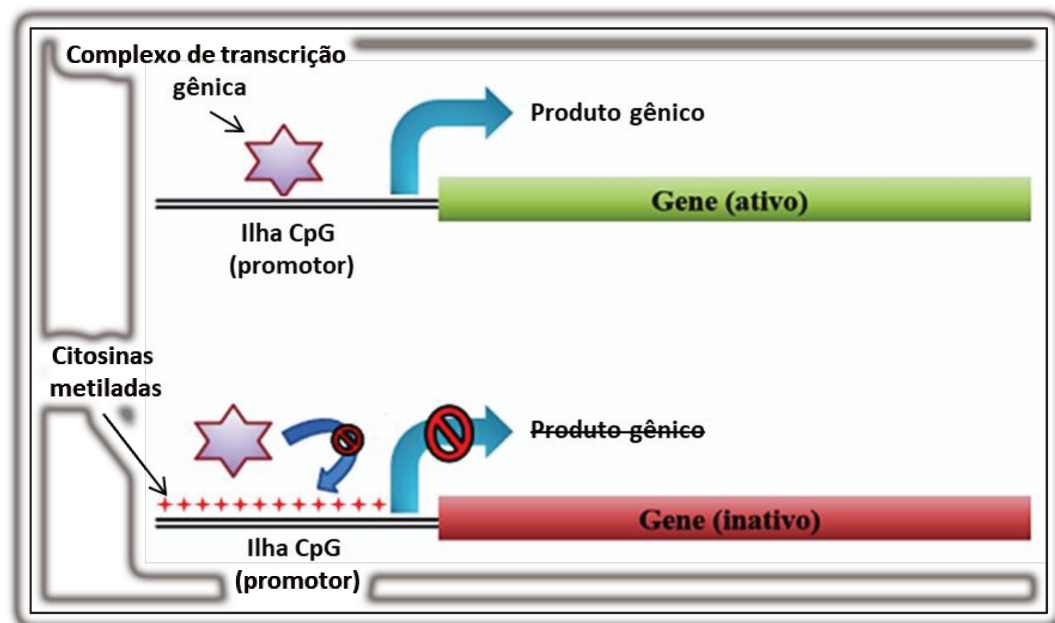


Figura 7: Representação esquemática do efeito da metilação em um promotor gênico: promotores que apresentam hipermetilação em ilhas CpGs podem inibir a ligação de fatores de transcrição à fita de DNA, levando à inativação desses genes. **Fonte:** Adaptada de Matos (2016) (87).

Doenças maternas como moduladores da metilação do DNA em placenta

Estudos recentes indicam que algumas morbidades materna durante a gestação, tais como: hipertensão, diabetes melitus e tabagismo, podem alterar o padrão de metilação do DNA e modificar os níveis de expressão gênica nos tecidos de placentas, o que pode levar a uma disfunção placentária ou fetal (96).

Um trabalho realizado por Gagné *et al.*, avaliou a metilação do DNA de placentas de mulheres acometidas por diabetes mellitus durante a gestação, e identificou uma alteração na metilação do gene *LPL* (Lipoprotein lipase), quando comparado ao grupo controle. Essa mudança da metilação do gene *LPL* esteve também associada ao ganho de peso entre crianças com idade de 5 anos, indicando que a mudança epigenética na placenta pode contribuir para a disfunção de vias metabólicas em algum momento da vida do recém nascido (96).

Em 2016, na Espanha, Morales e colaboradores avaliaram o perfil de metilação do DNA de placentas em relação ao tabagismo materno durante a gestação e identificaram vários loci alterados, dos quais 3 foram validados e associados ao baixo peso dos recém-nascidos. Esses resultados indicam que o tabagismo materno na gravidez afeta o perfil de metilação placentária, podendo prejudicar o ganho de peso dos recém-nascidos durante a gestação (97).

Em outro estudo, Nogueira e colaboradores mostraram que a obesidade materna pode influenciar a mudança de expressão e metilação dos promotores dos genes da leptina e adiponectina na placenta. Dado que estas adiponectinas são importantes para o desenvolvimento funcional e adequado da placenta, os resultados indicam que pode haver uma possível perda dos efeitos benéficos dessas duas proteínas no desenvolvimento placentário sob a influência da obesidade materna (98).

Desta forma, mulheres que apresentam alguma morbidade no período gestacional podem apresentar alterações do padrão de metilação do DNA na placenta, possivelmente associados às disfunções placentárias ou fetais. Sendo assim, é possível sugerir que a presença da DF possa favorecer a alterações da metilação do DNA no tecido placentário, pelo fato da placenta estar sob condições advindas da fisiopatologia da DF.

JUSTIFICATIVA

A gestação de mulheres portadoras de DF necessita de um acompanhamento pré-natal de alto risco por estar associada a complicações maternas e fetais. As placentas de pacientes com DF apresentam anormalidades no tamanho, histologia, bem como na aderência à parede uterina. Em algumas gestantes falciformes pode haver o descolamento da placenta, decorrente do processo de vaso-oclusão, levando à trombose da arteríola decidual, necrose decidual e hemorragia venosa subsequente. Embora as disfunções observadas nas placentas de pacientes portadoras de DF sejam conhecidas e reportadas, poucos estudos relatam sobre o comportamento molecular em nível de expressão e regulação gênicas neste tecido.

Um dos poucos estudos de expressão gênica em tecido de placenta de portadoras de DF mostrou que genes envolvidos na via de inflamação apresentaram-se diferencialmente expressos, indicando que a DF pode afetar o padrão de expressão gênica nestes tecidos. Um dos mecanismos de regulação gênica é a metilação de DNA, o qual atua no controle das funções celulares por meio desta regulação. O perfil de metilação do DNA pode sofrer modificações por diversos fatores, incluindo a presença de patologias.

Estudos mostraram que patologias maternas durante a gestação podem alterar o perfil de metilação do DNA em placenta, podendo levar à alteração da expressão gênica e consequentes disfunções placentárias e fetais.

Diante desse cenário, é possível sugerir que gestantes com DF apresentem placentas com perfil de metilação do DNA alterado, o qual poderia influenciar na mudança de expressão gênica, podendo levar a disfunções placentárias e fetais. Portanto, propomos avaliar o padrão de metilação destas placentas, visto que os resultados poderão fornecer importantes dados para se compreender como a DF pode afetar a fisiopatologia placentária em nível de regulação gênica, criando oportunidades para estudos futuros e maiores possibilidades para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

OBJETIVOS

Geral

- Avaliar o perfil de metilação global do DNA de placentas de mulheres com anemia falciforme (HbSS) e hemoglobinopatia SC (HbSC), comparadas a placentas de mulheres saudáveis (HbAA - grupo controle).

Específicos

- Avaliar o perfil de metilação do DNA em tecido placentário do grupo **HbSS** comparado com o grupo controle por meio da análise de metilação global.
- Avaliar o perfil de metilação do DNA em tecido placentário do grupo **HbSC** comparado com o grupo controle por meio da análise de metilação global.
- Investigar se há diferença de expressão dos genes identificados diferencialmente metilados no tecido placentário dos grupos HbSS e HbSC, quando comparados ao grupo controle.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos pacientes

Este é um estudo caso-controle, no qual foram avaliados três grupos de gestantes. O grupo 1 foi composto por 11 gestantes com anemia falciforme (HbSS), o grupo 2 por 11 gestantes com hemoglobinopatia SC (HbSC) e o grupo 3 por 21 gestantes saudáveis, sem complicações durante a gravidez (grupo controle - HbAA). As gestantes com DF estavam em acompanhamento no ambulatório de Pré-Natal no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti da UNICAMP. Entre as gestantes incluídas no grupo controle, 7 foram provenientes do CAISM e 14 foram provenientes da Maternidade de Campinas. O período de seleção das pacientes e coleta das amostras foi de fevereiro de 2018 a abril de 2019.

Crítérios de inclusão e exclusão

Para os grupos 1 e 2 foram incluídas gestantes com diagnóstico de doença falciforme (HbSS ou HbSC) comprovado por eletroforese de Hb e que tiveram parto cesárea. Foram excluídas do estudo as gestantes tabagistas e que tiveram parto normal.

Para o grupo 3, foram incluídas gestantes que tiveram confirmação da HbAA por eletroforese de Hb e parto cesárea. Foram excluídas gestantes com diabetes, hipertensão, infecções maternas durante o pré-natal, proteinúria, parto normal, anomalias fetais, e também gestantes tabagistas.

As gestantes que tiveram parto normal foram excluídas do estudo para evitar viés nas análises, uma vez que o trabalho de parto pode levar a mudanças do perfil epigenético necessárias para ativação ou inibição da atividade gênica durante o parto normal. Dessa forma, somente gestantes que foram submetidas a parto cesárea foram selecionadas para o estudo.

Aspectos éticos da pesquisa

Conforme determinações estabelecidas na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, o presente estudo seguiu os princípios enunciados do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – FCM da UNICAMP, sendo aprovado segundo o parecer nº 2.502.968 referente ao uso das amostras do CAISM (Anexo 1) e o parecer nº 31.300.48 referente ao uso das amostras provenientes da Maternidade de Campinas (Anexo 2).

Todas as gestantes que participaram do estudo (CAISM e Maternidade de Campinas) assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3 e Anexo 4).

Depois de realizar a coleta de dados, as fichas contendo as informações dos prontuários foram numeradas e, em banco eletrônico, foram suprimidos os nomes ou iniciais das gestantes como forma de preservar a confidencialidade.

Coleta das placentas

As placentas, armazenadas a 4°C, foram coletadas dentro de 3 horas após o parto. Inicialmente foi realizada uma lavagem da placenta em solução estéril de tampão fosfato (PBS) para remover o restante do sangue materno. Em seguida, as amostras de vilosidades coriônicas foram coletadas (~200 mg) a partir do lado materno da placenta em 4 regiões equidistantes da inserção do cordão umbilical, evitando áreas de infarto visíveis ou calcificações (99). Imediatamente após a coleta, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a extração do DNA e do RNA. Para as amostras que foram imersas em *RNAlater* (Invitrogen, CA, EUA) seguiram-se as instruções do fabricante e armazenadas em geladeira a 4°C por 12 horas para depois serem estocadas em freezer -80°C até o momento da extração do RNA (ácido ribonucleico) total. O protocolo utilizado para a coleta das vilosidades coriônicas encontra-se detalhado no Anexo 3.

Extração de DNA

As amostras de tecido placentário foram submetidas à extração de DNA utilizando-se o *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Hamburg, Germany), seguindo-se o protocolo do fabricante. Para verificação da pureza foi utilizado o NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher, CA, USA). A quantificação do DNA foi feita com o *Qubit® Assay Kit dsDNA BR Assay* (Life Technologies, CA, USA) no Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, CA, USA). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

Para se diferenciar as citosinas metiladas das não metiladas foi realizado o tratamento do DNA com bissulfito de sódio por meio do kit *EZ DNA Methylation-Gold™* (Zymo Research, CA, USA), onde as citosinas não metiladas são convertidas em uracila, enquanto que as citosinas metiladas se mantêm inalteradas (Figura 10). A quantidade inicial do DNA utilizado foi de 1 ng e as etapas incluíram desnaturação, reação com o bissulfito, purificação, eluição, dessulfonação e precipitação. As etapas foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA convertido foi armazenado a -20°C para uso posterior.

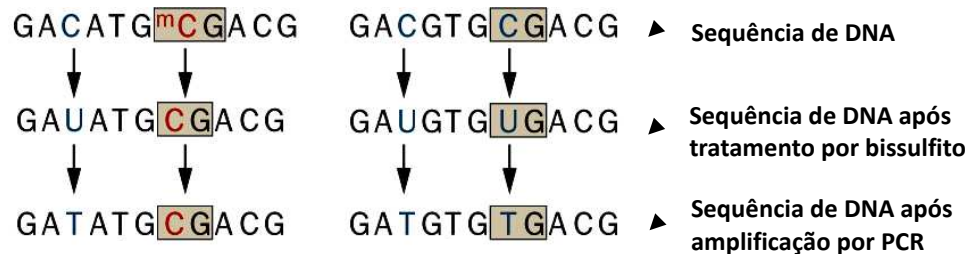


Figura 8. Tratamento do DNA com bissulfito. As citosinas não metiladas são convertidas em uracila, enquanto as citosinas metiladas não sofrem alteração. Quando o DNA tratado é submetido à amplificação por PCR as uracilas presentes na sequência são substituídas pela base timina. Com isso, as citosinas presentes podem ser identificadas e quantificadas, para cada sítio de interesse, obtendo-se assim os níveis de metilação dos sítios CpGs.

Análise do perfil de metilação

Para a análise do perfil de metilação foi utilizado o microarranjo *Infinium MethylationEPIC Bead Chip 850K* da Illumina (Illumina Inc, CA, USA), o qual interroga mais de 850 mil sítios CpGs (853.307) por amostra. Estes sítios estão distribuídos em várias regiões do genoma, tais como: regiões intensificadoras (*enhancers*), promotoras, corpo do gene (exons e introns) e regiões intergênicas (100). Os sítios CpGs apresentam duas classificações, uma de acordo com sua localização no gene e outra de acordo com sua localização na ilha CpG (Figura 8).

A plataforma Illumina utiliza dois ensaios químicos que consistem no *Infinium I* (16,2% das sondas) e no *Infinium II* (83,8% das sondas). Ambos os ensaios reportam os níveis de metilação a partir das cores verde (*status* não metilado) e vermelho (*status* metilado). No ensaio *Infinium I*, duas sondas são utilizadas para interrogar o lócus CpG, sendo uma sonda para o CpG metilado e uma sonda para o CpG não metilado. Para o ensaio *Infinium II* apenas uma sonda por lócus CpG é utilizada, neste caso o *status* de metilação é obtido a partir da extensão da base seguinte marcada. Se a base estendida for guanina obtém-se o *status* metilado, se for adenina obtém-se o *status* não metilado (Figura 9) (101).

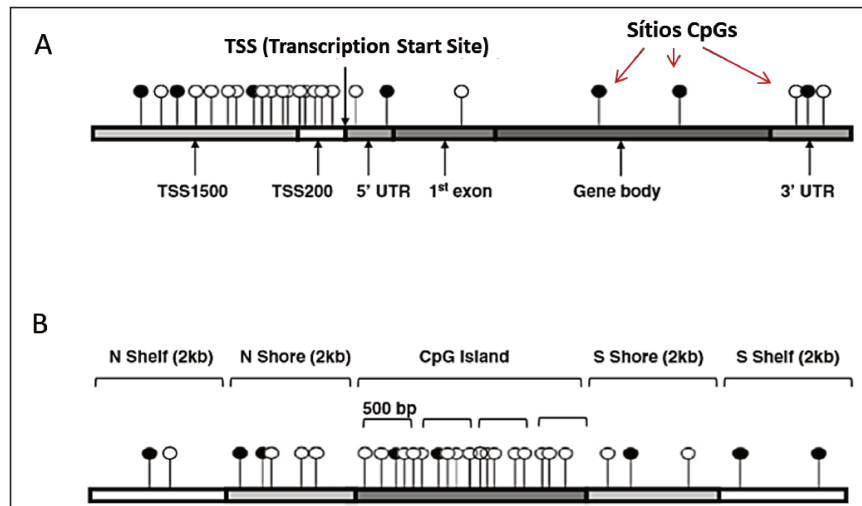


Figura 9. Classificação dos sítios CpGs em relação ao gene e em relação a Ilha CpG. **A:** A classificação em relação ao gene é dada em TSS1500 (até 1500 bases do sítio de início de transcrição - TSS), TSS200 (até 200 bases do sítio de início de transcrição); 5' e 3' UTR (*untranslated region*), primeiro éxon, corpo de gene e região intergênica. **B:** A classificação em relação à Ilha CpG (CpG Island) é dada em S_Shelf e N_Shelf (de 2000 a 4000 bases à jusante ou à montante da Ilha CpG, respectivamente), S_Shore e N_Shore (até 2000 bases à jusante ou à montante da Ilha CpG, respectivamente), Ilha CpG e por último as regiões Open Sea (superior a 4000 bases em relação à ilha), as quais são consideradas fora de uma região de Ilha CpG. **Fonte:** Adaptada de Bibikova e colaboradores (2011) (101).

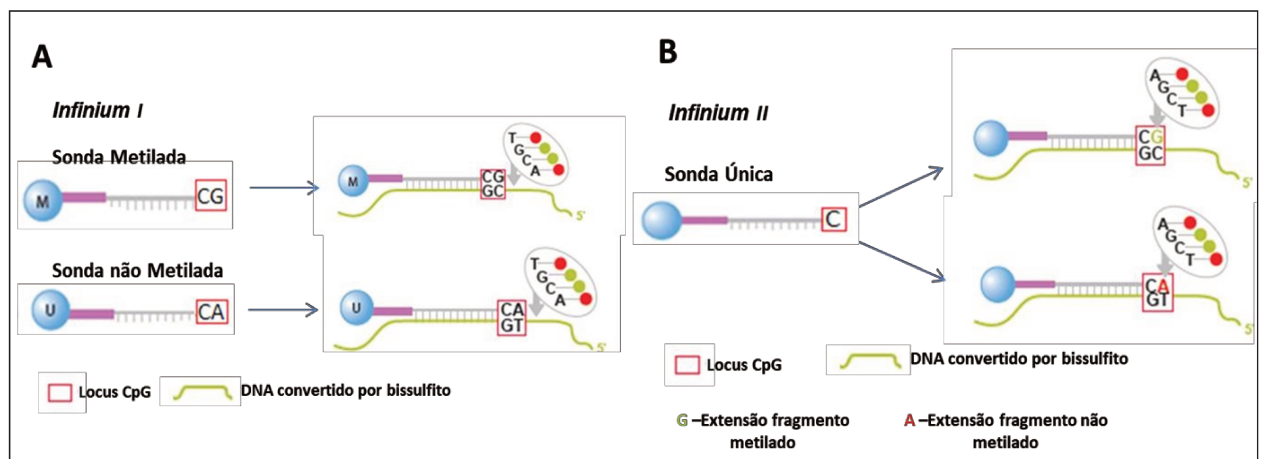


Figura 10. Sondagens de metilação referentes aos ensaios *Infinium I* e *II*. **A:** O ensaio *Infinium I* apresenta duas sondas, as quais são específicas para o *status* metilado e não metilado. Após a hibridização das mesmas no DNA tratado por bissulfito, inicia-se a amplificação de base única marcada. **B:** O ensaio *Infinium II* apresenta uma única sonda, a qual pode se ligar tanto a sequência metilada quanto a sequência não metilada. O *status* de metilação do locus se dará através da inserção da base seguinte à sonda; quando esta é guanina obtém-se o *status* metilado, quando é adenina obtém-se o *status* não metilado. **Fonte:** Adaptado de Bibikova e colaboradores (2011) (101).

Preparo dos microarranjos de metilação

Os ensaios com os microarranjos de metilação foram realizados no Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica localizado na UNESP de Jaboticabal - Jaboticabal/SP. Nesta etapa foram analisadas 8 amostras do grupo HbSS, 8 amostras do grupo HbSC e 7 amostras do grupo controle. Para o experimento, cerca de 500 ng de DNA tratado por bissulfito foram utilizados na reação de hibridização no *Infinium MethylationEPIC Bead Chip* (Illumina Inc, CA, USA), conforme protocolo do fabricante. Para o processo de hibridização no microarranjo, inicialmente as amostras de DNA foram desnaturadas e neutralizadas para realizar a amplificação dos fragmentos, obtendo-se assim maior quantidade de amostra de material genético. A partir do DNA amplificado foi realizado o processo de fragmentação, centrifugação e ressuspensão. O produto obtido foi adicionado aos microarranjos de hibridização, os quais foram mantidos por 24 horas no Illumina Hybridization Oven (Illumina Inc, CA, USA). Após essa etapa, foi realizada a lavagem dos microarranjos, seguida da extensão e coloração do DNA e por fim a leitura dos microarranjos pelo equipamento Illumina HiScan Systems (Illumina Inc, CA, USA). Ao final da leitura foram gerados os arquivos IDAT que contêm as informações de intensidade dos sinais vermelho (metilado) e verde (não metilado) para cada citosina de um sítio CpG. Todas as análises foram realizadas em ambiente R (v.3.4.4), utilizando-se pacotes do Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>).

Análise dos dados dos microarranjos de metilação

Para as análises dos dados contamos com a colaboração da Dra. Mariana Maschietto, pesquisadora do Centro Infantil Boldrini de Campinas/SP e a colaboração da Dra. Galina Ananina, pesquisadora colaboradora do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética-CBMEG-UNICAMP de Campinas/SP, que nos auxiliaram em todo o processo de análise de bioinformática. Dessa forma, para a análise seguiu-se um fluxo de trabalho que incluíram as etapas: controle de qualidade, pré-processamento dos dados, normalização, correção, análise estatística e interpretação dos resultados (102,103). As análises foram realizadas utilizando-se os pacotes *minfi*, *ChAMP* e *limma*. O pacote *minfi* inclui pacotes de normalização dos dados, correção para *batch effects* (efeitos de lote) e correção para heterogeneidade celular (104). O pacote *ChAMP* contém ferramentas de normalização, controle de qualidade, correção de efeitos de lote múltiplos, inferência de variação no número de cópias, identificação de regiões diferencialmente metiladas (DMR) entre outras ferramentas (105). O pacote *limma* foi usado

para identificar os CpGs diferencialmente metilados entre os grupos, pois permite incluir co-variáveis nas análises (106).

Controle de qualidade: Após a leitura dos microarranjos foram obtidos os arquivos IDAT que contêm as informações sobre a intensidade dos sinais verde e vermelho gerados pela quantificação dos sinais durante a leitura. Os dados dos arquivos IDAT foram interpretados e convertidos em valores β , obtendo-se assim o nível de metilação de cada sítio CpG. O valor β pode variar entre 0 e 1, onde 0 indica um CpG não metilado e 1 indica um CpG totalmente metilado (107,108). No controle de qualidade foi checada a distribuição dos valores β para todas as amostras. Nesta checagem é esperada uma distribuição similar entre as amostras com intervalo e intensidade semelhantes. Foi checado também o controle da conversão de bissulfito, controle da extensão, controle da hibridação e controle de especificidade.

Pré-processamento: O pré-processamento consiste na filtragem das sondas que apresentam baixa qualidade. Foram removidas as sondas com menos de três *beads* em mais de duas amostras e sondas com p-valor de detecção $>0,05$ que indica baixa detecção de fluorescência (104).

Normalização: Existe uma variação de distribuição de intensidade entre os tipos de sonda *Infinium I* e *Infinium II* que são de origem técnica. A normalização corrige os valores de intensidade entre as sondas, fazendo com que as sondas *Infinium II* adquiram a mesma distribuição de intensidade das sondas *Infinium I*. Para os dados aqui apresentados foram testados três métodos de normalização: *SWAN*, *Quantile* e *FornNorm*, implementados no pacote *minfi*.

O método *SWAN* aplica uma normalização conjunta das sondas *Infinium I* e *Infinium II* baseado em quantil (109). O método *Quantile* também aplica uma normalização baseada em quantil, mas considerando a localização dos CpGs em relação a ilha (110). Por fim, o método *FunNorm* possibilita a normalização conjunta das sondas baseada em quantil, além de implementar um algoritmo funcional que utiliza sondas de controle interno presentes na matriz para remover as variações técnicas por regressão (111).

Correção de viés técnico: As hibridizações foram realizadas em diferentes microarranjos, o que pode inserir um viés técnico. Para corrigir esse viés foi aplicada a correção para efeito de lote, utilizando-se a função *ComBat* implantada no pacote *ChAMP*.

Filtragem: Em seguida, foram removidas sondas sobrepostas a polimorfismos de base única (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), as quais podem influenciar nas

medições da metilação do DNA (112). Também foram removidas sondas localizadas nos cromossomos sexuais (X e Y) para evitar viés de identidade sexual.

Para as análises seguintes foram consideradas as sondas com diferença mínima de metilação de 15% entre os grupos, conforme recomendações de Du *et al* (108). Os valores β foram transformados em base logarítmica em M-valor [$M = \log_2(\beta/1-\beta)$]. Os M-valores apresentam maior homocedasticidade, ou seja, os dados são mais homogêneos e menos dispersos nos extremos quando comparado aos valores β (108). Em seguida, as análises de comparação entre os grupos foram realizadas utilizando-se o modelo linear Bayesiano a partir do pacote *limma* (106). Neste modelo, foram utilizados fenótipo, idade gestacional e sexo fetal como variáveis de confusão. O método de Benjamini-Hochberg foi também aplicado para a correção de testes múltiplos, sendo considerados diferencialmente metilados os sítios CpGs com p-valores ajustados (adjP) $<0,05$. As análises foram realizadas comparando-se os grupos HbSS e HbSC versus o grupo controle (HbSS vs HbAA e HbSC vs HbAA), obtendo-se assim sítios CpGs diferencialmente metilados para ambos os grupos. O pacote SVA foi utilizado para correção de heterocelularidade. No entanto, após essa correção não foram obtidos sítios CpGs significativos e por esse motivo optou-se por não aplicar esta correção. As análises de DMRs também foram aplicadas utilizando-se o pacote DMRcate (113,114), sendo estabelecidos grupos de pelo menos 2 sítios CpGs diferencialmente metilados ($p < 0,05$), no mesmo sentido de metilação, em uma região com até 1500 nucleotídeos. As DMRs com adjP $< 0,05$ foram consideradas significativas. Em seguida, para facilitar a interpretação biológica, os valores M foram novamente convertidos em valores β .

Seleção das DMRs para validação

As DMRs também foram avaliadas devido ao fato de corresponderem mais amplamente ao *status* de metilação nas regiões genômicas e também apresentarem um papel funcional na regulação da transcrição gênica em comparação aos sítios CpGs isolados (Zhang_2011).

Dessa forma, para cada grupo (HbSS e HbSC) foi obtida uma lista de DMRs significativas ($p < 0,05$). Nesta lista foram obtidas também informações relacionadas às coordenadas das DMRs, comprimento em bases, localização em relação ao gene, localização em relação à Ilha CpG, bem como os genes associados. Os genes associados foram avaliados quanto ao enriquecimento de vias e aos processos biológicos envolvidos, utilizando-se o endereço eletrônico WebGestalt (<http://www.webgestalt.org/>) (115).

Algumas DMRs foram selecionadas para a validação da metilação, sendo esta seleção realizada em duas etapas.

Na primeira etapa foram selecionadas as DMRs que pudessem desempenhar um papel na regulação gênica. Dessa forma, selecionaram-se aquelas que estavam presentes em regiões regulatórias (promotores ou *enhancers*) ou em regiões de 1º exon ou 1º intron. Estudos mostram que a metilação no 1º exon ou no 1º intron podem influenciar a mudança da expressão gênica (116,117); por isso, DMRs nestas regiões também foram selecionadas.

Na segunda etapa, seguiu-se para a avaliação dos genes associados às DMRs previamente selecionadas. Nesta avaliação, foram investigadas a função, as vias em que estes genes estavam envolvidos, bem como o nível de sua expressão no tecido placentário, por meio dos endereços eletrônicos: Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>) (118) e BioGPS (<http://biogps.org/#goto=welcome>). Por fim, a partir dessas informações, foram então selecionadas as DMRs que estavam associadas a genes com expressão em tecido placentário e aquelas associadas a genes envolvidos em processos relevantes para o tecido placentário como por exemplo a proliferação, migração e invasão.

Ao final sete DMRs foram selecionadas, sendo quatro delas para grupo HbSS e três para o grupo HbSC (Tabela 1). Um sítio CpG de cada DMR foi submetido à validação da metilação pelo método de pirosequenciamento.

Tabela 1. DMRs selecionadas para a validação da metilação. Em negrito estão os CpGs submetidos à análise por pirosequenciamento.

Grupo de pacientes	DMRs - coordenadas	$\Delta\beta$ (<i>status de metilação</i>)	Pares de bases	CpGs	Localização do CpG no gene	Localização CpG na Ilha CPG	Gene	p-value Adj
HbSS	chr1:789565 76-78956905	0,2 (hipermetilado)	330	cg03842686	TSS200	Ilha	<i>PTGFR</i>	<0,001
				cg20092458	TSS200	Ilha		
				cg03949391	1stExon	Ilha		
				cg27046936	1stExon	Ilha		
				cg03495868	1stExon	Ilha		
	chr16:57662 541- 57662690	0,115 (hipermetilado)	150	cg03989617	1stExon	OpenSea	<i>GPR56</i>	0,007
				cg09730500	1stExon	OpenSea		
	chr17:74070 375- 74070698	0,192 (hipermetilado)	324	cg10854758	TSS1500	S_Shore	<i>GALR2</i>	<0,001
				cg27494087	TSS1500	Ilha		
				cg16898239	TSS1500	Ilha		

			cg07274618	TSS200	Ilha		
	chr14:24803679-24803873	0,171 (hipermetilado)	195	cg07485357 cg23179456	Corpo do gene TSS200	Ilha Ilha	<i>ADCY4</i> <0,001
	chr5:136834383-136834464	0,165 (hipermetilado)	82	cg20897685 cg24847829	5'UTR 5'UTR	Ilha Ilha	<i>SPOCK1</i> 0,0101
				cg26616283	1stExon	OpenSea	
				cg26748945	1stExon	OpenSea	
	chr7:11871535-11872050	0,186 (hipermetilado)	516	cg12348203	TSS200	OpenSea	<i>THSD7A</i> <0,001
				cg17230649	TSS200	OpenSea	
				cg24676244	TSS1500	OpenSea	
				cg07485357	Corpo do gene	Ilha	
				cg23179456	TSS200	Ilha	
	chr14:24803679-24804339	0,158 (hipermetilado)	661	cg13631572	TSS200	Ilha	<i>ADCY4</i> 0,0103
				cg25556905	TSS200	Ilha	
				cg14287235	TSS1500	Ilha	

$\Delta\beta$: diferença de metilação entre casos e controles.

Validação da metilação por pirosequenciamento

Os sítios CpGs selecionados foram submetidos à validação da metilação pela técnica de pirosequenciamento. Nesta etapa foram analisadas 11 amostras do grupo HbSS, 11 do grupo HbSC e 10 do grupo controle.

A técnica de pirosequenciamento baseia-se no sequenciamento por síntese, onde há a adição e incorporação sequencial de nucleotídeos (Figura 11). A detecção da incorporação das bases difere do sequenciamento de Sanger, pois é baseada na detecção da liberação de pirofosfato (PPi) em vez da determinação baseada na terminação da cadeia com didesoxinucleotídeos (dNTP) (119). Para esse método, primeiramente, um *primer* desenhado especialmente para o sequenciamento se anela à fita simples do produto gerado em uma reação de PCR que serve como molde para a síntese. São então adicionadas as enzimas DNA polimerase, ATP sulfurilase, luciferase e apirase, bem como os substratos adenosina 5'fosfosulfato (APS) e luciferina. Em seguida, o primeiro dNTP é adicionado à reação e caso ele seja complementar à fita molde a DNA polimerase o incorpora à fita que está sendo sintetizada. Após a incorporação, o PPi é liberado e então a ATP sulfurilase converte PPi em ATP na presença de APS. A luciferase utiliza o ATP formado e catalisa a luciferina em

oxiluciferina que gera luz. A luz produzida é captada e visualizada como um pico no gráfico, sendo que a altura de cada pico é proporcional à quantidade de nucleotídeos adicionados. Ao final, os dNTPs não incorporados e o ATP são degradados pela apirase e quando esta etapa é concluída um outro nucleotídeo é adicionado e inicia-se um novo ciclo (120).

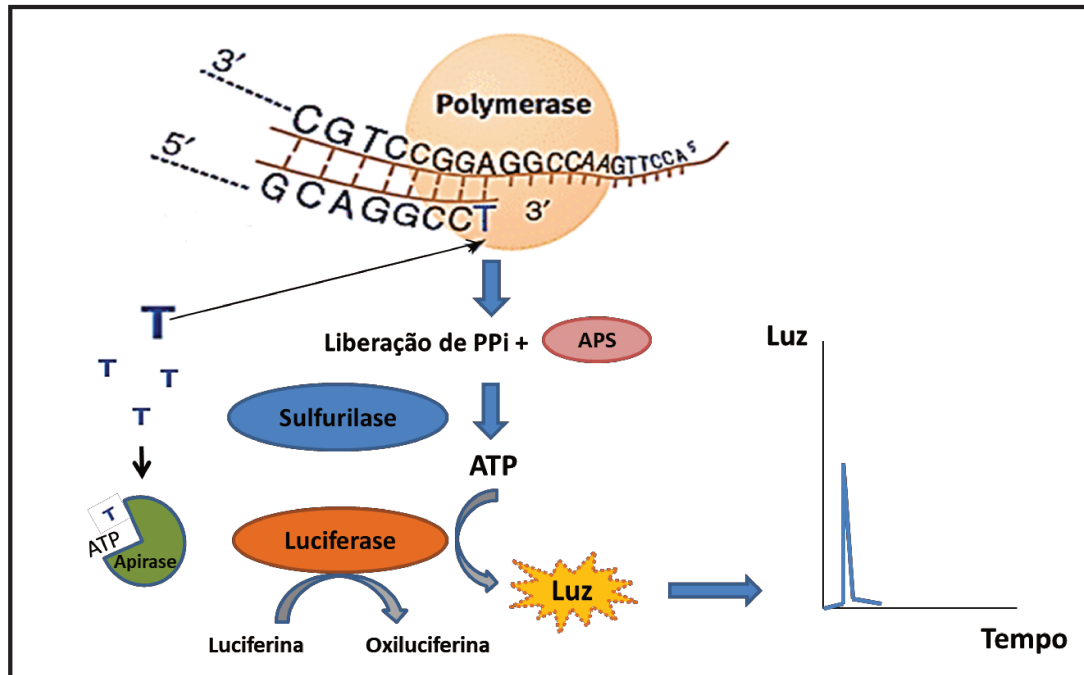


Figura 11. Demonstração do processo enzimático da reação de pirosequenciamento. Na reação, a DNA polimerase incorpora um dNTP complementar à fita molde, ocorrendo a liberação do PPi. A enzima ATP sulfúrilase, na presença de APS, converte o PPi em ATP. A luciferase utiliza o ATP gerado e catalisa a luciferina em oxiluciferina que gera luz. A enzima apirase degrada os nucleotídeos não incorporados, assim como o ATP. A luz produzida é detectada e o resultado é exibido em um pirograma que indica a sequência de nucleotídeos incorporados durante o sequenciamento. **Fonte:** Adaptada de England e colaboradores (2005) (121).

Desenho dos *primers* para PCR e pirosequenciamento

Primers foram desenhados para amplificar as regiões contendo os sítios CpGs de interesse. Para cada região foram desenhados três *primers*, sendo um marcado com biotina na porção 5'. Essa marcação por biotina é importante para que uma das fitas amplificadas seja isolada para o sequenciamento. Um par de *primers* contendo o oligonucleotídeo marcado foi utilizado na amplificação da amostra por PCR, e o outro *primer* foi utilizado no ensaio de pirosequenciamento. Esses *primers* foram construídos a partir da sequência de DNA tratada por bissulfito, utilizando-se o *software PiroMark Q96* (Qiagen, Hamburg, Germany). Todos os *primers* utilizados neste experimento estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados para as reações de PCR e pirosequenciamento. Os *primers* F e R foram utilizados na amplificação das regiões contendo os sítios CpGs. Os *primers* Seq foram utilizados nos ensaios de pirosequenciamento.

Gene	cg-ID	Primers (5' - 3')	TM Annealing (°C)	Tamanho (pb)
ADCY4	cg23179456	F: [btn]AGTAGATTTAGAAAGGGTAGAGTG	59	624 pb
		R: CCAAATCCTACCCTCCTAAC		
		Seq: ACCCTAACCAACC	-	
GALR2	cg16898239 cg07274618	F: TAGGGGTTTTTTTTTTGAGGGTATTTT	60	408 pb
		R: [btn]AAAAAAACCTTACCTCATCTAAAAC		
		Seq: GGAAGTAGGTATAAG	-	
GPR56	cg03989617	F: [btn] AGGAGAGGGGTGTTTTTTTATTAA	58	249 pb
		R: CACCTACTATCCAACCCTTATT		
		Seq: CAAAACAAAACAAACAATAAT	-	
PTGFR	cg03949391 cg27046936	F: TAGTTAGGTGTAGAGGGATTTTAGGA	56	250 pb
		R:[btn]CAACCTCTAAAAAATAATACCTTATCAT		
		Seq: GGTGGAATTTGAGGTAG	-	
SPOCK1	cg24847829	F: [btn]AGTTATTGGTTATTGTTTAGGAAATT	56	620 pb
		R: CAAAAAAACCTTTCCCTTAACCTAT		
		Seq: AATCCCCTATAATTAAAC	-	
THSD7A	cg24676244	F: AAGGAGTAGAGGGGGTTGG	60	359 pb
		R: [btn]CTCAAATACTACTCCCCACACAA		
		Seq: GGAGAGGGGTTAGTT	-	

cg-ID: identificação da sonda CpG; F: *primer forward*; R: *primer reverse*; Seq: *primer* de sequenciamento; btn: biotina; TM *annealing*: temperatura de anelamento do *primer*; pb: pares de bases

Reação em cadeia da polimerase – PCR

A PCR foi realizada utilizando-se 25 ng de DNA genômico tratado por bissulfito. As reações foram preparadas em um volume final de 50 µL, contendo: 2,5 µL de tampão 1X (Tampão 10X: Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM), 1,5 µL de MgCl₂ 50 nM; 1 µL de cada *primer* 10 µM; 1 µL de dNTP Mix (20 µM de cada didesoxinucleotídeo); 1,25 unidades de *Taq Platinum* (Invitrogen, CA, EUA); água ultrapura para completar o volume final de 50 µL. As reações de PCR foram realizadas em duplicata para cada uma das regiões analisadas.

As amostras foram amplificadas em aparelhos termocicladores MasterCycler EP Gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany) e Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, CA, EUA). As condições de ciclagem foram: 95°C por 15 minutos, 50 ciclos [95°C-40s, temperatura de *annealing*-40s, 72°C-40s] e 72°C por 10 minutos. As temperaturas

para cada região foram determinadas após testes de padronização e encontram-se descritas na tabela 2.

Para verificar o sucesso da PCR, 5,0 µL do material amplificado, mais 2 µL de azul de bromofenol foram aplicados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e submetido à eletroforese a 100V em solução de TBE 1X (Invitrogen, CA, EUA) por cerca de 20 minutos. Após a corrida realizou-se a “captura” da imagem em transiluminador com leitura sob luz UV.

Reação de pirosequenciamento

Os fragmentos amplificados foram isolados utilizando-se *beads* revestidas com estreptavidina diluídas em solução contendo tampão de ligação (Tris-HCl 10 mM; NaCl 2 mM; EDTA 1 mM; Tween 20 0,1% – pH 7,6) a fim de se obter apenas as fitas biotiniladas. Em seguida, realizou-se a agitação das *beads* por 10 minutos. Após esta etapa, as mesmas foram aspiradas utilizando-se o Vacuum Prep Workstation (Qiagen, Hamburg, Germany), lavadas com etanol 70%, seguida por desnaturação com NaOH e lavagem (Tris-Acetato 10 mM – pH 7,6). Estas *beads* foram adicionadas a 40 µL de solução de *primer* de sequenciamento. Esta mistura (*beads* e *primers*) foi submetida à desnaturação por 2 minutos a 80°C e então mantida por 20 minutos em temperatura ambiente. Os volumes de substrato, enzimas e dNTPs foram estabelecidos de acordo com a sequência a ser injetada. Por fim, a fita biotinilada foi então sequenciada utilizando-se o pirosequenciador PyroMark Q96 (Qiagen, Hamburg, Germany).

No método de pirosequenciamento cada sítio CpG é tratado como um polimorfismo C/T, fornecendo um dado quantitativo da proporção relativa do alelo metilado versus o alelo não metilado. Os níveis de metilação de cada sítio CpG foram avaliados convertendo-se os pirogramas em valores numéricos equivalentes às alturas dos picos obtidos (85).

Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

Os genes associados às DMRs selecionadas (4 = HbSS e 3 = HbSC) foram submetidos à análise da expressão gênica. Para essa avaliação, utilizou-se o método qRT-PCR, pelo qual foram avaliadas 11 amostras do grupo HbSS, 11 do grupo HbSC e 21 do grupo controle.

Extração de RNA

Os tecidos placentários foram descongelados e então macerados em almofariz contendo nitrogênio líquido. Ao material macerado foi adicionado 1 ml do reagente Trizol (Life Technologies, MD, EUA), fez-se a homogeneização e posterior transferência para um tubo de 2 ml. Duzentos microlitros de clorofórmio foram adicionados ao tubo e em seguida prosseguiu-se com a centrifugação a 14000 rpm durante 18 minutos em temperatura de 4°C. Logo em seguida a fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo de 2 ml; 350 µl de etanol 70% foram adicionados e homogeneizados. Setecentos microlitros do homogeneizado foram transferidos para a coluna do kit *RNeasy Mini* (Qiagen, CA, EUA) e em seguida a purificação foi realizada segundo o protocolo do fabricante. Finalizada a extração as amostras de RNA foram quantificadas por meio de leitura da densidade óptica no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, CA, EUA), em comprimento de onda de 260 nm. Após a quantificação as amostras foram estocadas em freezer -80°C para uso posterior.

Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA. Inicialmente, as amostras foram tratadas com DNAase I (Thermo Scientific, CA, USA), a 37°C por 30 minutos para a remoção de DNA contaminante. Em seguida foi adicionado EDTA às amostras, as quais foram incubadas a 65°C por 10 minutos. Logo após, foi adicionado o oligo dT (liga-se à cauda poli-A do RNA mensageiro) e a mistura incubada a 65°C por 5 minutos. Foram então adicionados os reagentes: transcriptase reversa (responsável pela síntese da cadeia de cDNA) e dNTPs (necessários para a formação da fita a ser sintetizada) e a reação foi novamente incubada agora a 42°C por 60 minutos. Para finalizar esta etapa, as amostras foram mantidas a 70°C por 5 minutos para inativação da enzima transcriptase reversa.

Desenho dos *primers* para qRT-PCR

Para a realização do método qRT-PCR foram desenhados *primers* para a amplificação dos genes selecionados. As sequências dos RNAm necessárias para o desenho do *primer* foram obtidas a partir do banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Com o auxílio do *software* Primer Express (Life Technologies, CA, USA) os *primers* foram desenhados para gerar produtos de amplificação entre 60 e 150 pb na temperatura de anelamento de 60°C. Em seguida as sequências foram submetidas ao programa Blast (www.ncbi.nlm.gov/blast) para a confirmação da homologia do gene. A formação de

estruturas como *hairpins* e *dimers* foi avaliada pelo programa Gene Runner v.3.1 (<http://generunner.net>). Os *primers* utilizados estão listados na tabela 3.

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para qRT-PCR.

Genes	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	[] do primer
<i>ADCY4</i>	F: CCCAACATCATCAGACTGCCCT R: CAGCAGTGCATGGAGTATGGGA	120	100nM
<i>GALR2</i>	F: GCACTTCCTCATCTTCCTCACC R: CAGATACCTGTCCAGGGAGACG	73	150nM
<i>GPR56</i>	F: TGCTGATGGTCTCCTCGGTG R: CAATGGTGACAAGGCAGGCC	108	70nM
<i>PTGFR</i>	F: GATGACAAGATGTCTGGACTGC R: CAGGAGACACTAGCTGTTTGA	118	150nM
<i>SPOCK1</i>	F: TGCTGTGAGCTGTGAAGAGGAG R: CTTTGTCTTTTGGTCCCAGCTC	113	70nM
<i>THSD7A</i>	F: TCATGTTATGATGGACAGTGCTAT R: CATTTATACCATCTGACCTTTGAC	100	150nM
<i>ACTB</i>	F: TGACCCAGATCATGTTTGAGACC R: CAGAGGCGTACAGGGATAGCA	81	150nM
<i>GAPDH</i>	F: AAGATCATCAGCAATGCCTCCT R: GGTCATGAGTCCTTCCACGATAC	96	150nM

F: Forward, R: Reverse, []: concentração, pb: pares de bases

Padronização da qRT-PCR

Para a padronização da reação de qRT-PCR foram testadas três concentrações para cada *primer* (70 nM, 150 nM e 300 nM). Estes testes foram feitos em triplicata e o sistema de detecção utilizado foi o *SYBRTM Green PCR Master Mix®* (Invitrogen, CA, EUA), no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystem, CA, EUA). Após os testes, a concentração ideal foi escolhida, considerando-se aquela em que o gene alvo foi amplificado mais precocemente (menor valor de Ct – *cycle threshold*). A concentração de cada *primer* está descrita na tabela 2. A eficiência da reação foi testada para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade da qRT-PCR. Dessa forma, foram realizadas reações em duplicata utilizando-se a concentração de *primer* selecionada e diluições seriadas de uma amostra a fim de obter-se uma curva cujo valor da inclinação (*slope*) é aplicado à fórmula $[10^{(-1/slope)} - 1] \times 100 = 100\%$, resultando no valor percentual de eficiência de reação. Foram consideradas as curvas que apresentaram valores entre 99 e 100% e correlação acima de 0,98. Um exemplo

pode ser visualizado na figura 12. A expressão dos genes foi determinada de forma relativa utilizando-se a fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, sendo os valores de expressão normalizados em relação à média dos controles endógenos *ACTB* e *GAPDH*.

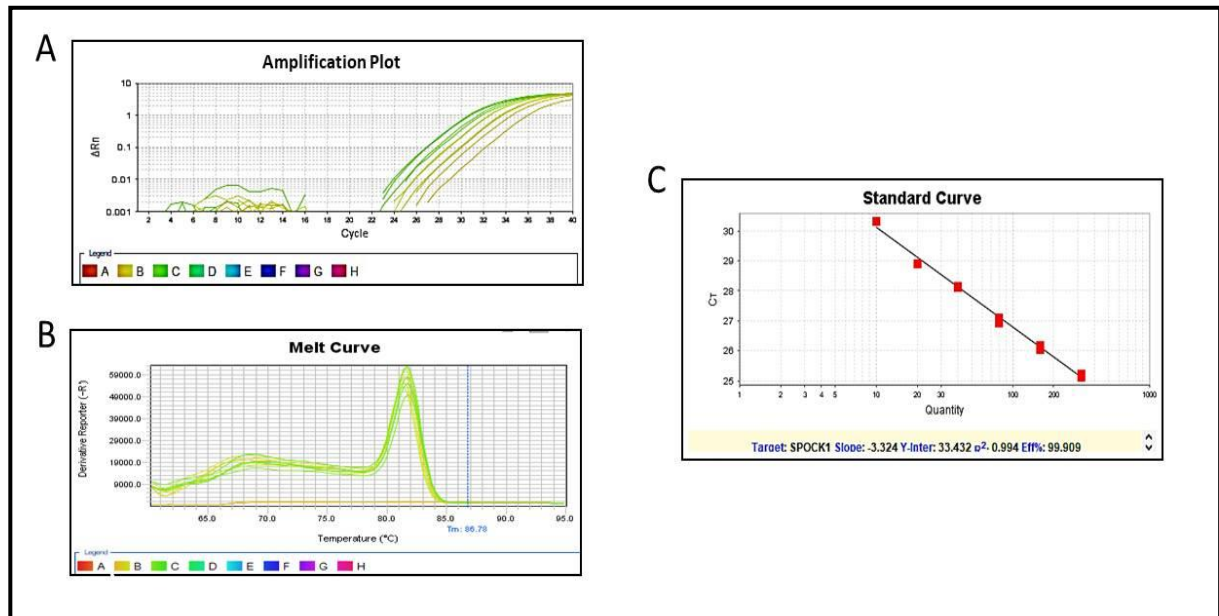


Figura 12. Exemplo da padronização dos *primers* para a amplificação do gene *GPR56*. **A:** Curvas de diluições para as seis concentrações de cDNA (10 ng, 20 ng, 40 ng, 80 ng, 160 ng e 320 ng). **B:** Curvas de *melting* para o par de *primers* testado, apresentando pico na temperatura de 81°C. **C:** A curva de eficiência > 99%, indicando a especificidade da amplificação.

Reação de qRT-PCR

As reações foram preparadas em um volume final de 12 μ l, sendo 6,0 μ l do reagente *SYBRTM Green PCR Master Mix*® (Invitrogen, CA, EUA) 1X, 3,0 μ l do *primer* (na concentração ideal obtida na etapa da padronização) e 3,0 μ l da amostra de cDNA (10 ng/ μ l de concentração final). Para cada amostra os ensaios foram feitos em duplicata, com o uso de controles negativos para cada *primer* com poços contendo água estéril no lugar da amostra. Em seguida, as reações foram submetidas a um programa de ciclagem que consistiu em: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Posteriormente, adicionou-se um passo de 20 minutos, no qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C. As análises das reações de qPCR foram realizadas a partir da quantificação relativa baseada na fórmula de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Os níveis de RNAm de cada gene foram avaliados em duplicata e normalizados em relação aos controles endógenos (*ACTB* e *GAPDH*).

Análise estatística dos dados de pirosequenciamento e qRT-PCR

Os resultados obtidos do grupo HbSS e do grupo HbSC foram comparados aos do grupo controle. O teste t de Student foi utilizado para os dados com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para os dados fora desta distribuição. As análises de correlação entre metilação e expressão foram realizadas por meio dos testes de correlação de Pearson quando os dados apresentaram distribuição normal ou correlação de Spearman, quando essa distribuição não era obedecida. Os testes foram realizados utilizando-se o programa R (versão 3.4.4) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Características clínicas

Este estudo avaliou 11 mulheres com HbSS, 11 mulheres com HbSC e 21 mulheres sem DF, com genótipo HbAA (grupo controle). Os grupos HbSS e HbSC foram comparados separadamente com o grupo HbAA. Em ambos os grupos foram observadas diferenças estatisticamente significativas para as características clínicas: IMC pré-gestacional, idade gestacional, altura do RN, peso do RN e peso da placenta.

As pacientes com HbSS revelaram menor IMC pré-gestacional ($22,3 \pm 3,1$, $p=0,0125$), menor idade gestacional ($36,44 \pm 1,77$, semanas, $p<0,0001$), menor altura do RN ($44,95 \pm 3,67$, centímetros, $p=0,0005$), menor peso do RN ($2397 \pm 457,85$, gramas, $p<0,0001$) e menor peso da placenta ($425,27 \pm 88,38$, gramas, $p<0,001$), entre os grupos analisados. Além disso, as mulheres com HbSS apresentaram maior frequência de complicações relacionadas à DF durante a gestação em relação às mulheres com HbSC. Dentre estas complicações estiveram presentes: crises de vaso-oclusão (81,8 vs. 63,6%), síndrome torácica aguda (18,2 vs. 9,1%), infecções durante a gestação (54,5 vs. 18,2%), mortalidade perinatal (9,1 vs. 0%), prematuridade (54,5 vs. 36,4%) e RCF (18,2 vs. 0%). As características clínicas das mães e dos recém-nascidos estão apresentadas na tabela 4.

A transfusão sanguínea profilática tem sido utilizada na instituição onde foi desenvolvido esse estudo com o intuito de reduzir os resultados maternos e fetais adversos (52). Assim, a transfusão sanguínea programada foi realizada em 10 gestantes com HbSS e em 8 gestantes com HbSC. Quatro gestantes (1 HbSS e 3 HbSC) não receberam transfusões profiláticas por diferentes razões. Na paciente com HbSS ocorreu nascimento prematuro com 28 semanas de gestação, antes do início da transfusão programada, com o desfecho de morte neonatal logo após o nascimento. Devido a questões particulares, as outras três pacientes portadoras de HbSC tiveram dificuldade em aderir às transfusões programadas.

Tabela 4. Características clínicas das mães e recém-nascidos (RN)

Características	Grupo controle n (%)	Grupo HbSS n (%) ^a	Grupo HbSC n (%) ^a
Total de gestantes (n)	21	11	11
Idade materna (anos) média ± SD	28,57 ± 3,49	26,81 ± 4,56	25,27 ± 7,02
IMC pré-gestacional (kg/m ²)	26,5 ± 3,1	22,3 ± 3,1* ^b	22,4 ± 2,0** ^b
Ganho de peso materno durante a gestação	12,3 ± 5	7,7 ± 3,3	8,5 ± 2,1
Nulíparas (n)	6 (29,6)	6 (54,5)	7 (63,6)
Idade gestacional (semanas) média ± SD	39,82 ± 0,74	36,44 ± 1,77*** ^b	36,68 ± 3,94*** ^b
Pré-termo (< 37 semanas)	-	5 (54,5)	4 (36,4)
Pré-eclâmpsia	-	0	1 (9,1)
Altura do RN (cm) média ± SD	49,66 ± 1,25	44,95 ± 3,67*** ^b	47,66 ± 5,37** ^b
Peso do RN (g) media ± SD	3636 ± 327,30	2397 ± 457,85*** ^b	2952 ± 484,37** ^b
RCF	-	2 (18,2)	0
Peso da placenta (g) média ± SD	745,14 ± 114,15	425,27 ± 88,38*** ^c	513,63 ± 96,22*** ^c
Sexo do RN (n)			
Masculino	11 (52,4)	7 (63,6)	7 (63,6)
Feminino	10 (47,6)	4 (36,4)	4 (36,4)
Complicações relacionadas à DF (n)			
Crises de vaso-oclusão	-	9 (81,8)	7 (63,6)
Síndrome Torácica Aguda	-	2 (18,2)	1 (9,1)
Infecções durante a gestação	-	5 (54,5)	2 (18,2)
Transfusão de sangue programada	-	10 (90,9)	8 (72,7)
Mortalidade perinatal	-	1 (9,1)	0

IMC: índice de massa corpórea, RCF: restrição do crescimento fetal, SD: standard deviation, ^a: comparado com o grupo controle, ^b: Teste de Mann-Whitney, ^c: Teste t de Student, *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001.

Análise dos dados dos microarranjos de metilação

DMPs: Após as análises dos dados, foram identificadas 396 DMPs (posições diferencialmente metiladas) para o grupo de gestantes com HbSS, comparado ao grupo controle. Dentre as DMPs, 291 mostraram-se hipermetiladas (73,5%) e 105 hipometiladas (26,5%). Para o grupo HbSC foram identificadas 581 DMPs, das quais 443 estavam hipermetiladas (76,2%) e 138 hipometiladas (23,8%). Um total de 68 DMPs hipermetiladas e 6 DMPs hipometiladas estiveram presentes em ambos os genótipos avaliados. Um *heatmap* foi gerado para cada grupo a partir das DMPs provenientes das comparações, onde é possível observar o *status* de hipermetilação em ambos os grupos (Figuras 13 e 14).

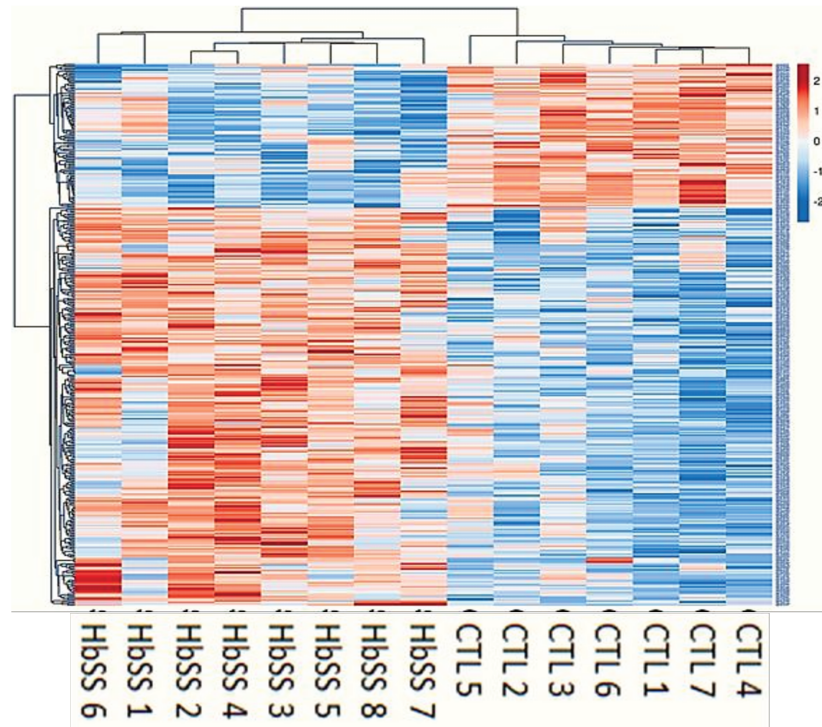


Figura 13. *Heatmap* gerado a partir das 396 DMPs obtidas no grupo HbSS em comparação ao grupo controle. As linhas representam cada DMP e as colunas cada paciente do grupo HbSS e controles (CTL). As cores representam os níveis de metilação; quanto mais vermelho mais metilado e quando mais azul menos metilado.

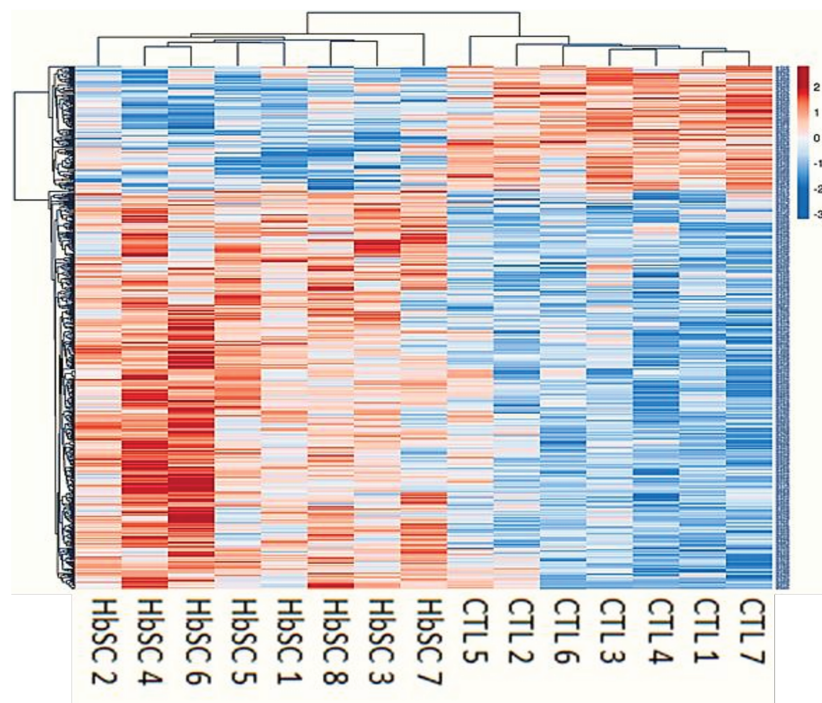


Figura 14. *Heatmap* gerado a partir das 581 DMPs obtidas no grupo HbSC em comparação ao grupo controle. As linhas representam cada DMP e as colunas cada paciente do grupo HbSC e controles (CTL). As cores representam os níveis de metilação; quanto mais vermelho mais metilado e quando mais azul menos metilado.

A análise da distribuição das DMPs em relação às regiões genômicas foi realizada para os dois genótipos estudados, utilizando o teste de Qui-quadrado. No grupo HbSS foi obtida uma frequência significativamente maior de DMPs hipermetiladas nas regiões TSS200 ($p=0,0373$), ilha CpG ($p<0,001$) e S_Shore ($p=0,0306$) e frequência significativamente maior de DMPs hipometiladas no Corpo do Gene ($p=0,0239$) e regiões Open Sea, ($p<0,001$) (Figura 15). Em relação ao grupo HbSC, uma frequência maior de DMPs hipermetiladas foi revelada nas regiões de Ilha CpG ($p < 0,001$) e S_Shore ($p = 0,0101$), enquanto DMPs hipometiladas apresentaram-se significativamente mais frequentes em regiões Open Sea ($p<0,001$) (Figura 16).

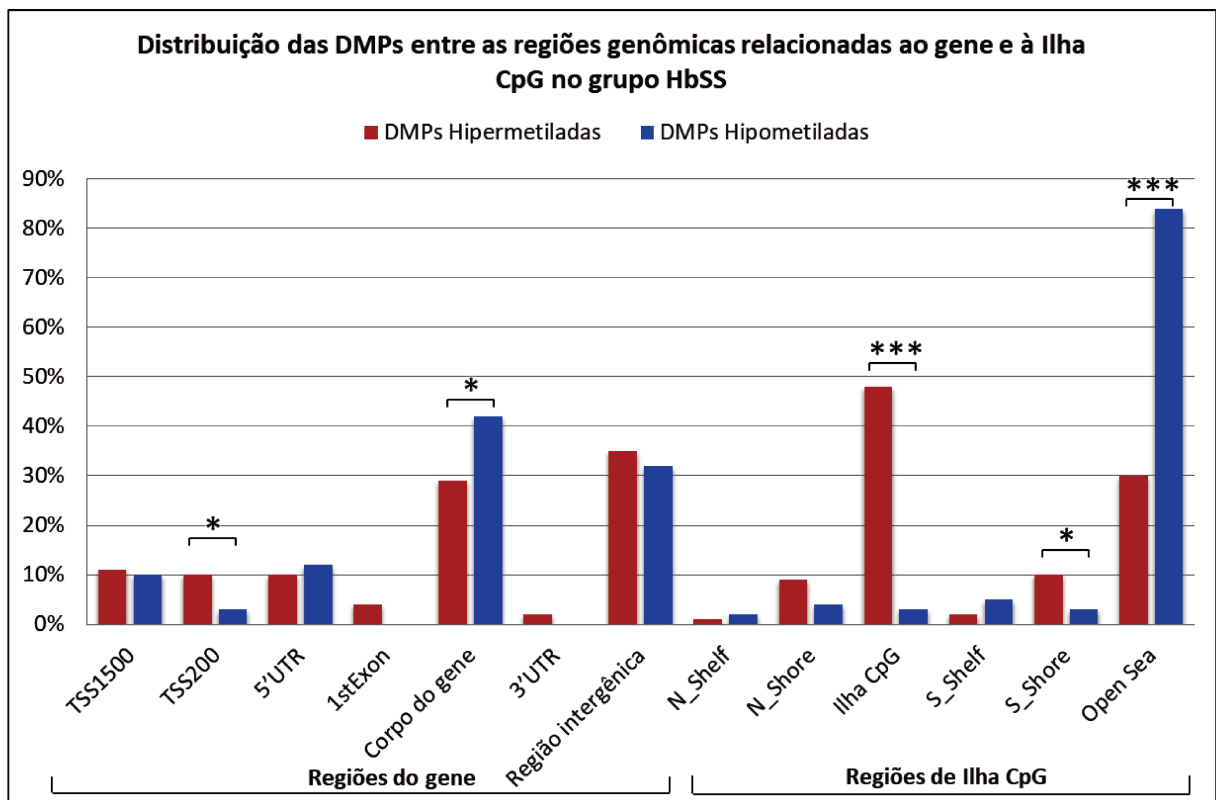


Figura 15. Gráfico da distribuição das DMPs entre as regiões genômicas relacionadas ao gene e à Ilha CpG no grupo HbSS. DMPs hipermetiladas estão significativamente mais frequentes nas regiões TSS200, Ilhas CpG e S_Shore e DMPs hipometiladas estão significativamente mais frequentes nas regiões do Corpo do Gene e Open Sea. Teste Qui-quadrado; *p-valor <0,05; ***p-valor<0,001.

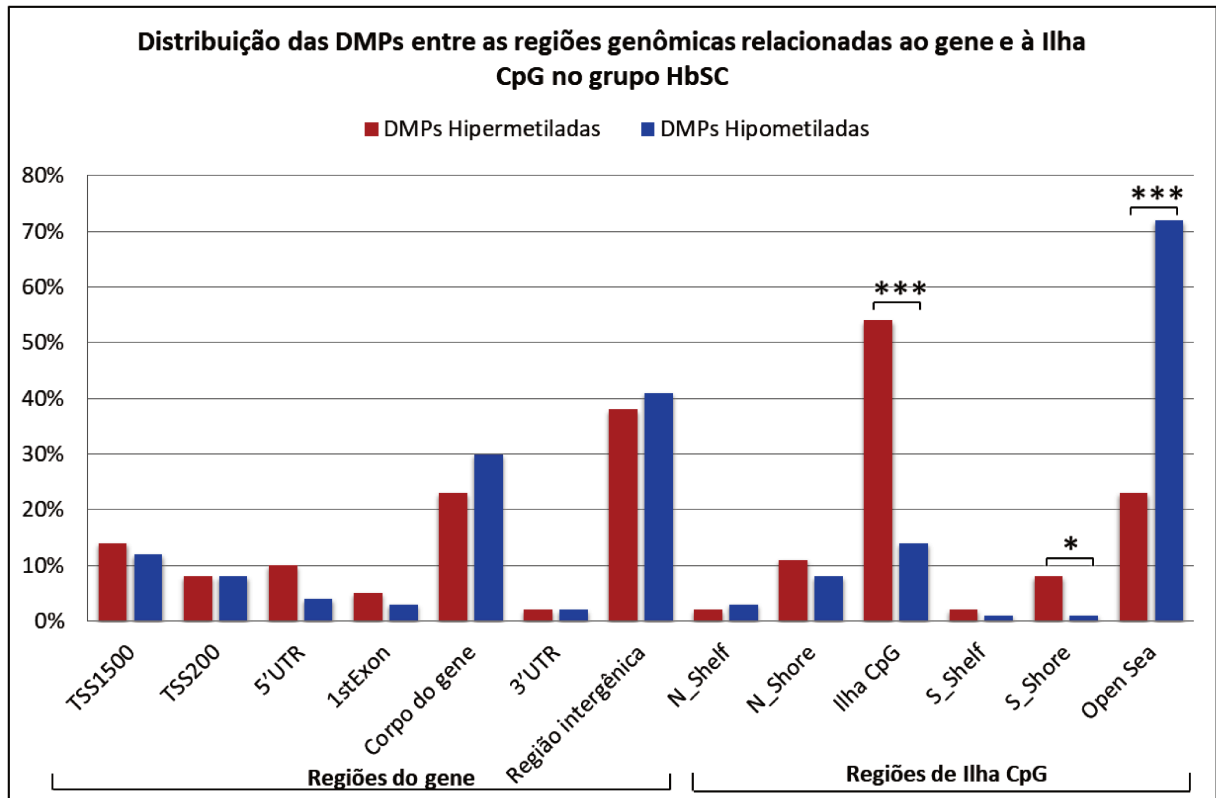


Figura 16. Gráfico da distribuição das DMPs entre as regiões genômicas relacionadas ao gene e à Ilha CpG no grupo HbSC. DMPs hipermetiladas estão significativamente mais frequentes nas regiões de Ilha CpG e S_Shore, enquanto que as DMPs hipometiladas estão significativamente mais frequentes em regiões Open Sea. Teste Qui-quadrado; *p-valor <0,05; ***p-valor<0,001.

DMRs: Após as análises das regiões diferencialmente metiladas, foram identificadas 57 DMRs estatisticamente significativas (p-valor ajustado <0,05) no grupo HbSS comparado com o grupo controle. Dentre elas, 51 estavam hipermetiladas (89,5%) e seis estavam hipometiladas (10,5%). Em relação ao grupo HbSC foram obtidas 106 DMRs, sendo 91 hipermetiladas (85,8%) e 15 hipometiladas (14,2%). Foram identificados 49 genes associados às DMRs do grupo HbSS e 87 genes associados às DMRs do grupo HbSC. Estes genes foram submetidos à análise de enriquecimento de vias e processos biológicos significativos com FDR<0,05 foram obtidos para ambos os grupos. Dentre os processos biológicos significativos podemos destacar o desenvolvimento de mesênquima, especificação do destino da célula e sinalização mediada por cAMP no grupo HbSS (Tabela 5). Já para o grupo HbSC podemos destacar os processos biológicos: diferenciação de neurônios do sistema nervoso central, morfogênese de órgãos de animais e morfogênese do tubo (Tabela 6).

Tabela 5. Análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO) dos genes relacionados às DMRs provenientes da comparação HbSS vs. HbAA.

ID da GO	Descrição	Símbolo gênico	FDR
GO: 0007188	via de sinalização de receptores acoplados à proteína G moduladora de adenilato ciclases	<i>ADCY4, CASR, GALR2, LHCGR, PTGFR, SSTR4</i>	0,0358
GO:0007189	via de sinalização de receptores acoplados à proteína G de ativação de adenilato ciclases	<i>ADCY4, GALR2, LHCGR, PTGFR, SSTR4</i>	0,0358
GO:0007187	via de sinalização do receptor acoplado à proteína G de ativação de adenilato ciclases	<i>ADCY4, CASR, GALR2, LHCGR, PTGFR, SSTR4</i>	0,0358
GO:0060485	desenvolvimento de mesênquima	<i>BNC2, GBX2, GSC, ROBO2, SIX1, TGFB1 1</i>	0,0358
GO:0001708	especificação do destino da célula	<i>GSC, LBX1, SIX, SOX1</i>	0,0413
GO:0007389	processo de especificação de padrões	<i>GBX2, GSC, LBX1, ROBO2, SIX1, ZIC1</i>	0,0413
GO:0019933	sinalização mediada por cAMP	<i>ADCY4, GALR2, LHCGR, PTGFR, SSTR4</i>	0,0416
GO:0021884	desenvolvimento do neurônio do cérebro anterior	<i>GBX2, ROBO2, SOX1</i>	0,0416
GO:0048665	especificação do destino do neurônio	<i>LBX1, SIX1, SOX1</i>	0,0490

FDR: *false discovery rate* ou taxa de falsa descoberta

Tabela 6. Análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO) dos genes relacionados às DMRs provenientes da comparação HbSC vs. HbAA.

ID da GO	Descrição	Símbolo gênico	FDR
GO: 0021953	diferenciação de neurônios do sistema nervoso central	<i>EPHA4, GABRB1, GBX2, MNX1, NFIB, NR2E1</i>	0,0017
GO: 0021954	desenvolvimento de neurônios do sistema nervoso central	<i>EPHA4, GABRB1, GBX2, NFIB, NRAE1, ROBO2</i>	0,0017
GO: 0009887	morfogênese de órgãos de animais	<i>AJAP1, GBX2, GATA4, HAND1, HOXD11, LFT, LHX9, NKX3-2, NFIB, OLFM1</i>	0,0045
GO: 0035295	desenvolvimento de tubos	<i>EPHA4, GBX2, GATA4, HAND1, HOXD11, LEPR, HLA-G, NKX3-2, NFIB, NR2E1</i>	0,0045
GO: 0035239	morfogênese do tubo	<i>EPHA4, GBX2, GATA4, HAND1, HOXD11, LEPR, HLA-G, NFIB, NR2E1, PRKD2</i>	0,009
GO: 0001822	desenvolvimento renal	<i>EPHA4, HOXD11, KCNJ8, NPHS2, ROBO2, SIX1, TP73</i>	0,0101
GO: 0009888	desenvolvimento de tecidos	<i>AJAP1, BARHL2, EPHA4, EVC, GBX2, HAND1, HOXD11, LTF, LGR6</i>	0,0111
GO: 0072001	desenvolvimento do sistema renal	<i>EPHA4, HOXD11, KCNJ8, ROBO2, SIX1, TP73, WT1</i>	0,0111
GO: 0072073	desenvolvimento de epitélio renal	<i>EPHA4, HOXD11, NPHS2, ROBO2, SIX1, WT1</i>	0,0121
GO: 0072359	desenvolvimento do sistema circulatório	<i>GBX2, GATA4, HAND1, LEPR, HLA-G, NR2E1, OLFM1, KCNJ8, PRKD2, ROBO2</i>	0,0138

FDR: *false discovery rate* ou taxa de falsa descoberta

Validação da metilação por pirosequenciamento

Para confirmar os dados obtidos no microarranjo de metilação foi realizada a técnica de pirosequenciamento em sete DMRs previamente selecionadas, sendo quatro delas avaliadas no grupo HbSS e três avaliadas no grupo HbSC. Para cada DMR, um sítio CpG foi submetido à validação da metilação por pirosequenciamento (Tabela 7).

Tabela 7. DMRs selecionadas para validação da metilação.

Grupo	DMRs Coordenadas	Tamanho (pb)	Nº de CpGs	ID do CpG	Posição do CpG Gene/Ilha	Gene associado	$\Delta\beta$	P-valor ajustado
HbSS	chr1:78956576-78956905	330	5	cg03949391	1stExon/Ilha	<i>PTGFR</i>	0,2	<0,001
	chr16:57662541-57662690	150	2	cg03989617	1stExon/Ilha	<i>GPR56</i>	0,11	0,0072**
	chr17:74070375-74070698	324	4	cg07274618	TSS200/Ilha	<i>GALR2</i>	0,19	<0,001
	chr14:24803679-24803873	195	2	cg23179456	TSS200/ Ilha	<i>ADCY4</i>	0,17	<0,001
HbSC	chr5:136834383-136834464	82	2	cg24847829	5'UTR/ Ilha	<i>SPOCK1</i>	0,16	0,0101*
	chr7:11871535-11872050	516	5	cg24676244	TSS1500/Open Sea	<i>THSD7A</i>	0,19	<0,001
	chr14:24803679-24804339	661	5	cg23179456	TSS200/ Ilha	<i>ADCY4</i>	0,16	0,0103*

* p <0,05; ** p<0,01; $\Delta\beta$: diferença de metilação entre casos e controles; ID: identidade; pb: pares de bases; DMR: região diferencialmente metilada.

Os níveis de metilação foram avaliados utilizando-se as mesmas amostras previamente analisadas pelo microarranjo, com um acréscimo de três amostras por grupo, totalizando 11 amostras para o grupo HbSS, 11 para o grupo HbSC e 10 para o grupo controle. Os resultados para o grupo HbSS confirmaram a diferença de metilação de três sítios CpGs (cg03949391-*PTGFR*, cg03989617-*GPR56* e cg07274618-*GALR2*) dos quatro sítios analisados. Já para o grupo HbSC nenhum dos três sítios CpGs avaliados apresentou diferença de metilação significativa. Foram considerados estatisticamente significantes p-valores<0,05 (Figura 17).

Realizou-se uma análise de correlação utilizando-se os dados obtidos do microarranjo de metilação e os dados obtidos do pirosequenciamento, a fim de se avaliar a correspondência entre esses dois métodos de análise. Uma correlação significativa (p<0,05) foi alcançada para todos os CpGs analisados em ambos os grupos analisados (Tabela 8).

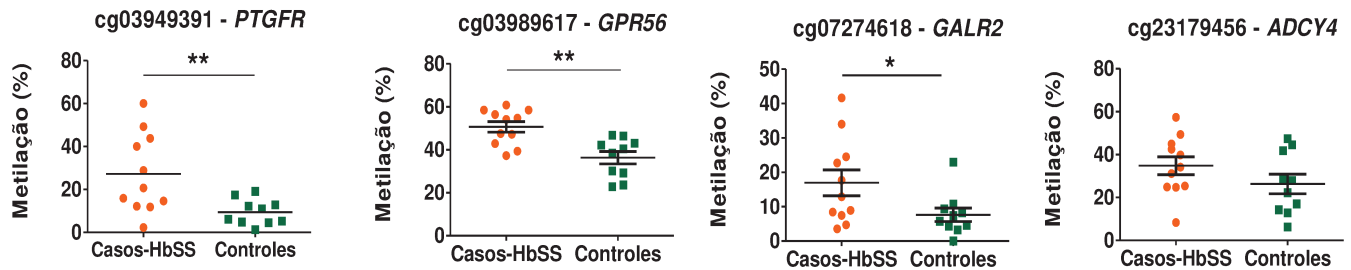
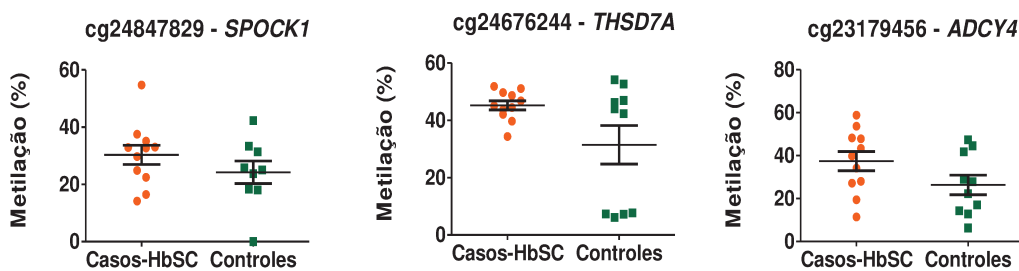
A**B**

Figura 17. Resultados da análise de metilação dos sítios CpGs avaliados por pirosequenciamento. **A:** Níveis de metilação dos sítios: cg03949391-*PTGFR*, cg03989617-*GPR56*, cg07274618-*GALR2* e cg23179456-*ADCY4* para o grupo HbSS. **B:** Níveis de metilação dos sítios: cg24847829-*SPOCK1*, cg24676244-*THSD7A* e cg23179456-*ADCY4* para o grupo HbSC. Teste de t Student; *p-valor<0,05; **p-valor<0,01.

Tabela 8. Análises de correlação entre os dados de metilação do microarranjo e do pirosequenciamento

Grupo	CpG site-Gene	r ²	p-valor
HbSS	cg03949391- <i>PTGFR</i> ^a	0,952	<0,0001
	cg03989617- <i>GPR56</i> ^b	0,9565	<0,0001
	cg07274618- <i>GALR2</i> ^a	0,9274	<0,0001
	cg23179456- <i>ADCY4</i> ^b	0,6822	0,0051
HbSC	cg24847829- <i>SPOCK1</i> ^b	0,706	0,0048
	cg24676244- <i>THSD7A</i> ^a	0,7882	0,0005
	cg23179456- <i>ADCY4</i> ^b	0,8451	<0,0001

^a Método de Spearman, ^b Método de Pearson

Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR

A análise por PCR quantitativa foi realizada para avaliar os níveis de expressão dos genes que estavam associados às DMRs selecionadas (escolhidas para validação). Para esta análise foram avaliadas 11 amostras do grupo HbSS, 11 do grupo HbSC e 21 do grupo controle. Entre os genes avaliados incluíram-se o *PTGFR*, *GPR56*, *GALR2* e *ADCY4* para o grupo HbSS e os genes *SPOCK1*, *THSD7A* e *ADCY4* para grupo HbSC. As análises de expressão nas amostras do grupo HbSS revelaram menor expressão do gene *PTGFR* (-2,97 vezes, $p=0,0062$) e maior expressão do gene *GPR56* (3,0 vezes, $p=0,0103$). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa de expressão para os genes *GALR2* (-1,03 vezes, $p=0,306$) e *ADCY4* (-1,03 vezes, $p=0,725$). Já para o grupo HbSC, as análises revelaram menor expressão do gene *SPOCK1* (-2,40 vezes, $p=0,0263$) e maior expressão do gene *ADCY4* (1,80 vezes, $p=0,0499$), e não houve diferença estatisticamente significativa de expressão para o gene *THSD7A* (1,16 vezes, $p=0,1846$) (Figura 18).

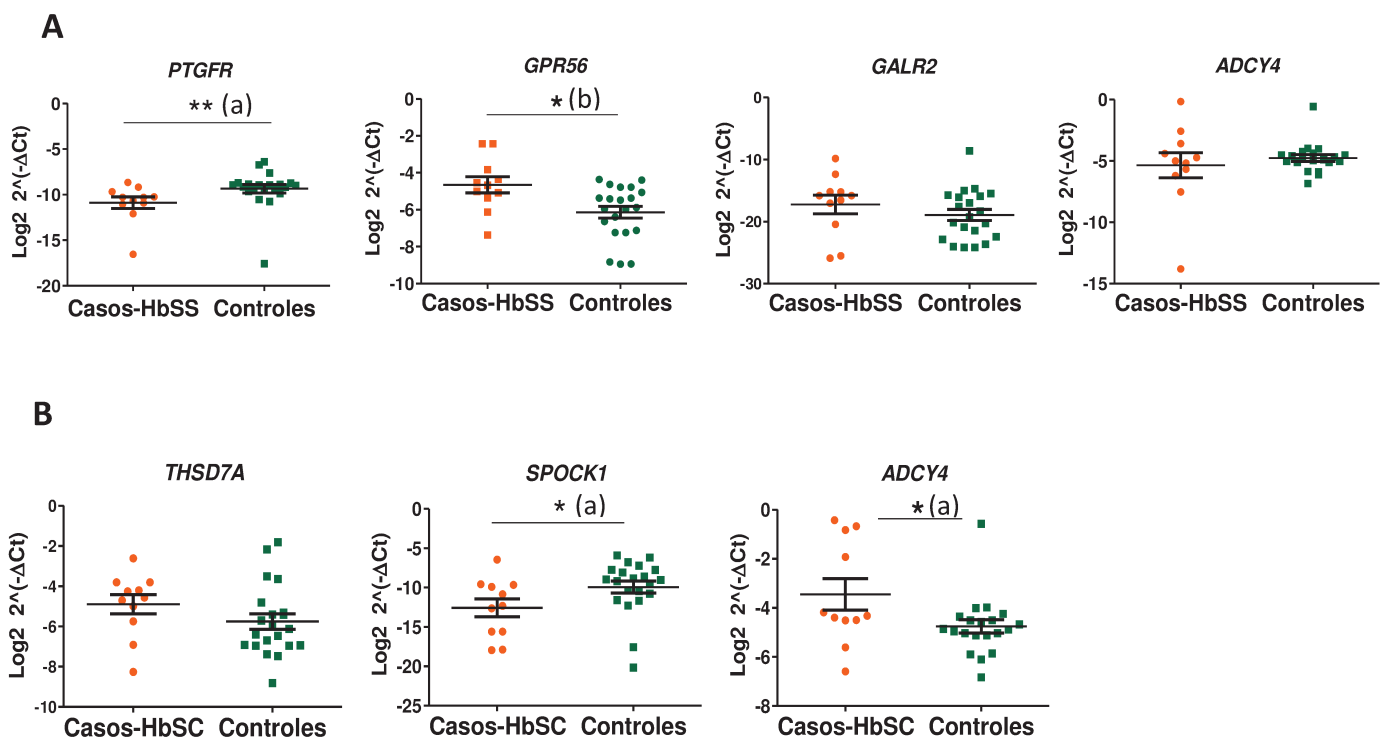
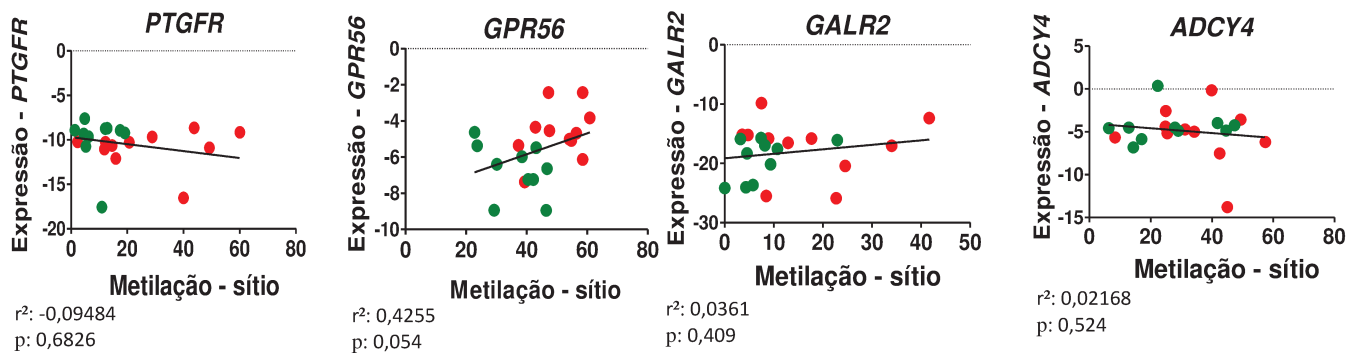


Figura 18. **A:** Perfil de expressão dos genes *PTGFR*, *GPR56*, *GALR2* e *ADCY4* no grupo HbSS comparado ao grupo controle. **B:** Perfil de expressão dos genes *THSD7A*, *SPOCK1* e *ADCY4* no grupo HbSC comparado ao grupo controle. (a) Teste de Mann-Whitney, (b) Teste de t Student não pareado; * p -valor $<0,05$; ** p -valor $<0,01$.

Análise de correlação entre os dados de metilação e expressão gênica

As análises de correlação foram realizadas utilizando-se os dados de metilação (pirosequenciamento) e os dados de expressão gênica. Os resultados para o grupo HbSS revelaram apenas uma tendência à correlação positiva para o gene *GPR56* ($r=0,42$, $p=0,054$) e nenhuma correlação significativa para os genes *PTGFR* ($r=0,09$, $p=0,682$), *GALR2* ($r=0,03$, $p=0,409$) e *ADCY4* ($r=0,02$, $p=0,524$). Os testes para o grupo HbSC não demonstraram correlação significativa para os genes *SPOCK1* ($r=0$, $p=0,977$) e *THSD7A* ($r=0$, $p=0,927$). No entanto, interessante, observou-se uma correlação positiva para o gene *ADCY4* ($r=0,52$, $p=0,0149$) (Figura 19).

A



B

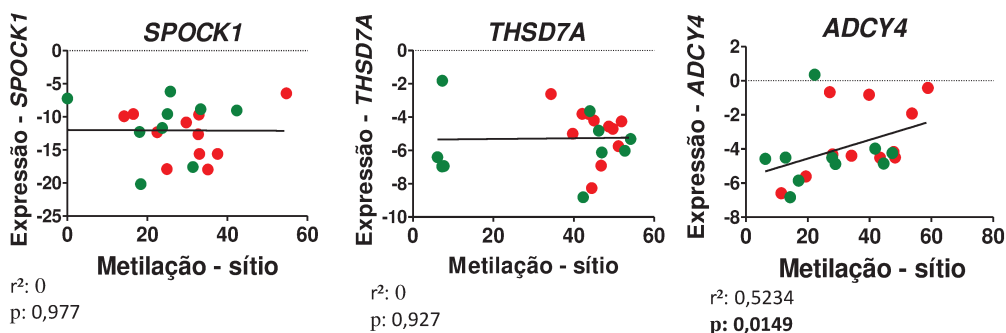


Figura 19. Análises de correlação entre os dados de metilação por pirosequenciamento e expressão gênica. **A:** Análise dos genes *PTGFR*, *GPR56*, *GALR2* e *ADCY4* no grupo HbSS. **B:** Análise dos genes *SPOCK1*, *THSD7A* e *ADCY4* no grupo HbSC. Teste de correlação de Spearman; valores de $p < 0,05$ estão indicados em negrito.

DISCUSSÃO

A gestação de mulheres portadoras de DF requer um acompanhamento pré-natal de alto risco por estar associada a complicações maternas e fetais, tais como pré-eclâmpsia, infecções, aborto espontâneo e restrição de crescimento fetal. A placenta de mulheres portadoras de DF pode apresentar várias anormalidades relacionadas ao seu tamanho, histologia e aderência à parede uterina, podendo em alguns casos ocorrer seu descolamento, decorrente dos repetitivos processos de vaso-oclusão. Embora as anomalias placentárias na DF sejam bem conhecidas e reportadas, não há na literatura estudos que relatem o comportamento de mecanismos de regulação gênica, como por exemplo, a metilação do DNA nestes tecidos. Estudos nesse sentido seriam de grande importância, uma vez que mecanismos de regulação gênica podem ser alterados no tecido placentário na presença de patologias maternas, podendo desregular vias e genes importantes para o desenvolvimento placentário e fetal (96–98). Dessa forma, propusemos avaliar o perfil de metilação entre placentas de gestantes com DF e placentas de gestantes saudáveis sem DF.

Os resultados mostraram uma mudança no perfil de metilação do DNA em ambos os genótipos avaliados. Para o grupo HbSS a análise de metilação global revelou um total de 396 DMPs, das quais observou-se uma proporção maior de DMPs hipermetiladas com 73,5% em relação às hipometiladas com 26,5%. O mesmo padrão de metilação foi observado para o grupo HbSC que apresentou 581 DMPs totais, das quais 76,2% estavam hipermetiladas. Esses achados sugerem que a presença de HbSS e HbSC podem alterar de maneira semelhante a metilação do DNA (*status* de hipermetilação) no tecido placentário, o que poderia ser explicado devido a ambas as hemoglobinopatias apresentarem a mesma origem fisiopatológica. No entanto, um pequeno número de DMPs hipermetiladas foi compartilhado entre os dois grupos, indicando um efeito intraespecífico do genótipo na metilação de sítios CpG específicos.

Em relação ao *status* de hipermetilação em tecido placentário, um estudo realizado por Yuen e colaboradores relatou uma associação entre a hipermetilação do DNA de trofoblastos placentários humanos com a condição de hipóxia (24h de oxigênio a 1%) que estava também associado à não diferenciação de células de citotrofoblasto viloso em sinciotrofoblasto (122). A partir desses resultados, os autores sugerem que níveis reduzidos de oxigênio possa desempenhar um papel determinante no aumento da metilação do DNA em cultura de trofoblastos placentários humanos.

Gestantes com DF podem ter níveis reduzidos de oxigênio na circulação sanguínea devido a diversos fatores, tais como presença de eritrócitos falcizados, eventos de vaso-

oclusão e alterações fisiológicas próprias da gravidez que podem comprometer as reservas de oxigênio materno (123). Logo, devido à DF favorecer um ambiente de hipóxia placentário, sugerimos que essa condição possa estar favorecendo a hipermetilação do DNA, o que poderia possivelmente contribuir para disfunções placentárias causadas pela não diferenciação de citotrofoblasto viloso em sinciotrofoblasto

Ao avaliar a distribuição das DMPs em relação às regiões gênicas, somente o grupo HbSS apresentou diferença significativa nesta distribuição, onde foi observada frequência maior de sítios hipermetilados em regiões de TSS200 e frequência maior de sítios hipometilados em regiões do Corpo do Gene. Interessantemente, quando avaliada a distribuição das DMPs em relação às ilhas CpGs, ambos os grupos apresentaram distribuição significativa para as mesmas regiões (Ilha CpG, S_Shore e Open Sea) e com o mesmo sentido de metilação (hiper, hiper e hipometilada, respectivamente). Um estudo sobre metilação do DNA em placenta humana de terceiro trimestre versus placenta de segundo trimestre revelou uma frequência maior de DMPs em regiões semelhantes às obtidas nos grupos com DF, porém com o *status* de metilação oposto, onde as regiões de ilhas CpGs mostraram-se hipometiladas e regiões Open Sea hipermetiladas (124). A metilação em Ilhas CpGs principalmente em regiões promotoras está intimamente ligada à repressão da expressão gênica (77). Consequentemente, nossos resultados indicam que a placenta sob condições advindas da DF pode apresentar o aumento da metilação em regiões de Ilhas CpGs, podendo contribuir para alterações da expressão gênica neste tecido.

As DMRs também foram avaliadas pelo fato destas refletirem de modo mais amplo o *status* de metilação de regiões genômicas, além de apresentarem um papel funcional na regulação transcricional de genes em comparação com sítios CpGs isolados (113). A partir da análise das DMRs, foram obtidas 57 DMRs para o grupo HbSS e 106 DMRs para o grupo HbSC, sendo observado um predomínio de DMRs hipermetiladas em ambos os grupos (89% e 86%, respectivamente), mantendo-se o perfil de hipermetilação, como observado previamente nas análises de DMPs. Os genes associados a essas DMRs (49 genes: HbSS e 87 genes: HbSC) foram submetidos a análises de enriquecimento de vias, onde ambos os grupos apresentaram processos biológicos significativos ($FDR < 0,05$) e relevantes para o desenvolvimento placentário e fetal. Foram identificadas vias relacionadas ao desenvolvimento do mesênquima, morfogênese de órgãos de animais, especificação do destino da célula e desenvolvimento de neurônios do sistema nervoso central. Vias relacionadas ao desenvolvimento neural são esperadas, uma vez que a placenta também produz uma ampla gama de hormônios neurais que atuam na modulação do desenvolvimento

do cérebro fetal (125). Portanto, nossos achados revelam que a DF pode estar comprometendo processos biológicos importantes, incluindo aqueles relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso, no período gestacional, por meio da metilação de genes envolvido nesses processos.

A validação da metilação e a análise da expressão gênica foram realizadas para ambos os grupos HbSS e HbSC e comparados ao grupo controle.

Os resultados das análises de pirosequenciamento no grupo HbSS confirmaram o aumento de metilação em três sítios CpGs (cg03949391-*PTGFR*, cg03989617-*GPR56* e cg07274618-*GALR2*) dentre os quatro sítios CpGs avaliados. Interessantemente, as análises de expressão gênica por qRT-PCR revelaram dois genes diferencialmente expressos, os quais incluíram o *PTGFR* com menor expressão e o *GPR56* com maior expressão.

A análise de correlação foi realizada para o gene *PTGFR*, no entanto não foi obtida uma correlação significativa entre os dados de metilação e expressão, indicando que a hipermetilação deste gene não está ligada a sua baixa expressão, o que nos leva a sugerir que outros mecanismos epigenéticos possam estar envolvidos nesta regulação. Embora o gene *PTGFR* não tenha alcançado correlação significativa, a descoberta de sua baixa expressão em placentas de mulheres com HbSS é de grande relevância. O gene *PTGFR* produz uma proteína receptora de prostaglandina 2 α que desempenha um importante papel na estimulação da adesão, migração e proliferação de células trofoblásticas (126), eventos importantes que garantem a função normal da placenta e o desenvolvimento fetal adequado (57). Dessa forma, podemos sugerir que a menor expressão de *PTGFR* em placentas de mulheres com HbSS poderia afetar a função das células trofoblásticas, comprometendo a função e o desenvolvimento geral da placenta.

Considerando o gene *GPR56*, a análise de correlação revelou uma tendência à correlação positiva ($p=0,054$), indicando que a hipermetilação, encontrada no exon 1, pode estar ligada ao aumento de sua expressão gênica. De fato, os relatos de correlação positiva entre metilação e expressão têm sido pouco observados, no entanto um estudo em tecido placentário realizado por Lim e colaboradores revelou uma complexa correlação, onde foram encontrados vários genes que apresetaram correlação positiva, especialmente entre a metilação no corpo do gene e a expressão gênica (127). Além disso, outro estudo dirigido por Yang, em 2014, reportou que a metilação no corpo do gene esteve positivamente correlacionada com a expressão gênica, após analisar inibidores de metilação em vários tipos de cânceres (128). De acordo com esses estudos, é possível que a hipermetilação no exon 1 do gene *GPR56* esteja influenciando o aumento de sua expressão; no entanto mais estudo são necessários para se compreender como essa associação é estabelecida.

O gene *GPR56* codifica uma proteína receptora de membrana que está envolvida em importantes processos biológicos, tais como adesão celular, regulação negativa da proliferação, sinalização célula-célula e desenvolvimento cerebral. Os níveis de expressão do gene *GPR56* têm sido avaliados em alguns tipos de câncer e sua alta expressão foi associada à diminuição do poder metastático, sugerindo seu papel na inibição da angiogênese e da proliferação celular (129). Baseado nesses relatos, é possível apontar que a alta expressão do gene *GPR56* em placentas de gestantes com HbSS possa estar inibindo a proliferação e a angiogênese, podendo levar a um desenvolvimento inadequado do tecido placentário.

Para o grupo HbSC, 3 sítios CpGs foram avaliados pelo método de pirosequenciamento para confirmação dos dados encontrados no microarranjo de metilação; no entanto, nenhum dos sítios apresentou diferença significativa de metilação comparado ao grupo controle. Já nas análises de expressão gênica, dois genes apresentaram-se diferencialmente expressos, os quais incluíram o *SPOCK1* com expressão diminuída e o *ADCY4* com expressão aumentada.

Devido à metilação no gene *SPOCK1* não ter sido validada por pirosequenciamento, mas ter sido observada uma redução significativa da sua expressão, é possível considerar que outros mecanismos de regulação gênica estejam envolvidos nesta mudança de expressão. Estes achados de expressão são de grande relevância, uma vez que o gene *SPOCK1* tem demonstrado desempenhar um importante papel nos processos de proliferação, invasão e migração celular em vários tipos de tumores (130–132). O silenciamento deste gene foi recentemente associado com a redução da capacidade migratória de células de câncer colorretal, ressaltando seu papel no processo de migração celular. Baseando-se nesses

achados, podemos sugerir que a baixa expressão de *SPOCK1* na placenta de gestantes com HbSC poderia afetar os mecanismos de migração, invasão e proliferação celular, levando ao comprometimento das funcionalidades da placenta.

Em relação ao gene *ADCY4*, os achados mostraram uma correlação positiva entre a metilação na região promotora (TSS200) e o aumento da expressão. Na maioria das vezes a metilação em regiões promotoras está associada à redução da expressão gênica, no entanto há estudos em vários tipos de câncer que relatam uma correlação positiva entre a metilação, localizada em regiões promotoras e a maior atividade gênica (133,134). Um dos estudos foi conduzido por Irizarry et al, onde os autores investigaram sítios CpGs metilados, localizados em até 300 pares de base a montante da região TSS, em câncer de cólon, e relataram que a metilação nessa região esteve positivamente correlacionada com a expressão gênica (135). Ainda é pouco compreendido o mecanismo pelo qual a metilação em regiões promotoras pode vir a aumentar a atividade gênica. No entanto, estudos apontam que a metilação em promotores de determinados genes favorece a ligação de fatores de transcrição específicos o que promove a transcrição de genes que até então eram pouco ou não ativos (136–138). Considerando esses relatos, nossos achados de correlação positiva estão coerentes, porém seria necessária uma investigação mais aprofundada do gene *ADCY4* para compreender se a hipermetilação (região TSS200) estaria favorecendo a ligação de fatores de transcrição e levando à maior atividade deste gene. O gene *ADCY4* codifica um membro da família das adenilato ciclases que são enzimas associadas à membrana, responsáveis por alterações fisiológicas, tais como: controle celular, diferenciação, translocação de vesículas, produção de enzimas e apoptose. Estas enzimas atuam em resposta à ativação de receptores celulares, por meio de hormônios, neurotransmissores ou fatores de crescimento (139). Um estudo recente sobre a expressão gênica em placenta humana de primeiro e terceiro trimestres reportou uma expressão aumentada do gene *ADCY4* no primeiro trimestre comparado ao terceiro trimestre, indicando que vias relacionadas a este gene possam estar mais ativas no início da gestação (140). Considerando que o gene *ADCY4* mostrou-se mais expresso em placentas do grupo HbSC (terceiro trimestre), é possível sugerir que haja alterações de vias envolvendo esse gene neste período gestacional em mulheres com hemoglobinopatia SC.

A presença de complicações maternas e perinatais confirmou o aumento da morbidade associada à DF. Os grupos HbSS e HbSC apresentaram diferenças significativas para o peso da placenta e peso do RN, que estão principalmente associados às diferenças na idade gestacional no parto. Embora nosso estudo tenha algumas limitações, incluindo o pequeno tamanho da amostra e a diferença da idade gestacional entre os grupos, este é o primeiro

estudo que avaliou o perfil de metilação do DNA em placentas de gestantes nos dois genótipos mais frequentes da DF (HbSS e HbSC).

Em conclusão, nossos achados sugerem que a DF pode afetar a metilação do DNA no tecido placentário, levando a um *status* de hipermetilação. Esse aumento da metilação pode favorecer mudanças na expressão gênica da placenta e, conseqüentemente, alterar as funções dos trofoblastos, contribuindo para o desenvolvimento inadequado da mesma. Estes resultados forneceram novas perspectivas que podem direcionar pesquisas futuras a fim de compreender como a metilação do DNA pode sofrer alterações e assim regular processos importantes no tecido placentário de mulheres com DF.

CONCLUSÕES

- Há diferença no perfil de metilação do DNA placentário no grupo caso (HbSC e HbSS) comparado ao grupo controle (HbAA), sendo revelado um perfil de hipermetilação do DNA global em ambos os grupos avaliados (HbSS e HbSC).
- Genes diferencialmente metilados podem alterar a expressão gênica em placenta de gestantes com DF, sendo possível destacar o gene *GPR56* para grupo HbSS e o gene *ADCY4* para o grupo HbSC.
- Os genes encontrados diferencialmente expressos (*PTGFR* e *GPR56* - HbSS; *SPOCK1* e *ADCY4* - HbSC) estão associados a processos importantes para as atividades do trofoblasto, como por exemplo, migração, invasão e proliferação celular. Portanto, as mudanças de expressão desses genes poderiam contribuir para disfunções das células trofoblásticas, levando a danos para o tecido placentário em gestantes com DF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perutz MF. Species adaptation in a protein molecule. *Mol Biol Evol.* 1983 Dec;1(1):1–28.
2. Bunn, HF, Forget, BG. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. In: Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. 1. ed. W.B. Saunders Company; 1986. p. 690p.
3. Magalhães L. Hemoglobina: o que é, estrutura, tipos e função [Internet]. Toda Matéria. [cited 2020 Jan 21]. Available from: <https://www.todamateria.com.br/hemoglobina/>
4. Antonarakis SE, Kazazian HH, Orkin SH. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet.* 1985;69(1):1–14.
5. Bank A. Understanding globin regulation in beta-thalassemia: it's as simple as alpha, beta, gamma, delta. *J Clin Invest.* 2005 Jun;115(6):1470–3.
6. Maniatis T, Fritsch EF, Lauer J, Lawn RM. The molecular genetics of human hemoglobins. *Annu Rev Genet.* 1980;14:145–78.
7. Gale RE, Clegg JB, Huehns ER. Human embryonic haemoglobins Gower 1 and Gower 2. *Nature.* 1979 Jul 12;280(5718):162–4.
8. Randhawa ZI, Jones RT, Lie-Injo LE. Human hemoglobin Portland II (zeta 2 beta 2). Isolation and characterization of Portland hemoglobin components and their constituent globin chains. *J Biol Chem.* 1984 Jun 10;259(11):7325–30.
9. Ballas SK, Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1996 Dec;10(6):1221–39.
10. Adewoyin AS. Management of sickle cell disease: a review for physician education in Nigeria (sub-saharan Africa). *Anemia.* 2015;2015:791498.
11. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, et al. Pain in Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine.* 1991 Jul 4;325(1):11–6.
12. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest.* 2007 Apr;117(4):850–8.
13. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018 15;4:18010.
14. Steinberg MH. Pathophysiology of sickle cell disease. *Baillieres Clin Haematol.* 1998 Mar;11(1):163–84.
15. De Franceschi L, Corrocher R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. *Haematologica.* 2004 Mar;89(3):348–56.
16. Boyd AS, Neldner KH. Hydroxyurea therapy. *J Am Acad Dermatol.* 1991 Sep;25(3):518–24.

17. Heller P, Best WR, Nelson RB, Becktel J. Clinical implications of sickle-cell trait and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in hospitalized black male patients. *N Engl J Med*. 1979 May 3;300(18):1001–5.
18. Romero JR, Suzuka SM, Nagel RL, Fabry ME. Expression of HbC and HbS, but not HbA, results in activation of K-Cl cotransport activity in transgenic mouse red cells. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2384–90.
19. Morris CR, Singer ST, Walters MC. Clinical hemoglobinopathies: iron, lungs and new blood. *Curr Opin Hematol*. 2006 Nov;13(6):407–18.
20. Brandelise S, Pinheiro V, Gabetta CS, Hambleton I, Serjeant B, Serjeant G. Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience. *Clin Lab Haematol*. 2004 Feb;26(1):15–9.
21. Zago MA. Considerações gerais In: Manual de doenças mais importantes, por razões étnicas, na população brasileira afro-descendente / Brasil. Secretaria de Políticas de Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2001a. In. Available from: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd06_09.pdf
22. Ministério da Saúde. Doença falciforme: O que se deve saber sobre herança genética. In MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2014.
23. Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005 Oct;19(5):771–84, v.
24. Costa FF, Conran N, Fertrin KY. Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme. In: Tratado de Hematologia. Editora Atheneu; 2013. p. 205–23.
25. Horiuchi K, Ballas SK, Asakura T. The effect of deoxygenation rate on the formation of irreversibly sickled cells. *Blood*. 1988 Jan;71(1):46–51.
26. Hebbel RP. Auto-oxidation and a membrane-associated “Fenton reagent”: a possible explanation for development of membrane lesions in sickle erythrocytes. *Clin Haematol*. 1985 Feb;14(1):129–40.
27. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*. 2005 Jul 6;294(1):81–90.
28. Sonati M de F, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J Pediatr (Rio J)*. 2008 Aug;84(4 Suppl):S40-51.
29. Quinn CT, Rogers ZR, McCavit TL, Buchanan GR. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. *Blood*. 2010 Apr 29;115(17):3447–52.
30. Gardner K, Douiri A, Drasar E, Allman M, Mwirigi A, Awogbade M, et al. Survival in adults with sickle cell disease in a high-income setting. *Blood*. 2016 08;128(10):1436–8.
31. Quinn CT, Rogers ZR, Buchanan GR. Survival of children with sickle cell disease. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4023–7.

32. Cançado, R.D. Doenças falciformes. Prática hospitalares. Ano IX, n. 50, mar./abr., 2007. 2007 Apr;50.
33. Beutler, E. CHAPTER 47 THE SICKLE CELL DISEASES AND RELATED DISORDERS [Internet]. (Ed) 5a ed, 1995. McGraw-Hill; 2011 [cited 2018 Apr 10]. Available from: <https://medtextfree.wordpress.com/2011/12/30/chapter-47-the-sickle-cell-diseases-and-related-disorders/>
34. Embury SH. Anemia falciforme e hemoglobinopatias associadas. Cecil tratado de medicina interna. 20^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan; 1997.
35. Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF, Luty GA, Dampier C, Osunkwo I, et al. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:949535.
36. Nagel RL, Fabry ME, Steinberg MH. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Rev*. 2003 Sep;17(3):167–78.
37. Howard J, Oteng-Ntim E. The obstetric management of sickle cell disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012 Feb;26(1):25–36.
38. Naik RP, Lanzkron S. Baby on board: what you need to know about pregnancy in the hemoglobinopathies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:208–14.
39. Serjeant GR, Hambleton I, Thame M. Fecundity and pregnancy outcome in a cohort with sickle cell-haemoglobin C disease followed from birth. *BJOG*. 2005 Sep;112(9):1308–14.
40. Rahimy MC, Gangbo A, Adjou R, Deguenon C, Goussanou S, Alihonou E. Effect of active prenatal management on pregnancy outcome in sickle cell disease in an African setting. *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1685–9.
41. Parrish MR, Morrison JC. Sickle cell crisis and pregnancy. *Seminars in Perinatology*. 2013 Aug 1;37(4):274–9.
42. Andemariam B, Browning SL. Current management of sickle cell disease in pregnancy. *Clin Lab Med*. 2013 Jun;33(2):293–310.
43. Villers MS, Jamison MG, De Castro LM, James AH. Morbidity associated with sickle cell disease in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Aug;199(2):125.e1-5.
44. Murphy DJ, Stirrat GM. Mortality and Morbidity Associated with Early-Onset Preeclampsia. Hypertension in Pregnancy. 2000 Jan 1;19(2):221–31.
45. Wilson NO, Ceesay FK, Hibbert JM, Driss A, Obed SA, Adjei AA, et al. Pregnancy outcomes among patients with sickle cell disease at Korle-Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana: retrospective cohort study. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Jun;86(6):936–42.
46. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Green-top Guideline. Management of Sickle Cell Disease in Pregnancy. RCOG. 2011;61:1-20.

47. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes, Brasília, DF: ANVISA, 2002.
48. Chakravarty EF, Khanna D, Chung L. Pregnancy outcomes in systemic sclerosis, primary pulmonary hypertension, and sickle cell disease. *Obstet Gynecol.* 2008 Apr;111(4):927–34.
49. Fertrin KY. Pregnancy in sickle cell disease - do we know what to expect? *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2014 Oct;36(5):313–4.
50. Silva FAC, Ferreira ALCG, Hazin-Costa MF, Dias MLG, Araújo AS, Souza AI. Adverse clinical and obstetric outcomes among pregnant women with different sickle cell disease genotypes. *Int J Gynaecol Obstet.* 2018 Oct;143(1):89–93.
51. Gilli SC, De Paula EV, Biscaro FP, Marques JF, Costa FF, Saad ST. Third-trimester erythrocytapheresis in pregnant patients with sickle cell disease. *Int J Gynaecol Obstet.* 2007 Jan;96(1):8–11.
52. Benites BD, Benevides TCL, Valente IS, Marques JF, Gilli SCO, Saad STO. The effects of exchange transfusion for prevention of complications during pregnancy of sickle hemoglobin C disease patients. *Transfusion.* 2016 Jan;56(1):119–24.
53. Rogers DT, Molokie R. Sickle cell disease in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2010 Jun;37(2):223–37.
54. Askie LM, Duley L, Henderson-Smart DJ, Stewart LA, PARIS Collaborative Group. Antiplatelet agents for prevention of pre-eclampsia: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet.* 2007 May 26;369(9575):1791–8.
55. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde amplia faixa etária de transplante para doença falciforme. [Internet]. Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/22/Portaria-ConjuntaPCDT-Doenca-Falciforme.fev.2018.pdf>.
56. Vermynen C, Cornu G. Bone marrow transplantation for sickle cell disease. The European experience. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1994 Feb;16(1):18–21.
57. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research.* 2004 Jan;114(5–6):397–407.
58. Moore, K. L., Persaud, T. V. N. *Embriologia Clínica.* 8^a ed. Elsevier Ltda; 2008.
59. Schoenwolf, G. C., Larsen, W. J. *Embriologia Humana de Larsen.* 4^a ed. Elsevier Ltda; 2009.
60. Adair, F. L., Thelander, H. A study of the weight and dimensions of the human placenta in its relation to the weight of newborn infant. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 1925;172–205.
61. Walker, J. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology.* In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1954. p. 39.

62. Escomez RI. Funciones de la placenta [Internet]. TuTareaEscolar.com. 2019 [cited 2020 Jan 9]. Available from: https://www.tutareaescolar.com/funciones_de_la_placenta.html
63. Koshy M, Burd L, Wallace D, Moawad A, Baron J. Prophylactic Red-Cell Transfusions in Pregnant Patients with Sick Cell Disease. *New England Journal of Medicine*. 1988 Dec 1;319(22):1447–52.
64. SHANKLIN D. Clinicopathologic correlates in placentas from women with sickle cell disease. *Am J Pathol*. 1976;82:ppc-15.
65. Thame MM, Osmond C, Serjeant GR. Fetal growth in women with homozygous sickle cell disease: an observational study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Sep;170(1):62–6.
66. Belcher JD, Bryant CJ, Nguyen J, Bowlin PR, Kielbik MC, Bischof JC, et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood*. 2003 May 15;101(10):3953–9.
67. Hassell K. Pregnancy and Sickle Cell Disease. *Hematology/Oncology Clinics*. 2005 Oct 1;19(5):903–16.
68. Trampont P, Roudier M, Andrea A-M, Nomal N, Mignot T-M, Leborgne-Samuel Y, et al. The placental-umbilical unit in sickle cell disease pregnancy: a model for studying in vivo functional adjustments to hypoxia in humans. *Hum Pathol*. 2004 Nov;35(11):1353–9.
69. Baptista LC, Costa ML, Ferreira R, Albuquerque DM, Lanaro C, Fertrin KY, et al. Abnormal expression of inflammatory genes in placentas of women with sickle cell anemia and sickle hemoglobin C disease. *Ann Hematol*. 2016 Oct;95(11):1859–67.
70. Baptista LC, Figueira CO, Souza BB, Fertrin KY, Antolini A, Costa FF, et al. Highlight Article: Different morphological and gene expression profile in placentas of the same sickle cell anemia patient in pregnancies of opposite outcomes. *Exp Biol Med* (Maywood). 2019 Apr;244(5):395–403.
71. Slack JMW. Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nat Rev Genet*. 2002;3(11):889–95.
72. Murrell A, Rakyan VK, Beck S. From genome to epigenome. *Hum Mol Genet*. 2005 Apr 15;14 Spec No 1:R3–10.
73. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004 May 27;429(6990):457–63.
74. Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect*. 2006 Mar;114(3):A160-167.
75. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002 Jan 1;16(1):6–21.
76. Cao J. The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics. *Biol Proced Online*. 2014;16:11.

77. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012 May 29;13(7):484–92.
78. Pogribny IP, Rusyn I. Environmental toxicants, epigenetics, and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2013;754:215–32.
79. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1074–80.
80. Chen Z, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem.* 2011 May 27;286(21):18347–53.
81. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281–97.
82. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843–54.
83. Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J Cell Physiol.* 2005 Jul;204(1):21–35.
84. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006 Feb;31(2):89–97.
85. Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res.* 2008 Aug;659(1–2):40–8.
86. Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem.* 2004 Dec 10;279(50):52353–60.
87. Matos R.W.M. Epigenética forense. *Acta de Ciências e Saúde.* 2016;02.
88. Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T. The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer.* 2009 Feb 24;100(4):571–7.
89. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol.* 2004 Nov 15;22(22):4632–42.
90. Turek-Plewa J, Jagodziński PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10(4):631–47.
91. Qureshi IA, Mehler MF. Emerging role of epigenetics in stroke: part 1: DNA methylation and chromatin modifications. *Arch Neurol.* 2010 Nov;67(11):1316–22.
92. Ushijima T, Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. *Cancer Sci.* 2010 Feb;101(2):300–5.
93. Molloy PL, Watt F. DNA methylation and specific protein-DNA interactions. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci.* 1990 Jan 30;326(1235):267–75.

94. Esteller M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J Pathol.* 2005 Jan;205(2):172–80.
95. Nan X, Cross S, Bird A. Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. *Novartis Found Symp.* 1998;214:6–16; discussion 16–21, 46–50.
96. Gagné-Ouellet V, Houde A-A, Guay S-P, Perron P, Gaudet D, Guérin R, et al. Placental lipoprotein lipase DNA methylation alterations are associated with gestational diabetes and body composition at 5 years of age. *Epigenetics.* 2017 May 9;12(8):616–25.
97. Morales E, Vilahur N, Salas LA, Motta V, Fernandez MF, Murcia M, et al. Genome-wide DNA methylation study in human placenta identifies novel loci associated with maternal smoking during pregnancy. *Int J Epidemiol.* 2016;45(5):1644–55.
98. Nogues P, Dos Santos E, Jammes H, Berveiller P, Arnould L, Vialard F, et al. Maternal obesity influences expression and DNA methylation of the adiponectin and leptin systems in human third-trimester placenta. *Clinical Epigenetics.* 2019 Feb 7;11(1):20.
99. Burton GJ, Sebire NJ, Myatt L, Tannetta D, Wang Y-L, Sadovsky Y, et al. Optimising sample collection for placental research. *Placenta.* 2014 Jan;35(1):9–22.
100. Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics.* 2016 Mar;8(3):389–99.
101. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics.* 2011 Oct;98(4):288–95.
102. Bock C. Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nat Rev Genet.* 2012 Oct;13(10):705–19.
103. Pidsley R, Y Wong CC, Volta M, Lunnon K, Mill J, Schalkwyk LC. A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data. *BMC Genomics.* 2013 May 1;14:293.
104. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics.* 2014 May 15;30(10):1363.
105. Morris TJ, Butcher LM, Feber A, Teschendorff AE, Chakravarthy AR, Wojdacz TK, et al. ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. *Bioinformatics.* 2014 Feb 1;30(3):428–30.
106. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015 Apr 20;43(7):e47.
107. Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, et al. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res.* 2006 Mar;16(3):383–93.

108. Du P, Zhang X, Huang C-C, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*. 2010 Nov 30;11:587.
109. Maksimovic J, Gordon L, Oshlack A. SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome Biol*. 2012 Jun 15;13(6):R44.
110. Touleimat N, Tost J. Complete pipeline for Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics*. 2012 Jun;4(3):325–41.
111. Fortin J-P, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, et al. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biology*. 2014 Dec 3;15(11):503.
112. Zhou W, Laird PW, Shen H. Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes. *Nucleic Acids Res*. 2017 Feb 28;45(4):e22.
113. Zhang Y, Liu H, Lv J, Xiao X, Zhu J, Liu X, et al. QDMR: a quantitative method for identification of differentially methylated regions by entropy. *Nucleic Acids Res*. 2011 May;39(9):e58.
114. Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, Pidsley R, Samaras K, V Lord R, et al. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics Chromatin*. 2015;8:6.
115. Wang J, Vasaikar S, Shi Z, Greer M, Zhang B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jul 3;45(Web Server issue):W130–7.
116. Anastasiadi D, Esteve-Codina A, Piferrer F. Consistent inverse correlation between DNA methylation of the first intron and gene expression across tissues and species. *Epigenetics Chromatin*. 2018 29;11(1):37.
117. Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS ONE*. 2011 Jan 18;6(1):e14524.
118. Thul PJ, Lindskog C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. *Protein Sci*. 2018;27(1):233–44.
119. Nyrén P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Anal Biochem*. 1987 Dec;167(2):235–8.
120. Dejeux E. , et al DE et al. Identification and quantification of differentially methylated loci by the pyrosequencing technology. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Jun 25]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18987816>

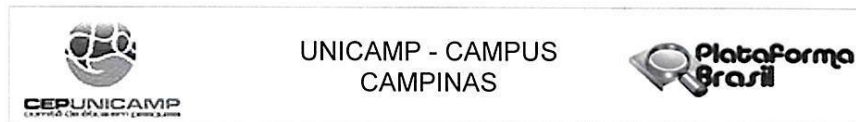
121. England R, Pettersson M. Pyro Q-CpG (TM): quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing (R). *Nature Methods | Application Notes*. 2005 Oct 1;2.
122. Yuen RKC, Chen B, Blair JD, Robinson WP, Nelson DM. Hypoxia alters the epigenetic profile in cultured human placental trophoblasts. *Epigenetics*. 2013 Feb 1;8(2):192–202.
123. Boga C, Ozdogu H. Pregnancy and sickle cell disease: A review of the current literature. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2016 Feb 1;98:364–74.
124. Novakovic B, Yuen RK, Gordon L, Penaherrera MS, Sharkey A, Moffett A, et al. Evidence for widespread changes in promoter methylation profile in human placenta in response to increasing gestational age and environmental/stochastic factors. *BMC Genomics*. 2011 Oct 28;12:529.
125. Bonnin A, Goeden N, Chen K, Wilson ML, King J, Shih JC, et al. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature*. 2011 Apr 21;472(7343):347–50.
126. Barylka M, Kaczynski P, Goryszewska E, Riley SC, Wacławik A. Prostaglandin F_{2α} stimulates adhesion, migration, invasion and proliferation of the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo. *Placenta*. 2019 Feb 1;77:19–29.
127. Lim YC, Li J, Ni Y, Liang Q, Zhang J, Yeo GSH, et al. A complex association between DNA methylation and gene expression in human placenta at first and third trimesters. *PLoS One* [Internet]. 2017 Jul 13 [cited 2018 Oct 2];12(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5509291/>
128. Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene Body Methylation can alter Gene Expression and is a Therapeutic Target in Cancer. *Cancer Cell*. 2014 Oct 13;26(4):577–90.
129. Zendman Albert J.W. TM7XN1, a novel human EGF-TM7-like cDNA, detected with mRNA differential display using human melanoma cell lines with different metastatic potential. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Oct 4]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10100861>
130. Chen D, Zhou H, Liu G, Zhao Y, Cao G, Liu Q. SPOCK1 promotes the invasion and metastasis of gastric cancer through Slug-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Mol Med*. 2018 Feb;22(2):797–807.
131. Chen Q, Yao Y-T, Xu H, Chen Y-B, Gu M, Cai Z-K, et al. SPOCK1 promotes tumor growth and metastasis in human prostate cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:2311–21.
132. Fan L-C, Jeng Y-M, Lu Y-T, Lien H-C. SPOCK1 Is a Novel Transforming Growth Factor-β-Induced Myoepithelial Marker That Enhances Invasion and Correlates with Poor Prognosis in Breast Cancer. *PLoS ONE*. 2016;11(9):e0162933.
133. Rauluseviciute I, Drabløs F, Rye MB. DNA hypermethylation associated with upregulated gene expression in prostate cancer demonstrates the diversity of epigenetic regulation. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2020 Jan 8 [cited 2020 Apr 11];13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6950795/>

134. Wan J, Oliver VF, Wang G, Zhu H, Zack DJ, Merbs SL, et al. Characterization of tissue-specific differential DNA methylation suggests distinct modes of positive and negative gene expression regulation. *BMC Genomics*. 2015 Feb 5;16:49.
135. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*. 2009 Feb;41(2):178–86.
136. Zhu H, Wang G, Qian J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat Rev Genet*. 2016 01;17(9):551–65.
137. Yin Y, Morgunova E, Jolma A, Kaasinen E, Sahu B, Khund-Sayeed S, et al. Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science*. 2017 05;356(6337).
138. Hu S, Wan J, Su Y, Song Q, Zeng Y, Nguyen HN, et al. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *Elife*. 2013 Sep 3;2:e00726.
139. Johnstone TB, Agarwal SR, Harvey RD, Ostrom RS. cAMP Signaling Compartmentation: Adenylyl Cyclases as Anchors of Dynamic Signaling Complexes. *Mol Pharmacol*. 2018;93(4):270–6.
140. Sitras V, Fenton C, Paulssen R, Vårtun Å, Acharya G. Differences in Gene Expression between First and Third Trimester Human Placenta: A Microarray Study. *PLoS One* [Internet]. 2012 Mar 19 [cited 2018 Oct 6];7(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3307733/>
141. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*. 1957 Aug 17;180(4581):326–8.
142. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004 Oct 9;364(9442):1343–60.
143. Powars DR, Sandhu M, Niland-Weiss J, Johnson C, Bruce S, Manning PR. Pregnancy in sickle cell disease. *Obstet Gynecol*. 1986 Feb;67(2):217–28.
144. de Montalembert M, Deneux-Tharaux C. Pregnancy in sickle cell disease is at very high risk. *Blood*. 2015 May 21;125(21):3216–7.
145. Oteng-Ntim E, Meeks D, Seed PT, Webster L, Howard J, Doyle P, et al. Adverse maternal and perinatal outcomes in pregnant women with sickle cell disease: systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2015 May 21;125(21):3316–25.
146. Vianello A, Vencato E, Cantini M, Zanconato G, Manfrin E, Zamo A, et al. Improvement of maternal and fetal outcomes in women with sickle cell disease treated with early prophylactic erythrocytapheresis. *Transfusion*. 2018;58(9):2192–201.
147. Billett HH, Langer O, Regan OT, Merkatz I, Anyaegbunam A. Doppler velocimetry in pregnant patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 1993 Mar;42(3):305–8.
148. Rathod KB, Jaiswal KN, Shrivastava AC, Shrikhande AV. Study of placenta in sickle cell disorders. *Indian J Pathol Microbiol*. 2007 Oct;50(4):698–701.

149. Thame M, Lewis J, Trotman H, Hambleton I, Serjeant G. The Mechanisms of Low Birth Weight in Infants of Mothers With Homozygous Sickle Cell Disease. *Pediatrics*. 2007 Sep 1;120(3):e686–93.
150. Zhou W, Laird PW, Shen H. Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes. *Nucleic Acids Res*. 2017 Feb 28;45(4):e22.
151. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
152. Blair JD, Yuen RKC, Lim BK, McFadden DE, von Dadelszen P, Robinson WP. Widespread DNA hypomethylation at gene enhancer regions in placentas associated with early-onset pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2013 Oct;19(10):697–708.
153. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands – ‘A rough guide.’ *FEBS Letters*. 2009;583(11):1713–20.
154. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012 May 29;13(7):484–92.
155. Popov DV, Lysenko EA, Vepkhvadze TF, Kurochkina NS, Maknovskii PA, Vinogradova OL. Promoter-specific regulation of PPARGC1A gene expression in human skeletal muscle. *J Mol Endocrinol*. 2015 Oct;55(2):159–68.
156. Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgård R. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene*. 2004 Apr 14;330:101–14.
157. Agarwal VR, Bulun SE, Leitch M, Rohrich R, Simpson ER. Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Nov;81(11):3843–9.

ANEXOS

Anexo 1: Parecer do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp – pacientes provenientes do CAISM



Continuação do Parecer: 2.502.968

serão gestantes acompanhadas pelo Centro de Atenção Integral da Saúde da Mulher (CAISM) da UNICAMP ou internadas na instituição para parto, e para cada uma delas serão coletadas amostras do tecido placentário, após o parto. A partir destas amostras será feito a extração de DNA e posterior estudo de metilação utilizando a técnica de análise do Metiloma através do Infinium® Methylation EPIC BeadChip, o qual analisa mais de 850 mil sítios de metilação por amostra, esses sítios compreendem regiões de enhancer, regiões promotoras e ilhas CpG. A comparação das regiões deferentemente metiladas será realizada entre casos e controle através do teste de Mann-Whitney. Posteriormente as características clínicas das gestantes serão relacionadas com as regiões deferentemente metiladas, através do Teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher. Com o presente estudo a análise do perfil de metilação poderá fornecer importantes dados para uma melhor compreensão de como a doença afeta a fisiologia da placenta e aumenta os riscos de complicações materna e fetal.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterização do perfil de metilação em placentas de mulheres portadoras de AF (Hb SS), doença da hemoglobina SC (Hb SC) e pré-eclâmpsia comparadas a placentas de mulheres saudáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

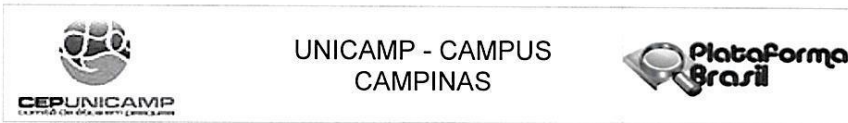
Segundo o pesquisador:

Riscos: Em relação aos riscos relacionados a coleta de sangue periférico, estes são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e habilitado para realizar esse procedimento. Em relação a coleta do tecido da placenta, esta será realizada após o parto, não oferecendo riscos a pacientes e nem ao feto. **Benefícios:** Pouco se sabe a respeito da influência do processo de metilação em placentas de pacientes com DF. Portanto, a metodologia de análise do perfil de metilação em tecido de placentas destas gestantes, que será utilizada no presente estudo, poderá fornecer importantes dados para uma melhor compreensão de como a doença afeta a fisiologia da placenta e aumenta os riscos de complicações materna e fetal, ampliando as possibilidades para estudos futuros.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo prospectivo do tipo caso-controle que será conduzido por uma aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Clínica Médica. O trabalho será desenvolvido sob orientação de uma pesquisadora do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética e

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.502.968

co-orientação de uma professora do Departamento de Tocoginecologia da FCM, que atua no CAISM. Serão incluídas 32 gestantes divididas em quatro grupos distintos: mulheres com anemia falciforme, mulheres com hemoglobina C, mulheres com pré-eclâmpsia e mulheres saudáveis. Apresenta TCLE e demais documentos necessários para apreciação quanto aos aspectos éticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados adequadamente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

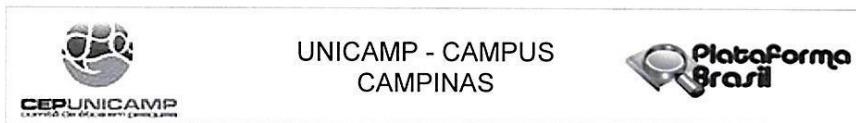
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.502.968

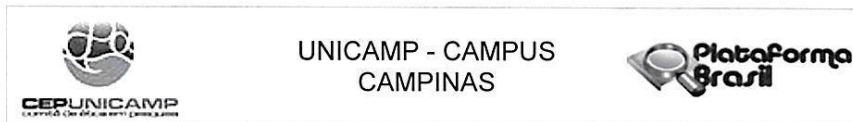
protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final, em formulário próprio do CEP, devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_969198.pdf	07/02/2018 16:12:03		Aceito
Outros	Carta_Resposta_pendencias_Plataforma_Brasil.pdf	07/02/2018 16:11:16	Gislene Pereira Gil	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Placenta_Gislene_PB.pdf	07/02/2018 16:09:39	Gislene Pereira Gil	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	07/02/2018 16:07:13	Gislene Pereira Gil	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_modificado.pdf	07/02/2018 16:01:19	Gislene Pereira Gil	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	01/11/2017 11:25:00	Gislene Pereira Gil	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_Circunstanciado.pdf	27/09/2017 12:03:37	Gislene Pereira Gil	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aprovacao_CPCaism.pdf	27/09/2017 12:02:39	Gislene Pereira Gil	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Parecer_Aprovacao_biobanco_CAISM.pdf	27/09/2017 12:01:32	Gislene Pereira Gil	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Biobanco_CAISM.pdf	27/09/2017 11:59:08	Gislene Pereira Gil	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_Projeto.pdf	27/09/2017	Gislene Pereira Gil	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.502.968

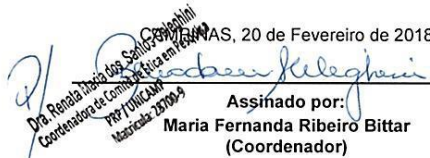
Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto.pdf	11:58:53	Gislene Pereira Gil	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_PB_06092017.pdf	06/09/2017 15:03:59	Gislene Pereira Gil	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não


 Assinado por:
 Maria Fernanda Ribeiro Bittar
 (Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Anexo 2: Parecer do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp – pacientes provenientes da Maternidade de Campinas



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO EM PLACENTAS DE MULHERES PORTADORAS DE DOENÇA FALCIFORME.

Pesquisador: Gislene Pereira Gil

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 6

CAAE: 79730817.7.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: Capes Coordenação Aperf Pessoal Nível Superior

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.130.048

Apresentação do Projeto:

Parecer de apreciação de solicitação de emenda um (1) ao projeto original.

Justificativa da Emenda: O motivo desta emenda é devido à necessidade que estamos tendo em aumentar o tamanho amostral do grupo de gestantes saudáveis, o qual será modificado para 30. Atualmente, a seleção das gestantes saudáveis é feita no ambulatório do CAISM/UNICAMP, porém há dificuldades em obter pacientes saudáveis, uma vez que o CAISM faz atendimento principalmente às gestantes de alto risco. Temos como alternativa o Biobanco do CAISM para a seleção das pacientes e obtenção de amostras de placentas, porém também não há pacientes suficientes que se enquadrem nos critérios de seleção necessários para incluir no grupo controle. Existe um projeto em andamento, intitulado "TRANSCRIPTÔMICA EM PLACENTAS DE PACIENTES PORTADORAS DE DOENÇA FALCIFORME." o qual apresenta aprovação do CEP sob o número CAAE: 54665216.6.0000.5404. Este projeto utiliza amostras de placenta de gestantes saudáveis, selecionadas e coletadas na Maternidade de Campinas e que apresentam critérios de inclusão semelhantes ao critério presentes em meu projeto e que, portanto, poderão ser utilizadas em meu projeto. Serão selecionadas somente as amostras que apresentarem autorização para uso do material em outras pesquisas e que não tenham a necessidade de reconsentimento. Estas amostras estão armazenadas em Biorrepositório no Laboratório de Genética Molecular Humana,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.130.048

localizado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética-CBMEG/UNICAMP.

Objetivo da Pesquisa:

Nada é alterado do projeto original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nada é alterado do projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto original aprovado em 20 de Fevereiro de 2018.

Alterações da emenda:

Aumento do tamanho amostral de 32 para 54. Sendo que aumenta de 8 para 30 as voluntárias saudáveis. Refere dificuldade em obter esse número no Caism justificando a utilização de material de outro estudo (biobanco).

Para os dois projetos em questão há alteração apenas da aluna realizando a pesquisa; orientadora e coorientadora são as mesmas. Sendo assim a quebra de sigilo do participante do primeiro projeto fica amenizada. O motivo desta emenda é devido à necessidade que estamos tendo em aumentar o tamanho amostral do grupo de gestantes saudáveis, o qual será modificado para 30. Atualmente, a seleção das gestantes saudáveis é feita no ambulatório do CAISM/UNICAMP, porém há dificuldades em obter pacientes saudáveis, uma vez que o CAISM faz atendimento principalmente às gestantes de alto risco. Temos como alternativa o Biobanco do CAISM para a seleção das pacientes e obtenção de amostras de placentas, porém também não há pacientes suficientes que se enquadrem nos critérios de seleção necessários para incluir no grupo controle. Existe um projeto em andamento, intitulado "TRANSCRIPTÔMICA EM PLACENTAS DE PACIENTES PORTADORAS DE DOENÇA FALCIFORME." o qual apresenta aprovação do CEP sob o número CAAE: 54665216.6.0000.5404. Este projeto utiliza amostras de placenta de gestantes saudáveis, selecionadas e coletadas na Maternidade de Campinas e que apresentam critérios de inclusão semelhantes ao critério presentes em meu projeto e que, portanto, poderão ser utilizadas em meu projeto. Solicita dispensa do TCLE para as participantes do projeto anterior que não forem localizadas e que tenham ido a óbito. Uma parte do material biológico será retirado do biorrepositório e se houver sobra o mesmo será devolvido.

Declaração de patrocinador - CAPES.

Cronograma : Seleção de pacientes e coleta de amostras : primeiro semestre de 2019.

Tamanho amostral de 54 participantes.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.130.048

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha_de_rosto.pdf 04/10/2018 : nova folha de rosto atualizando o tamanho amostral para 54. Está incompleta, sem a declaração de patrocinador.
- TCLE_Pacientes_MaternidadeCampinas.pdf 04/10/2018 : É apresentado o TCLE do projeto "TRANSCRIPTÔMICA EM PLACENTAS DE PACIENTES PORTADORAS DE DOENÇA FALCIFORME" (desatualizado).

- Carta_resposta_22_01_2019.pdf 22/01/2019 : comenta as pendências.
- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1232051_E1.pdf 22/01/2019 : adequado.
- TCLE_Emenda_consentimento_22_01_2019.pdf 22/01/2019 : adequado.
-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

TCLE foi adequado após pendências e recomendações.

Conclusão:emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.130.048

e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.

- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1232051_E1.pdf	22/01/2019 16:43:41		Aceito
Outros	Carta_resposta_22_01_2019.pdf	22/01/2019 16:42:54	Gislene Pereira Gil	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Emenda_consentimento_22_01_2019.pdf	22/01/2019 16:42:29	Gislene Pereira Gil	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Placenta_Gislene_PB_09_01_2019.pdf	09/01/2019 13:22:16	Gislene Pereira Gil	Aceito
Outros	Emenda_12_11_18.pdf	12/11/2018 12:51:46	Gislene Pereira Gil	Aceito
Outros	Transferencia_de_amstras_12_11_18.pdf	12/11/2018 12:20:47	Gislene Pereira Gil	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PB.pdf	12/11/2018 12:19:28	Gislene Pereira Gil	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_12_11_18.pdf	12/11/2018 11:29:54	Gislene Pereira Gil	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_Pacientes_MaternidadeCampinas.pdf	04/10/2018 10:53:44	Gislene Pereira Gil	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.130.048

Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes_MaternidadeCampinas.pdf	04/10/2018 10:53:44	Gislene Pereira Gil	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	07/02/2018 16:07:13	Gislene Pereira Gil	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	01/11/2017 11:25:00	Gislene Pereira Gil	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_Circunstanciado.pdf	27/09/2017 12:03:37	Gislene Pereira Gil	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aprovacao_CPCaism.pdf	27/09/2017 12:02:39	Gislene Pereira Gil	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Parecer_Aprovacao_biobanco_CAISM.pdf	27/09/2017 12:01:32	Gislene Pereira Gil	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 04 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
 (Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Anexo 3: Termo de consentimento livre e esclarecido - CAISM**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS****CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA – CBMEG****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Título do projeto:** ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO EM PLACENTAS DE MULHERES PORTADORAS DE DOENÇA FALCIFORME**Pesquisadora responsável:** Gislene Pereira Gil

Telefone para contato: (19) 3521-1147 ou (19) 99409-4999

A senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa como voluntária. Está sendo convidada por possuir uma das doenças que pretendemos estudar (Doença falciforme e/ou pré-eclâmpsia) ou por não ter nenhuma complicação (grupo saudável). Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O objetivo do projeto é avaliar o padrão de metilação do DNA em tecido de placenta e também em sangue periférico de pacientes com anemia falciforme e/ou pré-eclâmpsia e comparar com pacientes saudáveis (pacientes sem complicações). Isto porque gestantes com essas doenças apresentam muitas complicações durante a gravidez e a partir desta avaliação este estudo poderá contribuir com um conhecimento mais aprofundado sobre a gravidez de gestantes com essas doenças, possibilitando o desenvolvimento de futuras ferramentas para melhor tratamento destas pacientes.

PROCEDIMENTOS E RISCOS

Para participar do estudo será necessária sua permissão para as coletas de amostra de sangue periférico (10 ml) antes do parto e amostras da placenta. A finalidade da coleta de sangue periférico será para avaliar se a possível diferença de metilação encontrada em amostras de placenta é também observada no DNA do sangue periférico. A coleta de sangue para a realização de exames laboratoriais faz parte da rotina de um paciente com doença falciforme ou pré-eclâmpsia e a amostra de sangue a ser utilizada neste projeto será coletada neste mesmo momento, não sendo necessárias novas intervenções. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e habilitado para realizar esse procedimento.

A coleta de placenta será realizada após o parto e posteriormente a placenta será descartada. Não há nenhum procedimento na placenta durante a gestação, somente após o parto, não oferecendo riscos a pacientes e nem ao feto. Hospitalização não será necessária. O material biológico coletado para esse estudo será descartado ao final desta pesquisa. Serão coletados dados de prontuário tais como: idade da gestante, via de parto, idade gestacional (com quantas semanas foi realizado o parto), peso do recém-nascido e tamanho do recém-nascido. Em caso de dano decorrente da pesquisa, está garantida a assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário. Você também tem direito a indenização em caso de danos.

SIGILO

Os resultados dos exames genéticos não serão fornecidos a terceiros (como, por exemplo: seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, entre outros) e também não estarão disponíveis no prontuário do CAISM. Os resultados serão obtidos em números que significa a quantidade de metilação que aquela região do genoma apresenta e se esta quantidade esta ou não diferente de gestantes sem doença falciforme ou pré-eclâmpsia. Se os resultados ou informações fornecidas resultarem em publicação científica, nenhum nome será utilizado. Somente o responsável desta pesquisa terá acesso aos dados genéticos. Não haverá qualquer referência aos identificadores das amostras, (exemplo de identificadores: nome, filiação, endereço, número de registro hospitalar), mas poderão ser

incluídas informações relevantes para a interpretação dos dados da pesquisa, tais como: sexo, idade, país e região de procedência, diagnóstico e outras informações clínicas.

RESSARCIMENTO

Os procedimentos serão realizados durante as consultas de rotina do paciente ao CAISM/UNICAMP. Você não receberá qualquer valor em dinheiro. Logo, como não há gastos, não haverá ressarcimento.

BENEFÍCIOS

Você não obterá nenhum benefício direto com a colaboração nesse estudo, seu tratamento provavelmente não será modificado. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer benefícios para outros indivíduos com doença falciforme ou pré-eclâmpsia, possibilitando melhor diagnóstico e tratamento adequado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL

Se assim desejar, você pode pedir informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A aluna Gislene Pereira Gil (tel: 019 3521-1135) estará disponível para responder às questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações sobre os aspectos éticos você pode contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa, tel. (19) 3521-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO

A participação é voluntária, você pode se recusar a participar ou retirar seu consentimento e interromper a participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue periférico e placenta) sem comprometer os cuidados médicos que recebe atualmente ou receberá no futuro no HC-UNICAMP ou CAISM/UNICAMP. A aluna Gislene Pereira Gil poderá interromper sua participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado, como quando houver fatores de exclusão que sejam descobertos durante a pesquisa, por exemplo, através da análise dos prontuários.

Você leu e compreendeu esse termo de consentimento e está de pleno acordo em participar desse estudo. Logo, informa que:

RESULTADOS DOS EXAMES REALIZADOS

() Deseja ser informado (a) sobre o resultado de meus exames.

() **NÃO** deseja ser informado (a) sobre o resultado de meus exames.

COLETA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS (Prontuários)

() Autoriza a utilização dos dados de seus prontuários.

() **NÃO** autoriza a utilização dos dados de seus prontuários.

Nome do (a) participante ou responsável

Assinatura do (a) participante ou responsável

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Assinatura do (a) pesquisador

Data

Anexo 4: Termo de consentimento livre e esclarecido – Maternidade de Campinas**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS****CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA – CBMEG****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do projeto: ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO EM PLACENTAS DE MULHERES PORTADORAS DE DOENÇA FALCIFORME.

Pesquisadora principal: Gislene Pereira Gil (tel: 019 3521-1135)

Número do CAAE: 79730817.7.0000.5404

OBJETIVO DA PESQUISA:

Avaliar o padrão de metilação do DNA em tecido de placenta de gestantes com anemia falciforme e/ou pré-eclâmpsia e comparar com gestantes saudáveis (sem complicações). Pacientes que apresentam essas doenças são acometidas por várias complicações durante a gestação e os mecanismos que desencadeiam essas complicações ainda não são bem elucidados, por isso o presente estudo ajudará com conhecimento mais aprofundado sobre a gravidez de gestantes com essas doenças, possibilitando o desenvolvimento de futuras ferramentas para melhor tratamento destas gestantes.

Este documento, denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias que deverão ser assinadas ao final pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), sendo que uma via deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:

Este estudo propõe avaliar o padrão de metilação do DNA em tecido de placenta de pacientes com e sem doença falciforme e/ou pré-eclâmpsia. Será realizado um estudo

exploratório para identificar modificações no DNA, do tipo metilação, que possam estar envolvidas no desenvolvimento de complicações durante a gestação de pacientes com essas doenças. Este estudo permitirá um melhor conhecimento sobre os processos biológicos envolvidos na gestação destas pacientes, o que possibilitará o desenvolvimento de futuras ferramentas para um melhor e mais adequado tratamento para essas gestantes.

PROCEDIMENTOS:

Estamos solicitando o seu consentimento para utilização das amostras de tecido de placenta coletado no projeto “Transcriptômica em placentas de pacientes portadoras de doença falciforme” (CAAE: 54665216.6.0000.5404) para ser utilizado neste projeto. Caso concorde com o consentimento, uma fração de sua amostra de placenta será utilizada neste projeto. Esclarecemos que, caso concorde em participar deste estudo, não haverá nova coleta de tecido de placenta ou necessidade de novos exames. Além disso, serão coletados dados de seu prontuário tais como: idade da gestante, via de parto, idade gestacional (com quantas semanas foi realizado o parto), peso do recém-nascido e tamanho do recém-nascido. No entanto, conforme consta no item SIGILO, estes dados não serão divulgados em nenhum momento. Esclarecendo que, as amostras de seu tecido de placenta são codificadas por números, em programa de computador, sendo o acesso protegido por senha.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma vez que não será realizada nova coleta de tecido de placenta ou qualquer outro procedimento, os riscos e desconforto decorrentes desta pesquisa são mínimos e compreendem aqueles relacionados à manutenção do sigilo e confidencialidade durante a coleta e uso dos dados (Itens II.22 e IV.3.b, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

SIGILO:

Você deve entender que toda informação médica que consta em seu prontuário médico será submetida aos regulamentos da Maternidade de Campinas, referentes ao sigilo da informação médica, excetuando-se os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, que não irão para o prontuário. Se os resultados ou informações fornecidas resultarem em publicação científica, nenhum nome será utilizado. Somente o responsável desta pesquisa terá acesso aos dados genéticos. Não haverá qualquer referência aos identificadores das amostras, (exemplo de identificadores: nome, filiação, endereço, número de registro hospitalar), mas poderão ser incluídas informações relevantes para a

interpretação dos dados de nível de metilação para determinados genes no contexto da pesquisa, tais como: sexo, idade, país e região de procedência, diagnóstico e outras informações clínicas pertinentes.

RESSARCIMENTO:

O consentimento para esta pesquisa será implementado em local acessível ao participante e ao pesquisador, ficando o pesquisador responsável por ressarcir gastos que o participante vier a ter no deslocamento. Garante-se a você, participante da pesquisa, o direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, direito previsto no Código Civil (Lei 10.406 de 2002).

BENEFÍCIOS:

Você não obterá nenhum benefício direto com a colaboração nesse estudo. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer benefícios para gestantes com doença falciforme ou com pré-eclâmpsia, possibilitando tratamento adequado. Eventualmente, achados secundários ou incidentais podem ser detectados durante o estudo. Nesse caso, você tem o direito de ter conhecimento desses resultados a qualquer momento, e de ter acesso ao aconselhamento genético quando aplicável.

CONTATO E FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a doutoranda Gislene Pereira Gil: Tel: (19) 3521-1135, e-mail: gicagil@gmail.com, endereço: Laboratório de Estudos em Genética Humana, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - Av Cândido Rondon, 400, Distrito de Barão Geraldo, Campinas- SP. CEP: 13083-875. É possível requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A doutoranda Gislene Pereira Gil estará disponível para responder possíveis dúvidas e preocupações.

Em caso de recurso, denúncias, dúvidas ou reclamações sobre os aspectos éticos da pesquisa, contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 8:30hs às 13:30 hs e das 13:00hs às 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

A participação é voluntária, você pode se recusar a participar ou retirar seu consentimento e interromper a participação no estudo a qualquer momento (incluindo a

retirada da amostra de tecido de placenta). A doutoranda Gislene Pereira Gil pode interromper sua participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado, como quando houver fatores de exclusão que sejam descobertos durante a pesquisa, por exemplo, através da análise dos prontuários. Você leu e compreendeu esse termo de consentimento e está de pleno acordo em participar desse estudo.

ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO EM BIORREPOSITÓRIO:

O fornecimento da sua assinatura neste termo de consentimento significa que você:

() Autoriza o armazenamento do material biológico e deseja ser consultado (a) para consentimento em caso de uso de sua amostra em outras pesquisas. O tempo de armazenamento em biorrepositório é de 10 anos.

() **NÃO** autoriza o armazenamento do material biológico, devendo o mesmo ser descartado após o encerramento de sua participação nessa pesquisa.

RESULTADOS DOS EXAMES REALIZADOS (Genéticos):

() Deseja ser informado (a) sobre o resultado de seus exames.

() **NÃO** deseja ser informado (a) sobre o resultado de seus exames.

COLETA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS (Prontuários):

O projeto prevê o uso de dados de prontuários médicos, portanto, com o consentimento em participar da pesquisa, você autoriza a utilização dos dados de seus prontuários.

DISPONIBILIZAÇÃO PÚBLICA DOS DADOS GENÔMICOS:

Com o avanço das pesquisas na área genômica, é hoje de grande importância compartilhar em bancos de dados públicos os resultados de alguns testes moleculares. No compartilhamento dos dados genômicos é sempre assegurado que não haverá qualquer referência aos identificadores das amostras, (exemplo de identificadores: nome, filiação, endereço, número de registro hospitalar), mas poderão ser incluídas informações relevantes para a interpretação dos dados genômicos no contexto das pesquisas, tais como: sexo, idade, país e região de procedência, diagnóstico e outras informações clínicas pertinentes.

() Autoriza que os resultados dos testes genômicos realizados no âmbito deste projeto de pesquisa sejam disponibilizados em bancos de dados públicos que poderão ser consultados por pesquisadores da área médica, desde que esses dados não sejam vinculados com identificadores da amostra.

() **NÃO** autoriza a disponibilização dos resultados dos testes genéticos realizados neste projeto de pesquisa.

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP):

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do (a) participante ou responsável

Assinatura do (a) participante ou responsável

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Assinatura do (a) pesquisador (a)

Data

Anexo 5: Protocolo para coleta de placentas

Protocolo Coleta de Placentas

Objetivo: Realizar coleta sistemática de placenta para incorporação ao **BIOBANCO** institucional do CAISM.

Serão coletadas placentas previamente selecionadas, com TCLE BIOBANCO assinado. A placenta deverá ser mantida em geladeira até a coleta (a equipe da enfermagem será responsável pela identificação do material e armazenamento em geladeira, no expurgo do Centro Obstétrico). Conforme necessidade e orientação da equipe médica assistencial, a placenta poderá ser encaminhada para exame anátomo-patológico após coleta BIOBANCO (para tanto, deve ser colocada novamente em geladeira, com recado para que a Enfermagem realize o armazenamento em formaldeído).

A coleta para BIOBANCO é realizada em sala própria, equipada, dentro do centro obstétrico do CAISM.

Material necessário

- Luvas de procedimento, cuba rim ou bandeja de placenta, soro fisiológico estéril ou PBS 1x
- 6 cassetes(2 para MB, 1 para VC, 1 para MA, 1 para PC, 1 para Cordão umbilical)



- 10 criotubos(2 para MB, 2 para VC, 2 para MA, 2 para PC, 2 para o Cordão umbilical)



- 1 bisturi (ou tesoura pós esterilização- lembrando que é importante evitar a contaminação entre as diferentes áreas de coleta)



- 1 pinça estéril



- Papel filtro ou campo estéril para colocação da placenta no momento da coleta (sobre tábua acrílica)



- 1 frasco com formalina tamponada a 10%



- 1 galão de nitrogênio líquido (sempre verificar o volume de nitrogênio disponível antes de iniciar o procedimento)

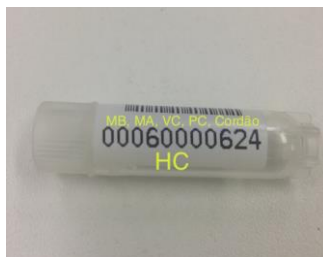


Preparação dos criotubos

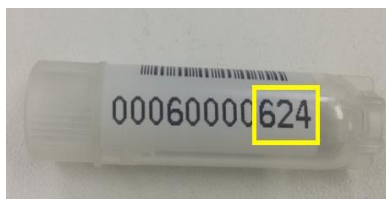
- Utilizar criotubos brancos. Cada criotubo deve ser identificado conforme a seguinte legenda, representando o material a ser coletado:

- MB – Membrana Basal
- MA – Membrana Amniótica
- PC – Placa Coriônica
- VC – Vilosidade Coriônica
- Cordão – Cordão Umbilical

- Além disso, cada criotubo deve ser identificado com o HC da paciente. Ambas as anotações devem ser feitas com letra legível, com caneta permanente ou lápis 2, abaixo do código de barras próprio do criotubo ou do código numeral impresso no criotubo.



- Realizadas as devidas identificações nos criotubos, deve-se anotar no caderno de registros os números que aparecem logo abaixo do código de barras seguido de qual tecido esse criotubo irá conter dentro dele, por exemplo:



MB/MA/VC/PC/cordão: 624

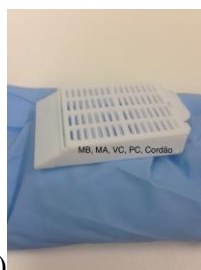
Observação: Para realizar a identificação dos criotubos deve-se utilizar luva de procedimentos, evitando qualquer contaminação.

Preparação dos cassetes

- Todos os cassetes devem ser identificados como placenta em sua face lateral direita. Cada cassete deve ser identificado em sua face lateral esquerda conforme a seguinte legenda:
- MB – Membrana Basal
- MA – Membrana Amniótica
- PC – Placa Coriônica
- VC – Vilosidade Coriônica
- Cordão – Cordão Umbilical



(Lado direito)



(Lado esquerdo)

- Além disso, cada cassete deve ser marcado na sua face anterior com o HC da paciente. Todas as marcações devem ser realizadas preferencialmente com lápis preto.



- Após colocar o tecido coletado no interior de cada cassete, deve ser adicionado logo acima deste material uma etiqueta de papel devidamente identificada, conforme legenda acima, e o HC da paciente.

Preparação da Bancada

- A bancada deve ser inicialmente higienizada; após a higienização da mesma, deve-se dispor a tábua acrílica e cobrir toda a sua extensão com papel-filtro. Devem ser separados a pinça e o bisturi, e os cassetes e criotubos previamente preparados devem ser dispostos à direita da tábua. Recomenda-se que os criotubos e cassetes já estejam abertos neste momento, facilitando o passo seguinte da coleta.

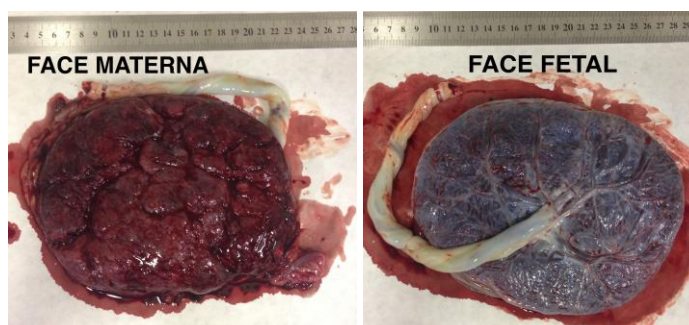
Preparação da Placenta

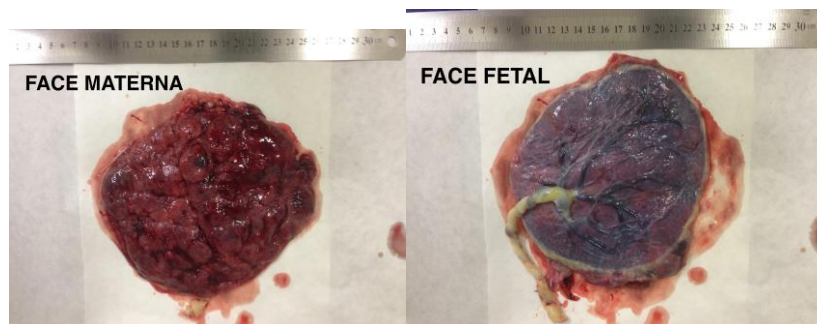
- O tempo máximo entre a coleta das amostras para o biobanco e o parto não pode ser superior a 12 horas. Neste intervalo, a placenta deverá ser armazenada em saco plástico (não-estéril) em geladeira comum, sem qualquer outro material (formol, soro fisiológico, etc).
- A placenta deve ser inicialmente lavada com soro fisiológico estéril ou PBS 1x na pia da bancada, no interior de uma cuba rim ou bandeja de placenta, buscando-se limpar resíduos sólidos ou coágulos visíveis.
- Em sequência, a placenta deve ser pesada na balança de precisão localizada no laboratório de coleta. O peso em gramas da placenta deve ser anotado no caderno de registros e na ficha de coleta de dados.



Registro fotográfico

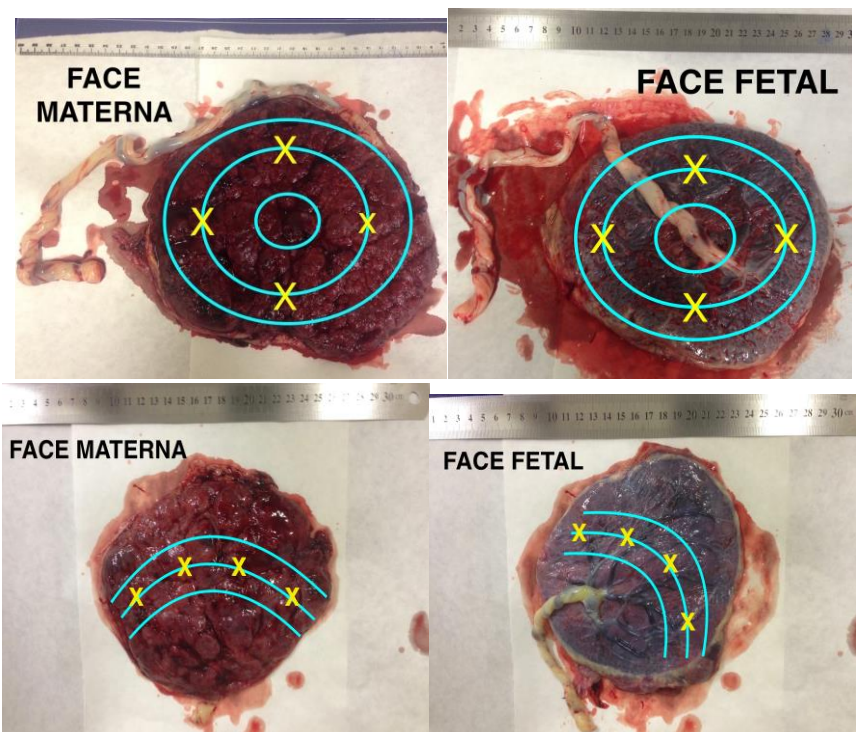
- Antes de se iniciar a coleta, devem ser realizados registros fotográficos da face materna e da face fetal da placenta. A face a ser fotografada deve ser totalmente descoberta de membranas e ser fotografada ao lado de régua. O arquivo fotográfico deve ser armazenado.





Coleta das amostras de tecido placentário

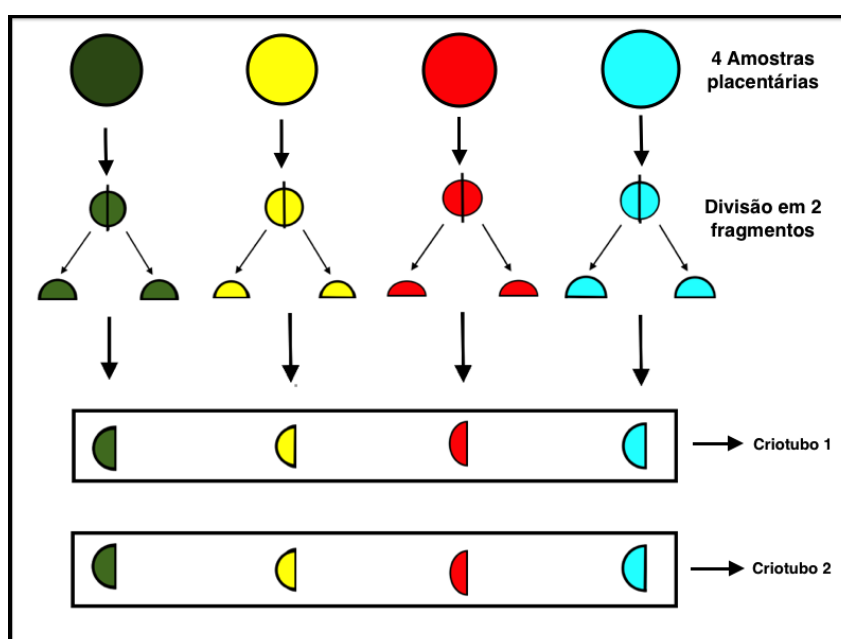
- A coleta das amostras de tecido placentário devem ser sistematizadas na seguinte ordem: membrana basal, vilosidade coriônica, membrana amniótica, placa coriônica e cordão umbilical. A escolha do local de coleta de cada um destes tecidos, para garantir representatividade, tem por base a inserção do cordão. Nas placentas cujo cordão se insere centralmente, deve-se imaginar três círculos concêntricos (um maior nas bordas placentárias, um menor marginal ao cordão e um terceiro intermediário) e os sítios de coleta serão localizados no círculo intermediário. Serão escolhidos quatro pontos no círculo intermediário, equidistantes entre si, evitando áreas de alteração macroscópica grosseira. Nas placentas cuja inserção do cordão seja periférica, deve-se imaginar 3 semi-círculos concêntricos partindo do cordão, e no círculo intermediário vão se realizar as coletas. As áreas onde vão se realizar as coletas não devem conter anomalias macroscópicas, como áreas de descolamento ou de calcificação extensa.



Membrana basal: corresponde à face materna da placenta. Nos pontos escolhidos para a coleta, deve-se realizar incisão com o bisturi com 0,5cm de profundidade, buscando-se evitar contaminação com vilosidades. A partir disso, obtém-se quatro amostras de aproximadamente 1x1 cm, sendo duas dessas amostras depositadas em um cassete e as outras duas num segundo

cassete, tendo ambos cassetes sido previamente identificados; deve-se atentar para o fato de posicionar a face mais externa (visivelmente mais brilhante), para baixo (garantindo que, no bloco, a primeira região a ser seccionada seja a MB). Na sequência, estes cassetes devem ser adequadamente fechados e armazenados no frasco com formalina.

- Em seguida, deve-se coletar mais um fragmento de cada local onde houve a coleta da amostra anterior, respeitando dimensões de aprox. 0,5x0,5cm. Após essa coleta, cada fragmento deve ser subdividido em duas amostras, obtendo-se assim, oito fragmentos, dois de cada local onde ocorreu a incisão. Essas amostras devem então serem divididas entre os dois criotubos referentes à membrana basal, ou seja, quatro fragmentos correspondentes a cada região para cada criotubo. Estes devem então serem fechados com suas respectivas tampas e colocados no galão de nitrogênio líquido.



- *Vilosidade coriônica*: corresponde ao tecido subjacente à membrana basal. Coletar nas mesmas regiões da coleta anterior, porém na camada mais inferior. Deve-se coletar um fragmento de 1x1 cm de cada região, desprezar o tecido mais superficial, que pode conter traços da membrana basal, dispô-los no cassete previamente identificado e em seguida armazená-lo no frasco com formalina. Sendo assim, os quatro fragmentos correspondentes a vilosidade coriônica serão armazenados num único cassete.

- Em seguida, deve-se coletar quatro fragmentos de aprox. 0,5x0,5cm nos locais onde já se previamente incisou a placenta para a coleta da membrana basal, na camada mais inferior, desprezando o tecido mais superficial. Tais fragmentos também devem ser divididos em duas amostras e tais amostras devem ser divididas entre os dois criotubos (de preferência separadamente, em paredes opostas do frasco) referentes às vilosidades coriônicas. Os criotubos devem ser então fechados com suas respectivas tampas e colocados no galão de nitrogênio líquido.

- *Membrana amniótica*: corresponde à membrana fina e transparente que reveste o útero. É um tecido frágil e de fácil obtenção. Deve-se coletar quatro fragmentos de 0,5x0,5 cm, dispô-los no cassete previamente identificado e em seguida armazená-los no frasco com formalina.

- Em seguida, devem-se coletar quatro fragmentos de aprox. 0,5x0,5 cm, em cada local previamente determinado. Tais fragmentos também devem ser divididos em duas amostras e tais amostras devem ser divididas entre os dois criotubos referentes à membrana amniótica. Os criotubos devem ser então fechados com suas respectivas tampas e colocados no galão de nitrogênio líquido.

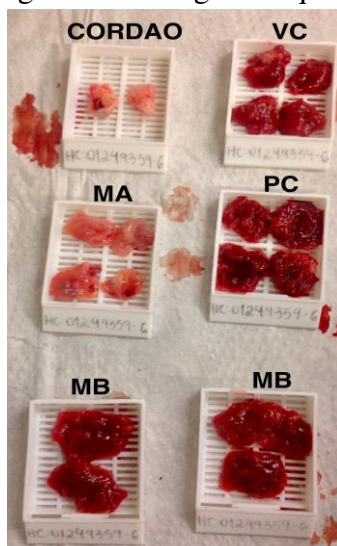
- *Placa coriônica*: corresponde à face fetal da placenta. Para a aquisição deste tecido, as amostras devem ser coletadas também conforme o esquema dos círculos previamente apresentado. Devem-se evitar vasos sanguíneos calibrosos que estejam visíveis, privilegiando áreas livres. Deve-se coletar um fragmento de 1x1 cm das quatro regiões previamente selecionadas; para essa amostra em especial, é preciso dissecar a membrana e coletar o tecido abaixo, com cerca de 0,5 cm de espessura, dispô-lo no cassete previamente identificado e em seguida armazená-lo no frasco com formalina. Neste caso, também num mesmo cassete deve ser colocado os quatro fragmentos.

- Em seguida, devem-se coletar quatro fragmentos de aprox. 0,5x0,5 cm, em cada extremidade do círculo intermediário. Tais fragmentos também devem ser divididos em duas amostras e tais amostras devem ser divididas entre os dois criotubos referentes às placas coriônicas. Os criotubos devem ser então fechados com suas respectivas tampas e colocados no galão de nitrogênio líquido.

- *Cordão umbilical*: a finalização da coleta ocorre com o cordão umbilical. Deve-se escolher um fragmento do mesmo, no sentido transversal de aprox. 0,5x0,5cm, o qual será colocado no cassete e armazenado na formalina.



- Dois outros fragmentos de 0,5x0,5cm devem ser obtidos e seccionados em duas amostras, para serem armazenados nos dois criotubos, que devem ser então fechados com suas respectivas tampas e colocados no galão de nitrogênio líquido.



Armazenamento das amostras

- As amostras, após obtidas, devem ser rapidamente armazenadas no frasco com formalina tamponada ou no galão de nitrogênio líquido. A formalina tamponada é cáustica e devem ser usadas luvas para evitar contato acidental. O nitrogênio líquido está em extrema-baixa temperatura (aprox. -80°C), e o contato acidental com o mesmo pode causar queimaduras graves na pele. Ambos os recipientes devem permanecer fechados, abrindo-os apenas quando se for realizar o depósito das amostras.

Estimativa do volume placentário

A medida do volume da placenta é a última etapa do processo de coleta do material biológico; para isso, preenche-se um recipiente com água até a iminência de transbordar. Em seguida, coloca-se esse recipiente já com a água num outro recipiente, que seja maior que aquele. Após essa sequência, adiciona-se a placenta com cuidado ao recipiente com água, de modo que apenas o volume que a placenta ocupe no local seja deslocado. Coleta-se então esse volume de líquido deslocado, que corresponderá ao volume da placenta, medindo-se com um frasco. Abaixo há uma foto ilustrativa do material utilizado para realizar esse procedimento.

**Limpeza e descarte do material utilizado**

Após terminado todo o processo, a placenta deverá ser colocada num saco plástico com formol e enviada para análise histopatológica. O papel filtro e as luvas utilizadas durante a sessão devem ser desprezadas como lixo infectante. Quanto ao bisturi e a pinça estéril, estes deverão ser colocados no lixo de materiais infectantes, o mesmo da foto ilustrativa logo abaixo.



Anexo 6: Artigo submetido para análise

Epigenetics

Epigenetic analysis in placentas from Sickle Cell Disease patients reveals a hypermethylation profile.

—Manuscript Draft—

Manuscript Number:	
Full Title:	Epigenetic analysis in placentas from Sickle Cell Disease patients reveals a hypermethylation profile.
Article Type:	Research Article
Manuscript Classifications:	DNA Methylation; In Utero Development
Abstract:	Pregnancy in SCD women is accompanied by an increased incidence of pain episodes, infections and several systemic complications. SCD placenta shows several abnormalities and dysfunction, which may lead to placental insufficiency, favoring adverse fetal outcome. These placental abnormalities are well known and reported, however little is known about the molecular mechanisms, such as epigenetics mechanisms. Thus, our aim was to evaluate the DNA methylation profile in placentas from women with SCD (HbSS and HbSC genotypes), compared to uncomplicated controls (HbAA). We included in this study 11 pregnant women with HbSS, 11 with HbSC and 21 with HbAA genotypes. Illumina Methylation EPIC BeadChip was used to assess the whole placental DNA methylation. Pyrosequencing was used for array data validation and qRT-PCR was applied for gene expression analysis. Our results showed high frequency of hypermethylated CpGs sites in both HbSS and HbSC groups with 73.5% and 76.2% respectively. Differentially methylation regions (DMRs) also showed increased hypermethylation status with 89.5% and 85.8% for the HbSS and HbSC groups, respectively. From the selected DMRs for validation (HbSS=4 and HbSC=3) three were validated in the HbSS group, and none in the HbSC group. The gene expression analysis showed differential expression for the PTGFR (-2.97-fold) and GPR56 (3.0-fold) genes in the HbSS group, and for the SPOCK1 (-2.40-fold) and ADCY4 (1.80-fold) genes in the HbSC group. Taken together, these data strongly suggest that SCD (HbSS and HbSC genotypes) can alter placental DNA methylation, leading to gene expression changes, which possibly contribute to improper placental development.
Author Comments:	
Order of Authors Secondary Information:	

Title: Epigenetic analysis in placentas from Sickle Cell Disease patients reveals a hypermethylation profile.

Gil, G.P.¹., Ananina, G.¹., Maschietto, M.²., Soares Lima, S.C.³., Costa, S.M.S.¹., Baptista, L.C.¹., Costa, F.F.⁴., Costa, M.L.⁵., Melo, M.B.¹.

1-Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), University of Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

2- Boldrini Children's Center, Campinas, São Paulo, Brazil

3- National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

4-Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

5-Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Journal: Epigenetics

Abstract:

Pregnancy in SCD women is accompanied by an increased incidence of pain episodes, infections and several systemic complications. SCD placenta shows several abnormalities and dysfunction, which may lead to placental insufficiency, favoring adverse fetal outcome. These placental abnormalities are well known and reported, however little is known about the molecular mechanisms, such as epigenetics mechanisms. Thus, our aim was to evaluate the DNA methylation profile in placentas from women with SCD (HbSS and HbSC genotypes), compared to uncomplicated controls (HbAA). We included in this study 11 pregnant women with HbSS, 11 with HbSC and 21 with HbAA genotypes. Illumina Methylation EPIC BeadChip was used to assess the whole placental DNA methylation. Pyrosequencing was used for array data validation and qRT-PCR was applied for gene expression analysis. Our results showed high frequency of hypermethylated CpGs sites in both HbSS and HbSC groups with 73.5% and 76.2% respectively. Differentially methylation regions (DMRs) also showed increased hypermethylation status with 89% and 86% for the HbSS and HbSC groups, respectively. From the selected DMRs for validation (HbSS=4 and HbSC=3) three were validated in the HbSS group, and none in the HbSC group. The gene expression analysis showed differential expression for the *PTGFR* (-2.97-fold) and *GPR56* (3.0-fold) genes in the HbSS group, and for the *SPOCK1* (-2.40-fold) and *ADCY4* (1.80-fold) genes in the HbSC group. Taken together, these data strongly suggest that SCD (HbSS and HbSC genotypes) can alter placental DNA methylation, leading to gene expression changes, which possibly contribute to improper placental development.

Keywords: Epigenetics; DNA methylation; placenta; Sickle Cell Disease; pregnancy; hypermethylation; Illumina methylation EPIC

Introduction

Sickle cell disease (SCD) comprehends a group of inherited disorders, characterized by the presence of hemoglobin S (HbS). HbS can be in the homozygous state (called sickle cell anemia - SCA) or associated with other structural or synthesis variants of hemoglobin, generating a diversity of genotypes corresponding to the SCD group. The HbS is a consequence of a single nucleotide substitution at codon 7 of the beta globin gene (*HBB*), which replaces the glutamic acid to the valine amino acid (141). Under low oxygen concentration the HbS can polymerize and cause alteration in the shape and physical properties of erythrocytes, which leads to hemolysis and increased adhesion to erythrocytes, leukocytes, endothelial cells, coagulation factors, platelets and other plasma proteins (9). The complex molecular interaction with sickled erythrocytes can lead to vaso-occlusive events that are the trademark of SCD. The vaso-occlusive events occur mainly in small (and some large) vessels, resulting in potentially adverse consequences in different organs (13,142).

SCD is therefore characterized by complex multisystemic complications that can evolve to chronic organ damage. Pregnancy in SCD women presents increased risk of mortality and morbidity to the mother and to the baby, particularly due the aggravated SCD conditions in these pregnant women (143). In recent years, advances in perinatal care, neonatal screening techniques and preventive measures have reduced maternal and perinatal mortality. Nevertheless pregnant women with SCD still have high rates of adverse maternal and perinatal outcomes compared to the baseline population (37,144). Complications in pregnant women with SCD include susceptibility to pain crises, sepsis, urinary tract infections, acute chest syndrome, worsening anemia and also increased risk of preeclampsia and eclampsia. Fetal/infants risks include fetal growth restriction (FGR), stillbirth, abortion, small for gestational age newborns and prematurity, possibly related to placental dysfunction owing to the recurrent placental sickle cell events and inflammatory vasculopathy (145,146).

The placenta is a key organ to guarantee gestational maintenance and appropriate fetal development. Studies showed that placentas from pregnant women with SCD have morphological abnormalities, such as increased intravillous fibrin deposit, villous sclerosis, maternal hemoglobin sickling, as well as abnormalities in size, adherence to the uterine wall and localization, suggesting increased risk of uteroplacental insufficiency that could possibly explain the adverse fetal outcomes (147–149). The morphological SCD placental abnormalities are well reported, however there is lack of information on how the molecular

mechanisms, such as epigenetics mechanisms, could affect placental function in SCD pregnancies.

Recent studies have shown that epigenetic mechanisms (heritable control of gene expression not related to DNA sequence), specifically DNA methylation, can be altered in placental tissue by the presence of maternal pathology. These studies revealed that pregnant women with diabetes mellitus and obesity had significant DNA methylation alterations in the placenta, compared to the placenta of healthy pregnant women (96,98). Furthermore, a study of placentas from pregnant smokers showed alterations in DNA methylation and these were also associated with decreases in birthweight, suggesting that maternal condition may cause epigenetic modifications in the placenta, leading to adverse fetal outcomes (97). Considering that there are currently no reports on DNA methylation in SCD placentas, this study aimed to evaluate the DNA methylation profile of placentas of pregnant women with SCD (HbSS and HbSC genotypes), compared to uncomplicated controls (HbAA), considering maternal and perinatal outcomes.

Materials and Methods

Study participants

The ethics committees of the centers involved in the research approved this study and all the patients signed an informed consent form prior to sample collection. Pregnant women were selected from the high-risk outpatient clinic and maternity of the University of Campinas (UNICAMP) and also from Campinas Maternity. For this case-control study, we included 22 pregnant women with SCD (HbSS=11 and HbSC=11) and 21 pregnant women with non-complicated gestation, named control pregnancies (HbAA=21). Data on maternal and perinatal outcomes were retrieved from careful medical chart review. Diagnosis of HbSS, HbSC and HbAA was performed by clinical and laboratory data, family analysis, Hb electrophoresis and sequencing when necessary at the institution's clinical laboratory. All women groups presented delivery by cesarean section. The control group was composed by uncomplicated pregnant women admitted to birth in the same maternities. Women with a diagnosis of hypertension, diabetes, proteinuria and fetal abnormalities, or history of infections, drug use and smoking, were excluded of the control group.

Placental tissue collection

The placental tissue was collected within 3h after childbirth. Previously to sample collection, the placentas were weighed and then washed with phosphate saline solution to

withdraw the remaining maternal blood. Biopsies of the four areas from the villous tissue (≈ 200 mg) close to the umbilical cord were obtained, as previously described (99). After collection, the samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until DNA and RNA extractions.

DNA extraction and bisulfite conversion

Genomic DNA was extracted from approximately 25 mg of placental tissue using the *QIAamp DNA Mini* kit (Qiagen, Hamburg, Germany). DNA purity and quantity were evaluated using NanoDrop (Thermo Fisher, CA, USA) and Qubit (Life Technologies, CA, USA) equipments, respectively. The integrity of DNA samples was assessed through the electrophoresis of 2-5 μL of each sample on 1% agarose gel. For bisulfite conversion, 500 ng of DNA were treated using the EZ DNA Methylation kit (Zymo Research, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. All bisulfite-converted DNA samples were stored immediately at -20°C until use.

DNA methylation analysis

DNA methylation assays were performed using the Illumina Human Methylation 850K BeadChip microarrays (HM850K) (Illumina, CA, USA). Bisulfite-converted DNA of eight HbSS, eight HbSC and seven control samples were hybridized in the HM850K, according to the Illumina Infinium HD methylation protocol (<https://support.illumina.com>). The HM850K platform assesses the DNA methylation level of 853,307 *loci* around the genome at single-nucleotide resolution. Chips were scanned by Illumina iScan SQ scanner (Illumina, CA, USA) and the fluorescence signals were interpreted with the Bioconductor packages in R environment (v.3.4.4). Annotation of probes was performed from the Illumina files using UCSC version hg19 of the human reference genome. The methylation levels were obtained for each CpG site as beta-values that range from 0 to 1, which is related to the percentage of methylation, from 0 to 100%. Then, the dataset was analyzed using the *minfi* package (104). For quality control, probes with detection p-value > 0.05 were removed from the dataset. The probes on the HM850K have two different chemistry designs, type I and II, which need to be normalized to make them comparable to each other. This normalization was done using the *FunNorm* method, which adjusts intensities based on a quantile approach (111). Adjustments for batch effects were performed using the *ComBat* function implemented in the *ChAMP* package. Probes located on the X and Y chromosomes were removed. In addition, probes associated with known SNPs and those located in no-CpG sites (no-CpG

control probes) were also removed from downstream analysis (150), resulting in a total of 735,716 probes for each of the 23 samples (8 HbSS, 8 HbSC and 7 controls). The SVA package was performed to infer surrogate variables through patient's characteristics (along with the known variables: group's genotype, gestational age and fetal sex); that package estimates and removes unwanted sources of variation in dataset.

Differential methylation analysis

We followed the guidance of Du et al. (2010) and imposed a 0.15 minimum threshold for the difference between mean beta-values of the compared groups. Thus, only probes with absolute difference between groups above 0.15 were taken into account for the downstream analyses. The β -values were log-transformed into M-value, since the M-values present higher homoscedasticity, generating data more homogeneous and less dispersed in the extremes compared to β -values (108). After that, the comparison analyses between groups were performed using an empirical Bayesian framework linear model from *limma* package (106). Besides the phenotype, we used gestational age and fetal sex as confounding variables in our models. The Benjamini-Hochberg's method was applied and the CpGs sites with adjusted p-values (adjP) < 0.05 were considered differentially methylated. The analyses were performed comparing the HbSS and HbSC group versus control group independently, thus the DMPs were obtained for both comparisons. SVA package was used, however we did not obtain any significant probes; for that reason we chose not to apply this correction. The *DMRcate* package (114) was also used to identify the differentially methylated regions (DMRs), based on groups of probes that presented the same differentially methylated status (p-value < 0.05), where the next consecutive probe was within 1,500 nucleotides. DMRs with adjP < 0.05 were considered significant. The genes identified in the significant DMRs were submitted to functional enrichment analyses (Biological Processes from Gene Ontology) using WebGestalt, which analyzes against the human reference genome, applying a Benjamini-Hochberg multiple-test adjustment threshold of p < 0.05 (115). To facilitate biological interpretation, the M-values were converted again to β -values.

Bisulfite pyrosequencing

Pyrosequencing is a quantitative method that measures the DNA methylation levels (in %) for each CpG site in a specific genome region. Thus, this method was used to technical validation of the differentially methylated loci identified by HM850k array. The DNA samples assessed by HM850K were also used in validation experiments with three additional

samples per group (HbSS=11; HbSC=11; control group=10). Four DMRs were assessed for methylation validation in the HbSS group (*PTGFR*, *GPR56*, *GALR2* and *ADCY4*) and three in the HbSC group (*SPOCK1*, *THSD7A* and *ADCY4*), and compared to the control group (Table 1). The DMRs were chosen according to their location: 1) at promoter region; 2) at genes identified in significant biological processes; 3) at relevant genes to the placental development (migration, adhesion or proliferation processes). For each DMR, one CpG site was evaluated for methylation level. Firstly, PCR was performed using 50 ng of bisulfite-converted DNA in a final volume of 50 μ L, using specific primers (Table 2), which were constructed by the software PiroMark (Qiagen, Hamburg, Germany). Next, 40 μ L of the amplified product was used for pyrosequencing using PyroMark Gold Q96 Reagents kit and the PyroMark Q96 pyrosequencer (Qiagen, Hamburg, Germany), following the manufacturer's recommendations. Pyrosequencing was performed for each region in duplicate and the mean of these duplicates was calculated and used for case and control group comparison. Furthermore, correlation analysis was performed between array and pyrosequencing data using Pearson method in normal data and Spearman method in no-normal data.

Table 1. Selected DMRs for methylation validation. In bold are the probes (CpGs sites) submitted to methylation analysis by pyrosequencing.

Study group	DMRs - coordinates	Δ - β (methylation status)	length (pb)	Probes	CpG location (gene)	CpG location (CpG Island)	Gene	Adjusted p-value
HbSS	chr1:789565 76-78956905	0.2 (hypermethylation)	330	cg03842686	TSS200	Island	<i>PTGFR</i>	<0.001
				cg20092458	TSS200	Island		
				cg03949391	1stExon	Island		
				cg27046936	1stExon	Island		
	chr16:57662 541- 57662690	0.115 (hypermethylation)	150	cg03495868	1stExon	Island	<i>GPR56</i>	0.007
				cg03989617	1stExon	OpenSea		
				cg09730500	1stExon	OpenSea		
				cg10854758	TSS1500	S_Shore		
HbSC	chr17:74070 375- 74070698	0.192 (hypermethylation)	324	cg27494087	TSS1500	Island	<i>GALR2</i>	<0.001
				cg16898239	TSS1500	Island		
				cg07274618	TSS200	Island		
	chr5:136834 383- 136834464	0.165 (hypermethylation)	82	cg20897685	5'UTR	Island	<i>SPOCK1</i>	0.0101
				cg24847829	5'UTR	Island		

				cg26616283	1stExon	OpenSea		
				cg26748945	1stExon	OpenSea		
	chr7:118715 35-11872050	0.186 (hypermethylation)	516	cg12348203	TSS200	OpenSea	<i>THSD7A</i>	<0.001
				cg17230649	TSS200	OpenSea		
				cg24676244	TSS1500	OpenSea		
HbSS				cg07485357	Body	Island		
		0.171 (hypermethylation)		cg23179456	TSS200	Island		<0.001
	chr14:24803 679- 24804339		661	cg13631572	TSS200	Island	<i>ADCY4</i> [#]	
HbSC		0.158 (hypermethylation)		cg25556905	TSS200	Island		0.0103
				cg14287235	TSS1500	Island		

Δ - β : methylation difference between cases (HbSS or HbSC) and controls, # analyzed in HbSS and HbSS groups.

Table 2. Primer sequences used for pyrosequencing analysis.

Gene	CpG (Probe ID)	Primers sequences (5'- 3')	Annealing (°C)	Length (bp)
<i>PTGFR</i>	cg03949391	F: TAGTTAGGTGTAGAGGGATTTTAGGA R:[btn]CAACCTCTAAAAAATAATACCTTATCAT Seq: GGTGGAATTTGAGGTAG	56 -	250
<i>GPR56</i>	cg03989617	F: [btn] AGGAGAGGGGTGTTTTTTTATTAA R: CACCTACTATCCAACCCTTATT Seq: CAAAACAAAACAAACAATAAT	58 -	249
<i>GALR2</i>	cg07274618	F: TAGGGGTTTTTTTTTTGAGGGTATTTT R: [btn]AAAAAAACCTTACCTCATCTAAAAC Seq: GGAAGTAGGTATAAG	60 -	408
<i>SPOCK1</i>	cg24847829	F: [btn]AGTTATTGGTTATTGTTTAGGAAATT R: CAAAAAAAACCTTTCCCTTAACCTAT Seq: AATCCCCTATAATTAAAC	56 -	620
<i>THSD7A</i>	cg24676244	F: AAGGAGTAGAGGGGGTTGG R: [btn]CTCAAATACTACTCCCCACACAA Seq: GGAGAGGGGTTAGTT	60 -	359
<i>ADCY4</i>	cg23179456	F: [btn]AGTAGATTTAGAAAGGGTAGAGTG R: CCAAATCCTACCCTCCTAAC Seq: ACCCTAACCAACC	59 -	624

F: forward sequence, R: reverse sequence, Seq: sequence used in the pyrosequencing reaction, btn: sequence with biotone marking, bp: base pairs

Gene expression analysis

RNA extraction and cDNA synthesis: From the DMRs assessed by bisulfite pyrosequencing, the associated genes were identified and submitted to gene expression evaluation. This analysis was performed for the HbSS group (n=11), HbSC group (n=11) and control group (with 11 additional samples, n=21). The total RNA from the placental tissue (chorionic villous) was extracted using TRIzol Reagent (Life Technologies, MD, EUA), and RNeasy mini kit (Qiagen, Hamburg, Germany) following the manufacturer's protocol. The concentration and purity of the total RNA were assessed using the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, CA, EUA). RNA samples were stored at -80°C until use. Subsequently, about 1 µg of RNA was treated with DNase I (Life Technologies, CA, USA) and then cDNA was synthesized using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. The cDNA was stored at -20 °C until use.

Real time PCR: Quantitative PCR was performed in a 12 µl reaction final volume containing 3 µl of cDNA (10 ng), 6 µl SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) and 6 µl of specific primers. The summary of the primer sequences used for the qPCR are shown in table 3. The qPCR reaction was carried out in duplicate using ABI StepOnePlus Real Time PCR (Applied Biosystem, CA, USA) and the cycling steps included: 95 °C for 10 min, 95 °C for 15 s (40 cycles) and 60 °C for 1 min (40 cycles). The standard equation ($2^{-\Delta Ct}$) was used to calculate the relative changes in gene expression, as reported by Livak (151). The data were normalized by the reference genes *ACTB* and *GAPDH* and then converted to fold changes.

Table 3. Primer sequences used for Real Time PCR analysis.

Gene	Primers sequence (5'-3')	Length (bp)	Primer concentration
<i>PTGFR</i>	F: GATGACAAGATGTCTGGACTGC R: CAGGAGACACTAGCTGTTTGGA	118	150 nM
<i>GPR56</i>	F: TGCTGATGGTCTCCTCGGTG R: CAATGGTGACAAGGCAGGCC	108	70 nM
<i>GALR2</i>	F: GCACTTCCTCATCTTCCTCACC R: CAGATACCTGTCCAGGGAGACG	73	150 nM
<i>SPOCK1</i>	F: TGCTGTGAGCTGTGAAGAGGAG R: CTTTGTCCCTTTGGTCCCAGCTC	113	70 nM
<i>THSD7A</i>	F: TCATGTTATGATGGACAGTGCTAT R: CATTATACCATCTGACCTTTGAC	100	150 nM
<i>ADCY4</i>	F: CCCAACATCATCAGACTGCCCT R: CAGCAGTGCATGGAGTATGGGA	120	100 nM

<i>BAC</i>	F: TGACCCAGATCATGTTTGAGACC R: CAGAGGCGTACAGGGATAGCA	81	150 nM
<i>GAPDH</i>	F: AAGATCATCAGCAATGCCTCCT R: GGTCATGAGTCCTTCCACGATAC	96	150 nM

F: forward sequence, R: reverse sequence, bp: base pairs, nM: nano Molar

Statistical analysis

Statistical analysis from bisulfite pyrosequencing and gene expression data were performed using GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad Software, CA, USA). The Mann-Whitney *U* test was used for no-normal distribution data and the Student's unpaired *t* test was used for normal distribution data. The statistical methods were applied for the case group compared to the control group (HbSS versus HbAA and HbSC versus HbAA) and *p* value <0.05 was considered to be statistically significant. Linear correlation was used to analyze the correlation between DNA methylation at specific CpG sites and gene expression data. For this analysis, the normal data was submitted to Pearson method and the out-normality data was submitted to Spearman method.

Results

Clinical characteristics

Clinical characteristics of mothers and offspring are shown in table 4. This study included 11 pregnant women with HbSS, 11 pregnant women with HbSC and 21 healthy pregnant women without complications during pregnancy (HbAA - control group). The HbSS and HbSC genotypes were compared separately with the HbAA genotype. The comparison between case and control groups showed clinical characteristics (gestational age, body mass index, birth height, birth weight and placental weight) statistically different for HbSS and HbSC groups. Among the groups analyzed, pregnant women with HbSS had lower gestational age (36.44 ± 1.77 weeks, $p < 0.0001$), lower body mass index (22.3 ± 3.1 , $p = 0.0125$), lower birth height (44.95 ± 3.67 grams, $p = 0.0005$), lower birth weight (2397 ± 457.85 grams, $p < 0.0001$) and lower placental weight (425.27 ± 88.38 grams, $p < 0.0001$). Furthermore, the HbSS group presented higher frequency of sickle-related complications during pregnancy than the HbSC group, which included: vaso-occlusive crises (81.8 vs. 63.6%), acute chest syndrome (18.2 vs. 9.1%), prematurity (54.5 vs. 36.4%), FGR (18.2 vs. 0%), perinatal mortality (9.1 vs. 0%) and infection during pregnancy (54.5 vs. 18.2%). In order to reduce adverse maternal and fetal outcomes, programmed blood transfusion has been applied in our institution (52). Thus, prophylactic blood transfusions were performed in 10 pregnant women

with HbSS and in 8 pregnant women with HbSC. Four women (HbSS: 1 and HbSC 3) did not receive prophylactic transfusions for different reasons. In the HbSS patient, preterm birth occurred at 28 weeks, before the start of the scheduled transfusion, and neonatal death occurred shortly after that birth. The other three HbSC patients had difficulty to adhere to the transfusion treatment, due to personal issues.

Table 4. Clinical characteristics, maternal and perinatal outcomes among cases (HbSS and HbSC) and controls.

Characteristics	Control group n (%)	HbSS group n (%) ^a	HbSC group n (%) ^a
Total pregnancies (n)	21	11	11
Maternal age (years) mean $\pm$ SD	28.57 $\pm$ 3.49	26.81 $\pm$ 4.56	25.27 $\pm$ 7.02
Pre-pregnancy BMI (kg/m²)	26.5 $\pm$ 3.1	22.3 $\pm$ 3.1* ^b	22.4 $\pm$ 2.0** ^b
Maternal weight gain during gestation	12.3 $\pm$ 5	7.7 $\pm$ 3.3	8.5 $\pm$ 2.1
Nulliparous (n)	6 (29.6)	6 (54.5)	7 (63.6)
Gestational age at birth (weeks) mean $\pm$ SD	39.82 $\pm$ 0.74	36.44 $\pm$ 1.77*** ^b	36.68 $\pm$ 3.94*** ^b
Preterm birth (< 37 weeks)	-	5 (54.5)	4 (36.4)
Preterm birth (< 34 weeks)	-	1 (9.1)	1 (9.1)
Route of delivery (n)			
Cesarean section	21 (100)	11 (100)	11 (100)
Labor delivery	5 (23.8)	3 (27.3)	4 (36.4)
Pre-eclampsia	-	0	1 (9.1)
Birth height (cm) mean $\pm$ SD	49.66 $\pm$ 1.25	44.95 $\pm$ 3.67*** ^b	47.66 $\pm$ 5.37** ^b
Birthweight (grams) mean $\pm$ SD	3636 $\pm$ 327.30	2397 $\pm$ 457.85*** ^b	2952 $\pm$ 484.37** ^b
FGR	-	2 (18.2)	0
Placental weight (grams) mean $\pm$ SD	745.14 $\pm$ 114.15	425.27 $\pm$ 88.38*** ^c	513.63 $\pm$ 96.22*** ^c
Newborn sex (n)			
Male	11 (52.4)	7 (63.6)	7 (63.6)
Female	10 (47.6)	4 (36.4)	4 (36.4)
Sickle-related complications during pregnancy (n)			
Vaso-occlusive crises	-	9 (81.8)	7 (63.6)
Acute chest syndrome	-	2 (18.2)	1 (9.1)
Infection during pregnancy	-	5 (54.5)	2 (18.2)
Programmed blood transfusion	-	10 (90.9)	8 (72.7)
Hospital admission during pregnancy	-	8 (72.7)	5 (54.5)
Perinatal mortality	-	1 (9.1)	0

BMI: body mass index, FGR: fetal growth restriction, SD: standard deviations, ^a: compared with the control group, ^b: Mann-Whitney test U, ^c: Unpaired t test, **p<0.01, *** p<0.001.

Methylation analysis at CpG sites - DMPs

Comparative analysis of genome-wide CpG methylation levels in placentas from HbSS versus control groups identified 396 DMPs. Among these, 291 DMPs (73.5 %) were hypermethylated and 105 DMPs (26.5 %) were hypomethylated. In the comparison between HbSC and control groups 581 DMPs were identified, of which 443 DMPs (76.2 %) were hypermethylated and 138 DMPs (23.8 %) were hypomethylated. A total of 68 hyper and 6 hypomethylated DMPs were in common for both genotypes groups.

Distribution analysis of DMPs in the genetic regions was performed. For the HbSS group a higher frequency of hypermethylated DMPs at TSS200 ($p=0.0373$), CpG island ($p<0.0001$) and S_Shore ($p=0.0306$) regions and a higher frequency of hypomethylated DMPs at Body ($p=0.0239$) and Open Sea ($p<0.0001$) regions were obtained (Table 5). For the HbSC group, a higher frequency of hypermethylated DMPs were revealed at CpG island ($p<0.0001$) and S_Shore ($p=0.0101$) regions and a higher frequency of hypomethylated DMPs was obtained only at Open Sea ($p<0.0001$) regions (Table 6).

Table 5. Distribution of the significant DMPs detected in the HbSS group compared to the control group regarding their genomic location.

In relation to gene	Hypermethylated		Hypomethylated		p-value
<i>1stExon</i>	12	4%	0	0%	0.0749
<i>3'UTR</i>	5	2%	0	0%	0.3998
<i>5'UTR</i>	28	10%	13	12%	0.5428
<i>Gene body</i>	85	29%	44	42%	0.0239*
<i>TSS1500</i>	31	11%	11	10%	0.9598
<i>TSS200</i>	29	10%	3	3%	0.0373*
<i>Intergenic region</i>	101	35%	34	32%	0.7557
In relation to CpG island	Hypermethylated		Hypomethylated		p-value
<i>Island</i>	139	48%	3	3%	<0.0001*
<i>N_Shelf</i>	3	1%	2	2%	0.859
<i>N_Shore</i>	26	9%	4	4%	0.1372
<i>S_Shelf</i>	5	2%	5	5%	0.1798
<i>S_Shore</i>	30	10%	3	3%	0.0306*
<i>Open Sea</i>	88	30%	88	84%	<0.0001*

*: Group of DMPs (hyper or hypomethylated) statistically enriched in gene or CpG island category ($p<0.05$; chi-square distribution test).

Table 6. Distribution of the significant DMPs detected in the HbSC group compared to the control group regarding their genomic location.

In relation to gene	Hypermethylated		Hypomethylated		p-value
<i>1stExon</i>	22	5%	4	3%	0.4295
<i>3'UTR</i>	8	2%	3	2%	0.7818
<i>5'UTR</i>	43	10%	6	4%	0.0714
<i>Gene body</i>	104	23%	42	30%	0.1252
<i>TSS1500</i>	61	14%	16	12%	0.607
<i>TSS200</i>	37	8%	11	8%	0.8871
<i>Intergenic region</i>	168	38%	56	41%	0.6457
In relation to CpG island	Hypermethylated		Hypomethylated		p-value
<i>Island</i>	240	54%	19	14%	<0.0001*
<i>N_Shelf</i>	9	2%	4	3%	0.7858
<i>N_Shore</i>	50	11%	11	8%	0.3419
<i>S_Shelf</i>	8	2%	2	1%	0.7785
<i>S_Shore</i>	36	8%	2	1%	0.0101*
<i>Open Sea</i>	100	23%	100	72%	<0.0001*

*: Group of DMPs (hyper or hypomethylated) statically enriched in gene or CpG island classes ($p < 0.05$; chi-square distribution test).

Differentially Methylation Regions analysis - DMRs

For the HbSS group, our regional analysis identified 57 DMRs which showed statistically significant difference (adjusted p-value < 0.05), of which 51 DMRs (89.5 %) were hypermethylated and 6 DMRs (10.5 %) were hypomethylated. Most of them were located in the promoter/1st exon (43.8 %) and in intronic regions (28 %). The methylation level ($\Delta\beta$) ranged in 0.31 (the highest hypermethylated DMR) to -0.23 (the lowest hypomethylated DMR) (S3 Table). The comparison between HbSC and control groups revealed 106 DMRs, including 91 DMRs hypermethylated (85.8%) and 15 hypomethylated (14.2%), being more frequent in the promoter/1st exon (53.7 %) and intergenic regions (21.7 %), with methylation levels ranging from 0.25 to -0.33 the (S1 Table).

Among all the statistically significant DMRs, 50 genes were identified for the HbSS group and 87 genes for the HbSC group. The analysis of enrichment pathways was performed for both gene groups and among the statistically significant biological processes (FDR < 0.05). We highlighted the most significant biological processes for the HbSS group: mesenchyme development, pattern specification process, neuron fate specification and the adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway. For the HbSC, the most significant biological processes were animal organ morphogenesis, tissue development, circulatory system development and the central nervous system neuron differentiation (Table 7).

Table 7. The GO terms for differentially methylated genes between cases (HbSS and HbSC) and controls groups.

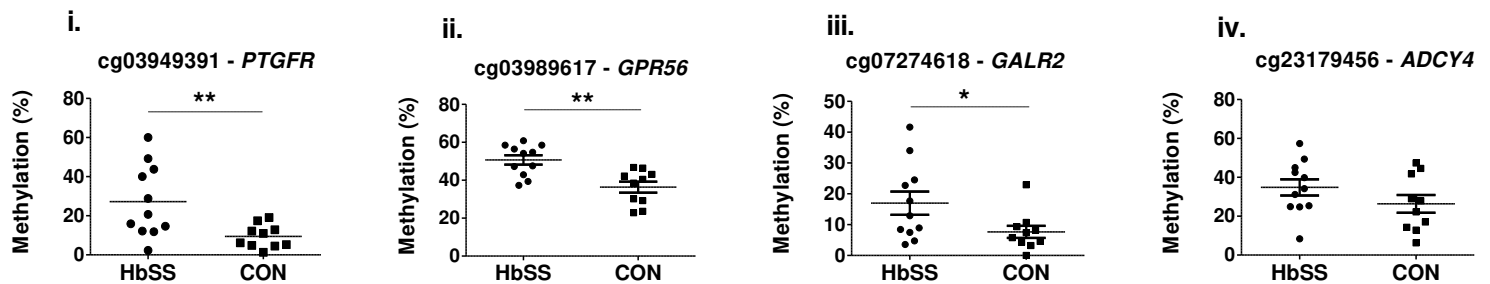
Group	GO No.	GO term	Genes	FDR
HbSS	GO: 0007188	adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway	<i>ADCY4, CASR, GALR2, LHCGR, PTGFR, SSTR4</i>	0.035863
	GO:0007189	adenylate cyclase-activating G protein-coupled receptor signaling pathway	<i>ADCY4, GALR2, LHCGR, PTGFR, SSTR4</i>	0.035863
	GO:0007187	G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger	<i>ADCY4, CASR, GALR2, LHCGR, PTGFR, SSTR4</i>	0.035863
	GO:0060485	mesenchyme development	<i>BNC2, GBX2, GSC, ROBO2, SIX1, TGFB1 1</i>	0.035863
	GO:0001708	cell fate specification	<i>GSC, LBX1, SIX, SOX1</i>	0.041317
	GO:0007389	pattern specification process	<i>GBX2, GSC, LBX1, ROBO2, SIX1, ZIC1</i>	0.041317
	GO:0019933	cAMP-mediated signaling	<i>ADCY4, GALR2, LHCGR, PTGFR, SSTR4</i>	0.041628
HbSC	GO:0021884	forebrain neuron development	<i>GBX2, ROBO2, SOX1</i>	0.041628
	GO:0048665	neuron fate specification	<i>LBX1, SIX1, SOX1</i>	0.049047
	GO: 0021953	central nervous system neuron differentiation	<i>EPHA4, GABRB1, GBX2, MNX1, NFIB, NR2E1</i>	0.0017779
	GO: 0021954	central nervous system neuron development	<i>EPHA4, GABRB1, GBX2, NFIB, NRAE1, ROBO2</i>	0.0017779
	GO: 0009887	animal organ morphogenesis	<i>AJAP1, GBX2, GATA4, HAND1, HOXD11, LFT, LHX9, NKX3-2, NFIB, OLFM1</i>	0.0045345
	GO: 0035295	tube development	<i>EPHA4, GBX2, GATA4, HAND1, HOXD11, LEPR, HLA-G, NKX3-2, NFIB, NR2E1</i>	0.0045345
	GO: 0035239	tube morphogenesis	<i>EPHA4, GBX2, GATA4, HAND1, HOXD11, LEPR, HLA-G, NFIB, NR2E1, PRKD2</i>	0.0099342
	GO: 0001822	kidney development	<i>EPHA4, HOXD11, KCNJ8, NPHS2, ROBO2, SIX1, TP73</i>	0.010114
	GO: 0009888	tissue development	<i>AJAP1, BARHL2, EPHA4, EVC, GBX2, HAND1, HOXD11, LTF, LGR6</i>	0.011194
	GO: 0072001	renal system development	<i>EPHA4, HOXD11, KCNJ8, ROBO2 SIX1, TP73, WT1</i>	0.011194
	GO: 0072073	kidney epithelium development	<i>EPHA4, HOXD11, NPHS2, ROBO2 SIX1, WT1</i>	0.012108
	GO: 0072359	circulatory system development	<i>GBX2, GATA4, HAND1, LEPR, HLA-G, NR2E1, OLFM1, KCNJ8, PRKD2, ROBO2</i>	0.013806

GO: Gene ontology

Methylation validation of the DMRs

To confirm the array data, bisulfite pyrosequencing was used to measure the methylation level in the selected DMRs (four DMRs for the HbSS group and three DMRs for the HbSC group). The analyses were performed at one CpGs sites for each DMR. The assessed CpGs included: cg03949391-*PTGFR*, cg03989617-*GPR56*, cg07274618-*GALR2* and cg23179456-*ADCY4* for the HbSS group and cg24847829-*SPOCK1*, cg24676244-*THSD7A* and cg23179456-*ADCY4* for the HbSC group. The methylation level was performed using the same samples initially analyzed with three additional samples per group (HbSS=11, HbSC=11, control group=10). The methylation analyses between case and control groups were validated for three of the four assessed CpGs sites in the HbSS group (cg03949391-*PTGFR*, cg03989617-*GPR56* and cg07274618-*GALR2*). No CpG site achieved statistically significant difference for the HbSC group; p-values <0.05 were considered statistically significant (Fig. 1). Correlation analyses between array and pyrosequencing data were performed and a significant correlation ($p < 0.05$) was reached for all analyzed CpGs in both HbSS and HbSC groups (data presented in table 8).

A



B

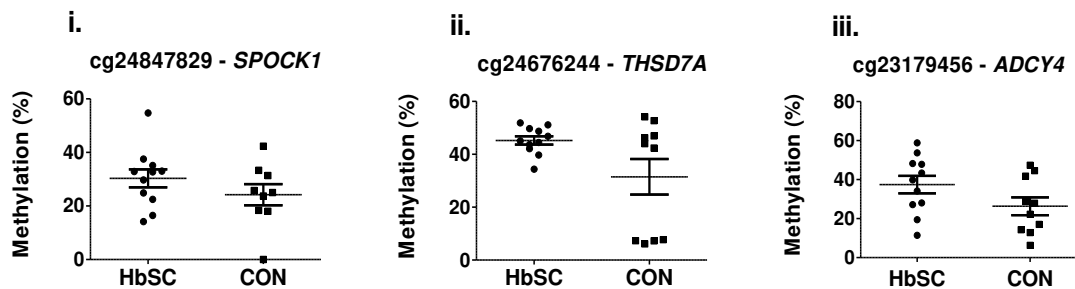


Fig 1. Methylation data from pyrosequencing analysis in the HbSS and HbSC groups compared with the control group (CON). **A:** CpGs sites analyzed in the HbSS group. i cg03949391-*PTGFR*; ii cg03989617-*GPR56*; iii cg07274618-*GALR2* and iv cg23179456-*ADCY4*. **B:** CpGs sites analyzed in the HbSC group. i cg24847829-*SPOCK1*; ii cg24676244-*THSD7A* and iii cg23179456-*ADCY4*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's unpaired *t* test).

Table 8. Correlation analyses for array and pyrosequencing methylation data.

Group	CpG site-Gene	r ²	p-value
HbSS	cg03949391- <i>PTGFR</i> ^a	0.952	<0.0001
	cg03989617- <i>GPR56</i> ^b	0.9565	<0.0001
	cg07274618- <i>GALR2</i> ^a	0.9274	<0.0001
	cg23179456- <i>ADCY4</i> ^b	0.6822	0.0051
HbSC	cg24847829- <i>SPOCK1</i> ^b	0.706	0.0048
	cg24676244- <i>THSD7A</i> ^a	0.7882	0.0005
	cg23179456- <i>ADCY4</i> ^b	0.8451	<0.0001

^a Spearman method, ^b Pearson method

Expression analysis of differentially methylated genes

In order to evaluate the expression levels of the genes at selected DMRs, quantitative PCR was performed for *PTGFR*, *GPR56*, *GALR2* and *ADCY4* genes (HbSS group), and for *SPOCK1*, *THSD7A* and *ADCY4* genes (HbSC group). The expression levels of all these genes (n=7) were analyzed in relation to the control group. The comparison between the HbSS group and the control group showed the *PTGFR* gene downregulated (-2.97-fold, p=0.0062) and the *GPR56* gene upregulated (3.0-fold, p=0.0103), with no expression difference obtained for *GALR2* (-1.03-fold, p=0.306) and *ADCY4* (-1.03-fold, p=0.725) genes. For the HbSC group, the analyses revealed the *SPOCK1* gene downregulated (-2.40-fold, p=0.0263), the *ADCY4* gene upregulated (1.80-fold, p=0.0499) and did not find statistical difference for the *THSD7A* gene (1.16-fold, p=0.1846), when compared to the control group (Fig. 2).

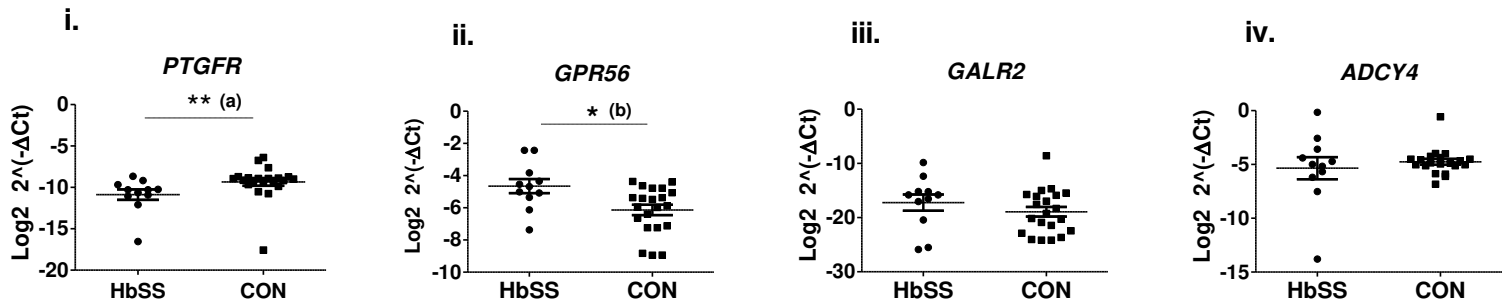
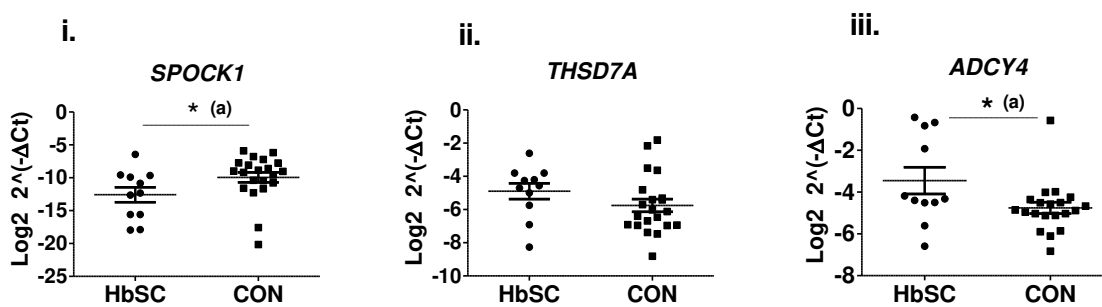
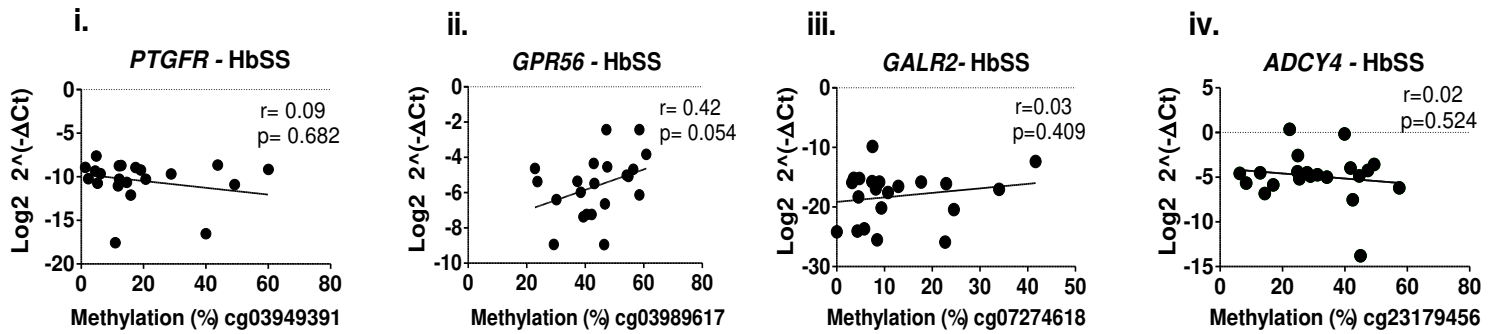
A**B**

Fig 2. Expression levels of genes in the HbSS and HbSC groups compared with the control group (CON). **A:** Genes assessed in the HbSS group. i *PTGFR*; ii *GPR56*; iii *GALR2* and iv *ADCY4*. **B:** Genes evaluated in the HbSC group. i *SPOCK1*; ii *THSD7A* and iii *ADCY4*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, (a) Mann-Whitney *U* test, (b) Student's unpaired *t* test.

Correlation analysis between methylation and expression data

The correlation tests between methylation and expression data was applied and the results for the HbSS group revealed just a trend to positive significant correlation for the *GPR56* ($r=0.42$, $p=0.054$) gene, and no significant correlation for *PTGFR* ($r=0.09$, $p=0.682$), *GALR2* ($r=0.03$, $p=0.409$) and *ADCY4* ($r=0.02$, $p=0.524$) genes. The tests for the HbSC showed no significant correlation for *THSD7A* ($r=0$, $p=0.927$) and *SPOCK1* ($r=0$, $p=0.977$) genes, and interestingly it presented a positive correlation for the *ADCY4* gene ($r=0.52$, $p=0.0149$) (Fig. 3).

A



B

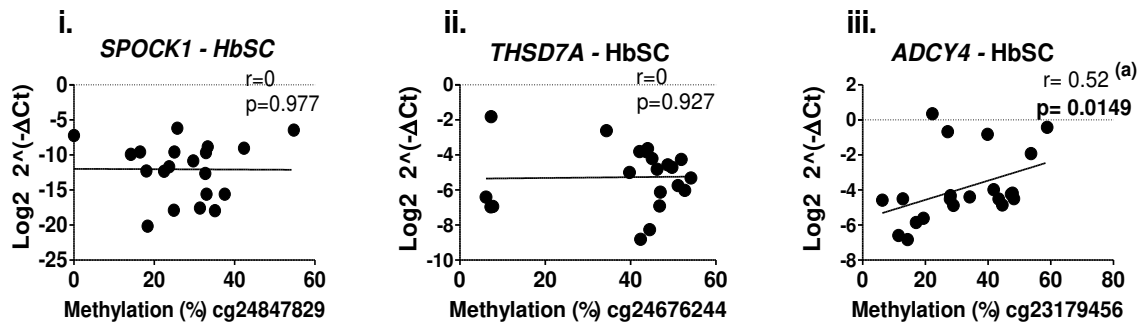


Fig 3. Correlation analyses between methylation and expression data performed in genes from case and control groups. **A:** Analysis in the HbSS group. i *PTGFR*; ii *GPR56*; iii *GALR2* and iv *ADCY4*. **B:** Analysis in the HbSC group. i *SPOCK1*; ii *THSD7A* and iii *ADCY4*. (a) Spearman method. p-values <0.05 are indicated in bold.

Discussion

Pregnant women with SCD require a high-risk multidisciplinary antenatal care due to increased risk of maternal and perinatal complications such as acute chest syndrome, pre-eclampsia, infection, spontaneous abortion, preterm birth and FGR. The placenta of women with SCD can present several morphological abnormalities, which may favor maternal and fetal complications. The placental abnormalities have been well described and reported in SCD, however little is known about the molecular mechanisms involved, including gene expression and regulation in this tissue. One of the few studies about gene expression in placentas from this group of patients showed altered gene expression in the inflammatory pathway, indicating placental molecular alteration related to SCD (69). DNA methylation is a gene regulation mechanism, and it has been intensely studied in human placenta from complicated pregnancies (96,98,152). To our knowledge, so far there is no study assessing DNA methylation in placenta from women with SCD, being this the aim of the study.

In our results, the HbSS and HbSC groups showed a higher frequency of hypermethylated DMPs, presenting a rate of 73.5% and 76.2%, respectively, when compared with the control group. These findings suggest that the presence of HbSS and HbSC can alter placental DNA methylation in a similar way (hypermethylation status), what could be explained by the common pathophysiology of SCD. However, a small number of common hypermethylated DMPs was shared between both genotypes, indicating an intra-specific genotype effect for methylation at particular CpG sites. Previous study has reported that DNA can suffer hypermethylation under in vitro hypoxic conditions (24h of 1% oxygen) in cultured human placental trophoblasts, which was also associated with non-differentiation of villous cytotrophoblast to syncytiotrophoblast (122). Pregnant women with SCD can have decreased oxygen levels in the blood circulation due to many factors such as: the presence of sickled erythrocytes, which are less capable of transporting oxygen; vaso-occlusion events, which worsen the maternal oxygen conditions; and the underlying physiological changes of pregnancy, which can compromise the maternal oxygen reserves (123). All these events can favor decreased placental oxygen circulation, leading to a hypoxic environment, which could then favor DNA hypermethylation. Therefore, taking into account previous studies we can suggest that hypoxia conditions in the placenta of pregnant women with SCD can induce DNA hypermethylation, and possibly favor placental dysfunctions by the non-differentiation of villous cytotrophoblast to syncytiotrophoblast.

Additionally, in the present study, both HbSS and HbSC groups showed statistically significant DMPs distribution in the regions related to CpG Island with hypermethylation at CpG Island and S_Shore regions, and hypomethylation at Open Sea region. Interestingly, studies in normal placental tissue comparing third to second trimester have shown also significant DMPs in regions related to CpG Island, however with opposite methylated status, displaying hypomethylation at CpG Island region and hypermethylation at Open Sea region (124). Approximately 60-70% of the genes in the human genome present CpGs Islands, especially in promoter regions, and its methylation is closely associated to gene silencing (153,154). Thus, our results indicate that the placenta under SCD conditions can suffer increased methylation in CpGs Islands regions, which could lead to gene expression alterations in the placental tissue.

The hypermethylation levels were validated in three CpGs sites (cg03949391-*PTGFR*, cg03989617-*GPR56* and cg07274618-*GALR2*) in the HbSS group. Interestingly, two genes presented significant difference in gene expression, being the *PTGFR* with lower expression and the *GPR56* with high expression. Although *PTGFR* has shown a difference in

methylation and expression in the HbSS group, we did not observe statistically significant correlation, what can indicate the involvement of other mechanisms of gene expression such as microRNA and histone modifications. At the same time, our findings suggest the importance of the *PTGFR* gene. *PTGFR* encodes a prostaglandin 2 α receptor protein, which plays an important role in stimulating trophoblastic cell adhesion, migration and proliferation (126), important events that ensure the appropriate placental function and adequate fetal development (57). Therefore, we can hypothesize that the lower *PTGFR* expression in HbSS placentas may impair trophoblast function, compromising placental overall function and development. Considering the *GPR56* gene, the correlation analysis revealed a trend for positive correlation, suggesting that hypermethylation may be linked to increased gene expression, what is not common, since methylation has been more associated with decreased gene expression. Lim et al demonstrated that, in fact, the correlation between DNA methylation and gene expression in human placenta is more complex than expected (127). Interestingly, the authors showed a significant correlation between high methylation level at gene body with high gene expression. Hence, we can suggest that the hypermethylation found at the first exon of *GPR56* can be associated with its high expression. *GPR56* encodes a membrane receptor protein, which is involved in important pathways such as: cell adhesion, down-regulation of proliferation, cell-cell signaling and brain development. Previous studies in cancer have shown the association of high *GPR56* expression with moderate metastatic tumors, suggesting its role in inhibiting cell proliferation and angiogenesis (129). Thus, it is possible that increased *GPR56* expression can be inhibiting proliferation and angiogenesis in pregnant HbSS patients, leading to inappropriate development of placental tissue.

For the HbSC group, no CpG site was validated in the pyrosequencing analysis. On the other hand, the expression analysis revealed two differentially expressed genes, being *SPOCK1* downregulated and *ADCY4* upregulated. Regarding *SPOCK1*, other regulatory mechanisms can be involved in its low expression, since the hypermethylation was not validated. Studies have demonstrated that *SPOCK1* plays a critical role in cell proliferation, invasion and migration in different types of tumors (130–132). A recent study has shown that the *SPOCK1* silencing reduced the migration capacity of colorectal cancer cell lines, (130), supporting our hypotheses that low *SPOCK1* expression in the placenta of HbSC pregnancies may impair the migration, invasion and cell proliferation mechanisms, which could compromise the placental function. In relation to the *ADCY4*, significant correlation between high methylation and high expression was also found. As mentioned before, a recent study has identified significant correlation between gene body methylation and high gene

expression (127), however the *ADCY4* methylation was at the TSS200 region (promoter region), and methylation in the promoter region is mostly associated with low gene expression. Previous studies have demonstrated that alternative promoters can be stimulated in response to the absence of activation of the main promoter (155–157). Thus we could hypothesize that the *ADCY4* promoter could be inactivated by methylation, and this would lead to over stimulation of the alternative promoter, favoring its higher gene expression. However, further studies are necessary in order to confirm this hypothesis. The *ADCY4* gene encodes a member of the family of adenylate cyclases, which are membrane-associated enzymes, responsible for cell control, differentiation, vesicle translation, enzyme production, and apoptosis (139). A previous study about gene expression in human placenta from first and third trimesters has shown higher *ADCY4* expression in the first trimester compared to third trimester, indicating that the mechanism of cell control, differentiation, enzyme production would be more active in the first trimester. (140). Thereby, due to the increased *ADCY4* expression in placentas from the HbSC group (third trimester), we suggest that it could activate the biological processes in which *ADCY4* is involved, impairing the processes proper of this gestational period.

In our study, the presence of adverse maternal and perinatal outcomes confirmed the increased morbidity associated with SCD, which included lower gestational age at birth, especially in the HbSS genotype, presenting high prevalence of provider initiated preterm birth and lower body mass. SCD cases also showed significant differences in placental weight and birthweight, which are also mostly associated with the differences in gestational age at delivery. Although our study has some limitations, including the small sample size and the different gestational age in the groups, to the best of our knowledge, it is the first study that has evaluated the DNA methylation profile in placentas from pregnant women in the two most frequent genotypes of SCD (HbSS and HbSC).

In conclusion, our findings suggest that SCD may affect placental DNA methylation, leading to a hypermethylation status. This increased methylation may lead to changes in placental gene expression and consequently disrupt trophoblast function, contributing to inadequate placental development. Our results have provided new insights that may head future research towards a better understanding of the mechanisms and pathways underlying DNA methylation involvement in the epigenetic regulation of major placental processes in pregnant women with SCD.

References

1. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*. 1957 Aug 17;180(4581):326–8.
2. Ballas SK, Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1996 Dec;10(6):1221–39.
3. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 15;4:18010.
4. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004 Oct 9;364(9442):1343–60.
5. Powars DR, Sandhu M, Niland-Weiss J, Johnson C, Bruce S, Manning PR. Pregnancy in sickle cell disease. *Obstet Gynecol*. 1986 Feb;67(2):217–28.
6. de Montalembert M, Deneux-Tharaux C. Pregnancy in sickle cell disease is at very high risk. *Blood*. 2015 May 21;125(21):3216–7.
7. Howard J, Oteng-Ntim E. The obstetric management of sickle cell disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012 Feb;26(1):25–36.
8. Oteng-Ntim E, Meeks D, Seed PT, Webster L, Howard J, Doyle P, et al. Adverse maternal and perinatal outcomes in pregnant women with sickle cell disease: systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2015 May 21;125(21):3316–25.
9. Vianello A, Vencato E, Cantini M, Zanconato G, Manfrin E, Zamo A, et al. Improvement of maternal and fetal outcomes in women with sickle cell disease treated with early prophylactic erythrocytapheresis. *Transfusion*. 2018;58(9):2192–201.
10. Billett HH, Langer O, Regan OT, Merkatz I, Anyaegbunam A. Doppler velocimetry in pregnant patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 1993 Mar;42(3):305–8.
11. Rathod KB, Jaiswal KN, Shrivastava AC, Shrikhande AV. Study of placenta in sickle cell disorders. *Indian J Pathol Microbiol*. 2007 Oct;50(4):698–701.
12. Thame M, Lewis J, Trotman H, Hambleton I, Serjeant G. The Mechanisms of Low Birth Weight in Infants of Mothers With Homozygous Sickle Cell Disease. *Pediatrics*. 2007 Sep 1;120(3):e686–93.
13. Nogues P, Dos Santos E, Jammes H, Berveiller P, Arnould L, Vialard F, et al. Maternal obesity influences expression and DNA methylation of the adiponectin and leptin systems in human third-trimester placenta. *Clinical Epigenetics*. 2019 Feb 7;11(1):20.
14. Gagné-Ouellet V, Houde A-A, Guay S-P, Perron P, Gaudet D, Guérin R, et al. Placental lipoprotein lipase DNA methylation alterations are associated with gestational diabetes and body composition at 5 years of age. *Epigenetics*. 2017 May 9;12(8):616–25.
15. Morales E, Vilahur N, Salas LA, Motta V, Fernandez MF, Murcia M, et al. Genome-wide DNA methylation study in human placenta identifies novel loci associated with maternal smoking during pregnancy. *Int J Epidemiol*. 2016;45(5):1644–55.
16. Burton GJ, Sebire NJ, Myatt L, Tannetta D, Wang Y-L, Sadovsky Y, et al. Optimising sample collection for placental research. *Placenta*. 2014 Jan;35(1):9–22.
17. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014 May 15;30(10):1363.
18. Fortin J-P, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, et al. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biology*. 2014 Dec 3;15(11):503.
19. Zhou W, Laird PW, Shen H. Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes. *Nucleic Acids Res*. 2017 Feb 28;45(4):e22.
20. Du P, Zhang X, Huang C-C, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*. 2010 Nov 30;11:587.

21. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015 Apr 20;43(7):e47.
22. Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, Pidsley R, Samaras K, V Lord R, et al. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8:6.
23. Wang J, Vasaikar S, Shi Z, Greer M, Zhang B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jul 3;45(Web Server issue):W130–7.
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402–8.
25. Benites BD, Benevides TCL, Valente IS, Marques JF, Gilli SCO, Saad STO. The effects of exchange transfusion for prevention of complications during pregnancy of sickle hemoglobin C disease patients. *Transfusion.* 2016 Jan;56(1):119–24.
26. Baptista LC, Costa ML, Ferreira R, Albuquerque DM, Lanaro C, Fertrin KY, et al. Abnormal expression of inflammatory genes in placentas of women with sickle cell anemia and sickle hemoglobin C disease. *Ann Hematol.* 2016 Oct;95(11):1859–67.
27. Blair JD, Yuen RKC, Lim BK, McFadden DE, von Dadelszen P, Robinson WP. Widespread DNA hypomethylation at gene enhancer regions in placentas associated with early-onset pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2013 Oct;19(10):697–708.
28. Yuen RKC, Chen B, Blair JD, Robinson WP, Nelson DM. Hypoxia alters the epigenetic profile in cultured human placental trophoblasts. *Epigenetics.* 2013 Feb 1;8(2):192–202.
29. Boga C, Ozdogu H. Pregnancy and sickle cell disease: A review of the current literature. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2016 Feb 1;98:364–74.
30. Novakovic B, Yuen RK, Gordon L, Penaherrera MS, Sharkey A, Moffett A, et al. Evidence for widespread changes in promoter methylation profile in human placenta in response to increasing gestational age and environmental/stochastic factors. *BMC Genomics.* 2011 Oct 28;12:529.
31. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands – ‘A rough guide.’ *FEBS Letters.* 2009;583(11):1713–20.
32. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012 May 29;13(7):484–92.
33. Barylak M, Kaczynski P, Goryszewska E, Riley SC, Waclawik A. Prostaglandin F2 α stimulates adhesion, migration, invasion and proliferation of the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo. *Placenta.* 2019 Feb 1;77:19–29.
34. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research.* 2004 Jan;114(5–6):397–407.
35. Lim YC, Li J, Ni Y, Liang Q, Zhang J, Yeo GSH, et al. A complex association between DNA methylation and gene expression in human placenta at first and third trimesters. *PLoS One.* 2017 Jul 13;12(7).
36. Zendman Albert J.W. TM7XN1, a novel human EGF-TM7-like cDNA, detected with mRNA differential display using human melanoma cell lines with different metastatic potential. *FEBS Letters.* 1999;446(2–3):292–8.
37. Chen D, Zhou H, Liu G, Zhao Y, Cao G, Liu Q. SPOCK1 promotes the invasion and metastasis of gastric cancer through Slug-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Mol Med.* 2018 Feb;22(2):797–807.
38. Chen Q, Yao Y-T, Xu H, Chen Y-B, Gu M, Cai Z-K, et al. SPOCK1 promotes tumor growth and metastasis in human prostate cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:2311–21.

39. Fan L-C, Jeng Y-M, Lu Y-T, Lien H-C. SPOCK1 Is a Novel Transforming Growth Factor- β -Induced Myoepithelial Marker That Enhances Invasion and Correlates with Poor Prognosis in Breast Cancer. *PLoS ONE*. 2016;11(9):e0162933.
40. Popov DV, Lysenko EA, Vepkhvadze TF, Kurochkina NS, Maknovskii PA, Vinogradova OL. Promoter-specific regulation of PPARGC1A gene expression in human skeletal muscle. *J Mol Endocrinol*. 2015 Oct;55(2):159–68.
41. Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgård R. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene*. 2004 Apr 14;330:101–14.
42. Agarwal VR, Bulun SE, Leitch M, Rohrich R, Simpson ER. Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Nov;81(11):3843–9.
43. Johnstone TB, Agarwal SR, Harvey RD, Ostrom RS. cAMP Signaling Compartmentation: Adenylyl Cyclases as Anchors of Dynamic Signaling Complexes. *Mol Pharmacol*. 2018;93(4):270–6.
44. Sitras V, Fenton C, Paulssen R, Vårtun Å, Acharya G. Differences in Gene Expression between First and Third Trimester Human Placenta: A Microarray Study. *PLoS One* [Internet]. 2012 Mar 19;7(3).