

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PAULO VICTOR BARBOSA ELEUTERIO DOS SANTOS

PERFIL DE METILAÇÃO NO PROMOTOR DE LINE-1 EM
RECÉM-NASCIDOS

RIO DE JANEIRO

2024

Paulo Victor Barbosa Eleuterio dos Santos

**PERFIL DE METILAÇÃO NO PROMOTOR DE LINE-1 EM
RECÉM-NASCIDOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde Materno Infantil.

Orientadores:

Prof. Dr. Arnaldo Prata-Barbosa
Prof. Dr. Antônio José Ledo Alves da Cunha
Dra. Aline de Araújo Brasil

Rio de Janeiro

2024

P331p dos Santos, Paulo Victor Barbosa Eleutério
Perfil de metilação no promotor de LINE-1 em
recém-nascidos / Paulo Victor Barbosa Eleutério
dos Santos. -- Rio de Janeiro, 2024.
110 f.

Orientador: Arnaldo Prata Barbosa.
Coorientador: Antonio José Ledo Alves da Cunha.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Instituto de Puericultura e Pediatria
Martagão Gesteira, Programa de Pós-Graduação em
Saúde Materno-Infantil, 2024.

1. Prematuridade. 2. Epigenética. 3. Metilação do
DNA. 4. LINE-1. 5. Recém-nascido. I. Barbosa, Arnaldo
Prata, orient. II. da Cunha, Antonio José Ledo Alves,
coorient. III. Brasil, Aline Araújo, coorient. IV. Título.

Paulo Victor Barbosa Eleuterio dos Santos

**PERFIL DE METILAÇÃO NO PROMOTOR DE LINE-1
EM RECÉM-NASCIDOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde Materno Infantil.

Aprovada em: 17 de julho de 2024.

Prof^a. Dr^a. Marcia Gonçalves Ribeiro
Faculdade de Medicina da UFRJ – IPPMG-UFRJ

Prof^a. Dr^a. Amanda Faria de Figueiredo Rodrigues da Silva
Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG-UFRJ)

Prof^a. Dr^a. Sheila Coelho Soares Lima
Instituto Nacional de Câncer (INCA)

Dedicatória

Este trabalho é dedicado em memória da minha querida avó, Eliane, que compartilhou este sonho comigo. Aos meus pais, Carlos e Jacqueline, e à minha irmã Julianna.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus pais, Carlos e Jacqueline, cujo amor e existência foram fundamentais para minha jornada. Minha irmã Julianna sempre foi uma fonte de apoio moral incansável. Agradeço ao meu avô Jaime, cuja docura e interesse constante pelo meu trabalho me encorajaram a persistir. Recordo com carinho minha avó, cujo incentivo aos estudos e orgulho por minhas conquistas sempre ecoarão em meu coração.

Agradeço ao Prof. Dr. Arnaldo Prata pela orientação atenta e detalhada ao longo deste trabalho. Seu compromisso com a clareza e a precisão foi essencial para o desenvolvimento deste estudo. Suas sugestões e correções, sempre pontuais, ajudaram a fortalecer minha pesquisa e meu crescimento acadêmico. Sou grato pela dedicação e pelo suporte constantes que foram tão importantes para mim.

Minha gratidão também se estende à Dra. Aline Brasil, pela orientação precisa e dedicada. Sua assistência na bancada e na estruturação desta dissertação foram fundamentais, refletindo seu comprometimento e acolhimento. Sou grato pela didática com que compartilhou seu conhecimento e pelas correções detalhadas que foram essenciais para o enriquecimento do trabalho. Seu apoio, tanto prático quanto acadêmico, foi um pilar para o desenvolvimento deste estudo e para o meu crescimento como pesquisador.

Ao Prof. Dr. Antônio José Ledo Alves da Cunha, ofereço meus sinceros agradecimentos pelas discussões enriquecedoras e pelas questões fundamentais levantadas durante as apresentações de dados. Seus conselhos ajudaram a iluminar diversas facetas do meu trabalho. Agradeço pelo incentivo e pelas sugestões valiosas que contribuíram significativamente para o aprimoramento deste estudo.

Sou imensamente grato à equipe do laboratório – Margarida, Leo e Stephanie – por seu bom humor e espírito de equipe. A toda equipe da pediatria, incluindo Maria Clara, Mariana, Jacqueline, Fernanda e Gustavo, por suas ideias e conselhos valiosos que enriqueceram significativamente esta dissertação.

Meus sinceros agradecimentos vão para Felipe, cuja habilidade técnica e perspicácia analítica foram inestimáveis no tratamento estatístico e na visualização de dados desta pesquisa. Sua contribuição para a concepção dos gráficos foi essencial, e sua disposição para discutir e revisar aspectos técnicos contribuiu significativamente para a qualidade final deste trabalho. Agradeço-lhe imensamente por sua colaboração e dedicação.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos – Marcella, Gabriella, Camila, André, Wellington, Ana, Fernando, Adriano e Lucas – por sua amizade inabalável e apoio constante, mesmo nos momentos mais desafiadores. Vocês foram uma fonte de força e inspiração em minha jornada científica.

“O ambiente molda, mas a genética desenha os limites.”

RESUMO

Eleuterio-Santos, Paulo Victor Barbosa. Perfil de Metilação do promotor de LINE-1 em recém-nascidos. Rio de Janeiro 2024. Dissertação (Mestrado em Saúde Materno Infantil) - Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A prematuridade, caracterizada pelo nascimento antes das 37 semanas de gestação, é um desafio global que atinge 15 milhões de crianças todos os anos ao redor do mundo. No Brasil, cerca de 10% dos nascimentos são prematuros, o dobro de países de alta renda, e representa a principal causa de mortalidade infantil. Pesquisas recentes têm estudado a relação entre prematuridade e modificações epigenéticas, sobretudo a metilação do DNA, destacando a importância das interações entre genética e ambiente durante o desenvolvimento fetal. Fatores adversos durante a gravidez, como estresse materno e nutrição inadequada, têm sido associados à metilação de certos genes em recém-nascidos pré-termo. Sabe-se que um terço da metilação do DNA ocorre em elementos transponíveis (TE), dentre eles, os longos elementos nucleares intercalados (LINE-1), que cobrem cerca de 18% do genoma humano. Seu perfil de metilação pode servir como marcador das alterações na metilação global do DNA genômico. No entanto, são escassos os estudos relacionando os níveis de metilação de LINE-1 com a prematuridade. Neste contexto, o objetivo deste estudo é descrever o perfil de metilação global da região promotora de LINE-1 em recém-nascidos a termo e pré-termo em diferentes momentos pós-nascimento. Este padrão pode vir a ser utilizado como referência em outros estudos, contribuindo para a melhor compreensão de como a prematuridade pode afetar a saúde e o desenvolvimento destas crianças, do ponto de vista da epigenética. Os resultados obtidos demonstraram variações na metilação do LINE-1 entre neonatos a termo e pré-termo, com prematuros apresentando menor metilação no nascimento, sugerindo influência da prematuridade na configuração epigenética inicial. As diferenças observadas entre os grupos parecem diminuir nos primeiros dias de vida. Além disso, foi notada uma tendência de aumento na metilação do LINE-1 ao longo do tempo em recém-nascidos pré-termo, sugerindo maturação do epigenoma nos primeiros meses de vida. Em conclusão, a análise da metilação do LINE-1 iniciada neste estudo surge como uma nova abordagem epigenética e molecular de potencial impacto como biomarcador no estudo da prematuridade e do desenvolvimento infantil.

Palavras-chave: Prematuridade, epigenética, metilação do DNA, LINE-1, recém-nascido.

ABSTRACT

Eleuterio-Santos, Paulo Victor Barbosa. Perfil de Metilação do promotor de LINE-1 em recém-nascidos. Rio de Janeiro 2024. Dissertação (Mestrado em Saúde Materno Infantil) - Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Prematurity, characterized by birth before 37 weeks of gestation, is a global challenge that affects 15 million children around the world every year. In Brazil, around 10% of births are premature, twice as many as in high-income countries, and represent the leading cause of infant mortality. Recent research has studied the relationship between prematurity and epigenetic changes, especially DNA methylation, highlighting the importance of interactions between genetics and environment during fetal development. Adverse factors during pregnancy, such as maternal stress and inadequate nutrition, have been associated with the methylation of specific genes in preterm newborns. It is known that a third of DNA methylation occurs in transposable elements (TE), among them, the Long Interspersed Nuclear Elements (LINE-1), which cover about 18% of the human genome, and their methylation profile can serve as a marker for changes in global DNA methylation. However, studies relating LINE-1 methylation levels to prematurity are scarce. In this context, this study aims to describe the global methylation profile of the LINE-1 promoter region in full-term and preterm newborns at different post-birth moments. This standard may be used as a reference in other studies, contributing to a better understanding of how prematurity can affect the health and development of these children from the point of view of epigenetics. The results obtained showed variations in LINE-1 methylation between term and preterm neonates, with preterm infants having lower methylation at birth, suggesting the influence of prematurity on initial epigenetic configuration. The differences observed between the groups seem to decrease in the first days of life. In addition, there was a tendency for increased LINE-1 methylation over time in preterm newborns, suggesting maturation of the epigenome in the first months of life. In conclusion, the analysis of LINE-1 methylation initiated in this study appears as a new epigenetic and molecular approach with potential impact as a biomarker in the study of prematurity and child development.

Keywords: Prematurity, epigenetics, DNA methylation, LINE-1, newborn.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Marcações epigenéticas -----	21
Figura 2: Metilação do DNA -----	22
Figura 3: Modificações em Histonas e acessibilidade do DNA -----	24
Figura 4: Fosforilação de histonas em processos celulares -----	25
Figura 5: <i>Histone code</i> -----	26
Figura 6: Classificação dos RNAs não codificantes -----	27
Figura 7: Principais classes de <i>transposons</i> eucarióticos -----	29
Figura 8: Estrutura e atividade de LINE -----	30
Figura 9: Representação filogenética do conjunto de dados genômicos -----	32
Figura 10: Filogenia dos mamíferos e presença de LINE-1 (L1) -----	33
Figura 11: Região promotora da família L1HS, específica de humanos -----	40
Figura 12: Análise da metilação do DNA -----	41
Figura 13: Visão geral simplificada das etapas chave do pirosequenciamento -----	43
Figura 14: Metilação global de LINE-1 em recém-nascidos a termo e pré-termos ao nascimento e no quinto dia de vida -----	48
Figura 15: Metilação global em recém-nascidos a termo, muito prematuros e em prematuros extremos ao nascimento, no quinto, trigésimo e nonagésimo dias de vida -----	49
Figura 16: Evolução temporal da metilação sítio-específica em recém-nascidos pré-termo nos sítios CpG 21, CpG 22, CpG 23 e CpG 24 do elemento transponível LINE-1 nos marcos de tempo D0, D5, D30 e D90 -----	50
Figura 17: Evolução temporal da metilação global em recém-nascidos pré-termo nos 4 sítios CpG de LINE-1 nos marcos de tempo D0, D5, D30 e D90 -----	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers para PCR e pirosequenciamento do elemento transponível LINE-1-----	42
Tabela 2: Dados sociodemográficos das gestantes e recém-nascidos -----	46
Tabela 3: Perfil de metilação no promotor de LINE-1 -----	47
Tabela 4: Comparação da porcentagem da metilação global de LINE-1 entre RN a termo, muito prematuros e prematuros extremos -----	48

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Artigo publicado – <i>Epigenomics</i> – Revista Qualis A2 – Fator de Impacto (2022) = 3,8 -----	72
Anexo 2 – Artigo submetido – <i>Epigenomics</i> – Revista Qualis A2 – Fator de Impacto (2022) = 3,8 -----	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 5mC – 5-metil-citosina
A – Nucleotídeo Adenina
ADP – Difosfato de adenosina
An – sinal e cauda de poliadenilação
ATP – Trifosfato de adenosina
C – Nucleotídeo Citosina
cDNA – DNA complementar
CEP – Comitê de ética em pesquisa
CGIs – Ilhas CpG
CH3 – Radical metila
circRNA – RNA circular
COCH3 – Radical acetila
CpG – Citosina seguida de uma Guanina
csv – *Comma Separated Values* (valores separados por vírgula)
D0 – dia do nascimento
D30 – trigésimo dia de vida
D5 – quinto dia de vida
D90 – nonagésimo dia de vida
DNA – Ácido desoxiribonucleico
DNAg – DNA genômico
Dnmts – DNA metiltransferase
DUM – Data da última menstruação
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EN – Endonuclease
EUA – Estados Unidos da América
G – Nucleotídeo Guanina
GIG – Grande para a idade gestacional
HDAC – Histonas desacetilases
HPA – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IDOR – Instituto D’Or de Pesquisa e Ensino
IPPMG – Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
LINEs – *Long interspersed nuclear element*
lncRNA – RNA longo e não codificante
LTRs – *Long terminal repeat retrotransposons*

MBPs – Proteínas ligadas à metilação
ME – Maternidade Escola
met – metilação
miRNA – micro RNA
mRNA – RNA mensageiro
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
ncRNA – RNA não codificante
NH4+ – Radical amônia
ORF – *Open Reading Frame*
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PIG – Pequeno para a idade gestacional
PO4 – Radical fosfato
PPi – Pirofosfato
RN – Recém-nascidos
RNA – Ácido ribonucleico
RNAi – RNA de interferência
RNP – Ribonucleoproteína
SAH – S-adenosil metionina
SAM – S-adenil metionina
SAM – S-Adenosil metionina
SINEs – *Small interspersed nuclear element*
siRNA – *small interference RNA*
SO3- – Trióxido de enxofre, óxido sulfúrico
SUMO – *Small Ubiquitin-Like modifier*
T – Nucleotídeo Timina
T CD8+ – Linfócito T citotóxico CD8
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEA – Transtorno do Espectro Autista
TEs – Elemento transponível
TR – Transcriptase reversa
TSD – *Target Site Duplication* (Duplicação do Sítio Alvo)
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
UN IGME – United Nations Inter-Agency Group for Child Mortality Estimation
URT – *Untranslated Region* (Região não traduzida)
USG – Ultrassonografia
UTIN – Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal

SUMÁRIO

1	Introdução -----	15
2.	Fundamentos conceituais -----	17
2.1	Prematuridade -----	17
2.2	Epigenética -----	19
2.2.1	<i>Metilação no DNA -----</i>	21
2.2.2	<i>Modificações pós-traducionais em histonas -----</i>	23
2.2.3	<i>RNAs não codificantes -----</i>	26
2.3	Elementos transponíveis do DNA -----	28
2.3.1	<i>LINE-1 -----</i>	30
2.3.2	<i>LINE-1 como marcador indireto de metilação global no DNA -----</i>	33
3	Justificativa -----	35
4	Objetivos -----	36
4.1	Objetivo geral -----	36
4.2	Objetivos específicos -----	36
5	Métodos -----	37
5.1	Características gerais do estudo e da coorte -----	37
5.1.1	<i>Desenho do estudo -----</i>	37
5.1.2	<i>Local do estudo -----</i>	37
5.1.3	<i>População do estudo -----</i>	37
5.1.4	<i>Critérios de inclusão -----</i>	38
5.1.5	<i>Critérios de exclusão -----</i>	38
5.1.6	<i>Critérios de perda -----</i>	38
5.1.7	<i>Aspectos éticos -----</i>	38
5.2	Coleta de material biológico -----	38
5.3	Extração e quantificação do DNA -----	39
5.4	Escolha da região alvo -----	39
5.5	Modificação com bissulfito de sódio -----	40
5.6	Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese -----	42
5.7	Pirosequenciamento e análise de metilação nos sítios CpG -----	42
5.8	Análise estatística -----	44
6	Resultados -----	46
6.1	Características epidemiológicas e clínicas da população de estudo -----	46
6.2	Percentual de metilação nos diferentes marcos de tempo -----	47
6.3	Evolução temporal da metilação do DNA em recém-nascidos pré-termo -----	50

7	Discussão -----	52
8	Conclusão -----	57
	Referências -----	58
	Anexo 1 – Artigo publicado -----	72
	Anexo 2 – Artigo submetido -----	89

1 INTRODUÇÃO

O nascimento prematuro, definido pela Organização Mundial da Saúde como o parto que ocorre antes de 37 semanas de gestação, representa uma fronteira desafiadora na saúde materno-infantil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). Além das implicações clínicas imediatas, a prematuridade pode ter repercussões duradouras, influenciando o padrão de desenvolvimento e saúde das crianças (OHUMA E; MOLLER A-B; BRADLEY E, 2023; UNITED NATIONS INTER-AGENCY GROUP FOR CHILD MORTALITY ESTIMATION (UN IGME), 2023). A interseção da prematuridade com a epigenética oferece uma janela para compreender a interação entre a genética e os fatores ambientais que influenciam esses desfechos. A metilação do DNA, uma das principais marcas epigenéticas, surge como um mediador crítico dessas interações, modulando a expressão gênica em resposta ao ambiente intrauterino e possivelmente, delineando o curso do desenvolvimento pós-natal (JAIN et al., 2022).

A reprogramação epigenética é particularmente evidente nas células-tronco, onde a metilação do DNA é remodelada para permitir a pluripotência ou para conferir características celulares especializadas (VAIDYA et al., 2023). Durante o desenvolvimento embrionário, os LINE-1 podem influenciar esse processo de várias maneiras. Evidências sugerem que os LINE-1 ativos podem ser expressos em células-tronco embrionárias e em estágios precoces do desenvolvimento. A atividade de mobilização desses elementos pode levar a inserções em regiões regulatórias de genes, o que poderia afetar a regulação gênica e contribuir para a diversidade celular (KOHLRAUSCH et al., 2022a). No entanto, a atividade desregulada ou excessiva de LINE-1 durante a embriogênese pode resultar em rearranjos cromossômicos e instabilidade genômica, contribuindo para desfechos adversos, como anomalias no desenvolvimento embrionário, distúrbios congênitos e até mesmo aborto espontâneo (RAMOS; BOJANG; BOWERS, 2021).

Os avanços no campo da epigenética têm ampliado nossa compreensão de como as modificações epigenéticas podem afetar a saúde de neonatos prematuros. Os LINE-1, que constituem uma porção significativa do genoma humano, têm sido associados a variações na metilação global do DNA e, consequentemente, à regulação da expressão gênica (SHADEMAN et al., 2020). Embora estudos tenham explorado a metilação do DNA em diversos contextos, há uma carência de pesquisas que relacionem especificamente os níveis de metilação de elementos transponíveis como o LINE-1 à prematuridade. Recentemente, Fontana et al. descreveram a metilação diferencial do LINE-1 em recém-nascidos a termo comparados aos pré-termo, sugerindo uma influência epigenética notável da prematuridade na configuração inicial do

genoma (FONTANA et al., 2021). Até onde é do nosso conhecimento, não há outros estudos abordando este tema.

Diante dessa lacuna, o presente estudo objetiva delinear o perfil de metilação global do promotor de LINE-1 em neonatos pré-termo e a termo em diversos momentos pós-nascimento, além de estratificar este perfil entre os níveis de prematuridade. Através da análise das variações na metilação do LINE-1, busca-se contribuir para um entendimento mais aprofundado dos efeitos epigenéticos da prematuridade, oferecendo novas perspectivas sobre fatores que possam influenciar o desenvolvimento infantil.

2 FUNDAMENTOS CONCEITUAIS

2.1 Prematuridade

Globalmente, cerca de 1 a cada 10 neonatos nascem prematuros (< 37 semanas de gestação). Estima-se que a cada 2 segundos nasça uma criança prematura (OHUMA E; MOLLER A-B; BRADLEY E, 2023). Em 2020, cerca de 1 milhão de prematuros morreram devido as complicações do nascimento precoce, e por isso, é o maior causador de morte entre crianças menores de 5 anos e responsável por mais de um terço das mortes neonatais (durante o primeiro mês de vida) (UNITED NATIONS INTER-AGENCY GROUP FOR CHILD MORTALITY ESTIMATION, 2023). Em 2022, de acordo com informações provenientes do DataSUS, o número de partos prematuros registrados no Brasil atingiu a marca de 292.715. Ainda que nos últimos 10 anos, a taxa de prematuridade tenha decrescido de 12% em 2010 para 11,1% em 2020, o país continua ocupando a décima posição no cenário global neste indicador (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023).

Os recém-nascidos (RN) pré-termo costumam ser classificados, segundo a idade gestacional (IG), em prematuros extremos (< 28 semanas), muito prematuros (≥ 28 até 31 semanas e 6 dias) e prematuros moderados (≥ 32 semanas até 36 semanas e 6 dias). O RN pré-termo moderado pode ainda ser subcategorizado em RN pré-termo tardio (34 a <37 semanas completas) (BLENCOWE et al., 2012; DEPARTAMENTO CIENTÍFICO DE NEONATOLOGIA, 2019). Por outro lado, o parto prematuro pode ser classificado em dois grupos principais: (1) parto prematuro espontâneo e (2) parto prematuro induzido, que é definido como indução do trabalho de parto ou cesárea eletiva antes de se completar as 37 semanas de gestação por diversos motivos como indicações maternas, fetais ou qualquer outra razão não médica (GOLDENBERG, GRAVETT, et al., 2012).

As causas primárias da prematuridade abrangem uma variedade de fatores. Entre os fatores maternos, destacam-se idades extremas, tabagismo, alcoolismo, uso de drogas, infecções maternas e condições médicas maternas, como diabetes gestacional, hipertensão arterial, doenças renais e autoimunes, assim como complicações da gravidez, como a pré-eclâmpsia, o descolamento prematuro da placenta e a restrição do crescimento fetal, podem desempenhar papel significativo. Além disso, outros fatores podem influenciar o parto prematuro, como o baixo status socioeconômico e o acesso limitado a cuidados pré-natais, histórico de partos prematuros, gravidez múltipla, estresse crônico e falta de suporte social (REZENDE, 2024).

No entanto, é possível adotar medidas preventivas ou mitigadoras em relação ao nascimento prematuro. O estilo de vida materno pode ser ajustado para impactar positivamente o desenvolvimento do feto, incluindo a redução do consumo de cigarros, álcool e drogas (LASSI et al., 2014; SHAPIRO-MENDOZA et al., 2016; WILSON et al., 2020). Além disso, a nutrição durante a gestação desempenha um papel fundamental, com nutrientes como ácido fólico, ferro, cálcio, vitamina D, ômega-3 e proteínas desempenhando funções essenciais. O ácido fólico, por exemplo, é notável por sua contribuição na prevenção de defeitos no tubo neural e no desenvolvimento do sistema neural do feto, enquanto também influencia a regulação do perfil de metilação em promotores genômicos (DEL CASTILLO-MATAMOROS; POVEDA, 2021; GRENIER et al., 2021; MISAN et al., 2019). Investir em cuidados pré-natais é outra abordagem importante, visto que esses cuidados podem identificar antecipadamente complicações e fatores de risco, permitindo intervenções adequadas para evitar partos prematuros (VINK; GYAMFI-BANNERMAN, 2017; VITNER et al., 2020). Finalmente, a gestão eficaz do estresse também se revela vital. O estresse crônico, caracterizado pela exposição prolongada a níveis elevados de estresse, pode resultar em consequências negativas para a saúde, possivelmente aumentando a probabilidade de partos prematuros (KIM, 2022; TRAYLOR et al., 2020).

No contexto da gestação, o estresse crônico pode influenciar o risco de parto prematuro de diversas maneiras. Primeiramente, desencadeia a ativação do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA), levando a uma resposta de "luta ou fuga" que resulta na liberação de hormônios como o cortisol. Quando essa resposta é ativada cronicamente, pode desequilibrar os níveis hormonais da gestante, gerando alterações no útero e colo do útero (VAN DEN BERGH, VAN DEN HEUVEL, et al., 2020). Além disso, o estresse crônico está associado a um estado inflamatório persistente no corpo, influenciando as vias de comunicação entre o sistema imunológico, hormonal e o sistema reprodutivo. Essa interação inflamatória pode contribuir para ocorrência de contrações uterinas precoces (BARRETT et al., 2021; GYLLENHAMMER et al., 2021; RAJASEKHARAN et al., 2023; SUFF et al., 2023). O funcionamento do sistema nervoso autônomo também pode ser impactado pelo estresse crônico, regulando funções automáticas como frequência cardíaca e pressão arterial. Indiretamente, isso pode influenciar a função uterina e atividade contrátil (GOLDSTEIN, 2021; TRAYLOR et al., 2020; TSIGOS et al., 2000). Adicionalmente, o estresse crônico pode levar a comportamentos de enfrentamento inadequados, como tabagismo, consumo excessivo de álcool, dieta inadequada e falta de atividade física (FAREWELL et al., 2018; FEE et al., 2020).

A prematuridade tem repercussões significativas no desenvolvimento dos recém-nascidos, variando em gravidade conforme o grau de prematuridade, complicações associadas e

intervenções médicas realizadas. Entre os efeitos estão atrasos no desenvolvimento motor e sensorial, problemas respiratórios e cardíacos devido à imaturidade dos pulmões e sistema cardiovascular, atrasos cognitivos, dificuldades na linguagem e comunicação, possíveis problemas de saúde em longo prazo, desafios sociais e emocionais, além da necessidade de intervenções terapêuticas (HUNT, HICKEY, et al., 2018; SUTTORA, GUARINI, et al., 2020). Esses impactos podem gerar não apenas ônus financeiro para as famílias, mas também desafios emocionais duradouros. Portanto, compreender e abordar adequadamente essas implicações é essencial para garantir o bem-estar e desenvolvimento saudável das crianças prematuras e suas famílias (KUSTERS, 2013; VAN DEN BERGH, 2020; PRAVIA & BENNY, 2020).

Além das causas e das consequências tradicionais da prematuridade, as pesquisas atuais têm explorado como as influências epigenéticas podem também influenciar na determinação da suscetibilidade à prematuridade e nos desfechos de saúde associados (JAIN, MONANGI, et al., 2022). Esse vínculo entre a prematuridade e a epigenética pode lançar luz sobre as complexas interações entre genética e ambiente, e como as modificações epigenéticas podem estar envolvidas na regulação de vias biológicas críticas durante o desenvolvimento fetal (JAIN et al., 2022; TOBI et al., 2015).

2.2 Epigenética

Em 1939, Conrad Waddington introduziu o termo 'panorama epigenético' e propôs a utilização da palavra 'epigenética' para abranger os mecanismos moleculares que convertem traços genômicos em fenótipos (HENIKOFF, 2023; WADDINGTON, 2009). Mais recentemente, o campo da Epigenética tem sido definido como o estudo das modificações genéticas potencialmente herdáveis que influenciam a expressão gênica e o fenótipo sem alterar a sequência genômica do DNA (FRIDOVICH-KEIL; ROGERS, 2024; NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, 2024; WU CT; MORRIS, 2001). Essas modificações epigenéticas desempenham um papel fundamental na regulação dos processos celulares, moldando a diferenciação e a especialização celular ao longo do desenvolvimento e da vida do organismo (CHAUVISTRÉ; SERÉ, 2020; GIACOMAN-LOZANO et al., 2022; SUN et al., 2021). Através da ativação ou inibição de vias e moléculas, esses mecanismos influenciam tanto eventos celulares fisiológicos quanto patológicos (DELGADO-MORALES et al., 2017; LACAL; VENTURA, 2018; RIDEOUT; EGGAN, 2001; JAENISCH, 2001; SUN et al., 2021).

Essa interação entre o genoma e o ambiente não apenas fornece uma compreensão mais profunda da diversidade fenotípica, mas também explora a plasticidade das respostas celulares a estímulos externos (VOGTT, 2022; YANG; ANDREW POSPISILIK, 2019). A modulação da

expressão gênica por meio de modificações epigenéticas é essencial para a adaptação dos organismos às mudanças ambientais, sendo também um ponto central na medicina moderna, uma vez que pode desencadear diversas doenças e implicar em condições congênitas variadas (KEVERNE; BINDER, 2020; PEEDICAYIL, 2023). Desde a observação inicial por Griffith e Mahler em 1969 sobre a metilação do DNA no cérebro e sua possível conexão com a memória de longa duração, o entendimento sobre modificações epigenéticas, incluindo metilação, tem evoluído significativamente (BERNSTEIN, 2022). Estas alterações genômicas não se restringem apenas ao sistema nervoso, mas são também essenciais em diversos contextos biológicos, como na memória metabólica relacionada ao tecido adiposo, na persistência de células T CD8+ após a exposição imunológica, e nos mecanismos de memória do sistema imune (KATO; NATARAJAN, 2019; MITTELSTAEDT et al., 2021; MONTACCHIESI; PACE, 2022).

Além da metilação do DNA, outras alterações epigenéticas, como modificações nas histonas e RNAs não codificantes (ncRNAs), também desempenham um papel importante. Essas modificações alteram a acessibilidade ao DNA associado às histonas (nucleossoma), influenciando a conformação tridimensional do genoma e a regulação da expressão gênica (Figura 1) (LI, ZHANG, 2014). O crescente interesse nessas variações epigenéticas resultou na descoberta de sua associação com uma ampla gama de doenças, desde autoimunidade até câncer, passando por doenças congênitas, deficiência intelectual, doenças endócrinas, desordens neuropsiquiátricas e outras. Essas descobertas destacam o papel fundamental da epigenética no entendimento das bases moleculares de diversas condições de saúde e doença (GAWRA et al., 2023; MAZZONE et al., 2019; NEBBIOSO et al., 2018).

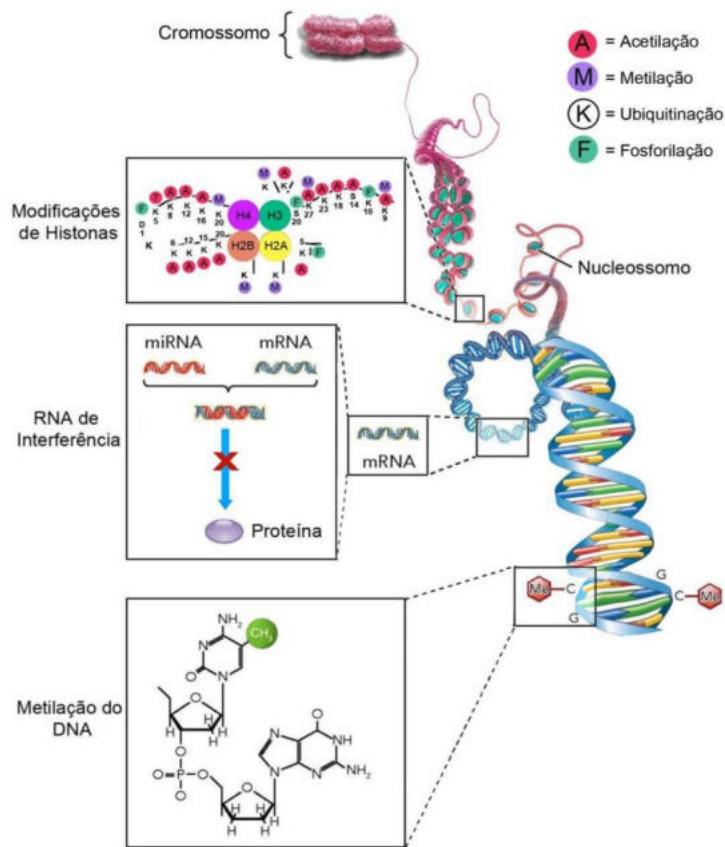


Figura 1: Marcações epigenéticas. As modificações em histonas as quatro principais marcações: acetilação, metilação, ubiquitinação e fosforilação das caldas das histonas. Os RNAs de interferência atuam bloqueando a tradução de mRNAs, enquanto a metilação das citosinas ocorre nas ilhas CpGs (*Fonte*: “Molecular Biology of the Cell - NCBI Bookshelf”, [s.d.]).

As modificações epigenéticas em um organismo também afetam a expressão gênica e os fenótipos de suas gerações futuras. Essas influências são transmitidas através da linha germinativa, afetando o material genético que é passado para a descendência (TAKAHASHI, MORALES VALENCIA, et al., 2023). Exposições ambientais, como dieta, estresse e toxinas, podem alterar os padrões epigenéticos não apenas no indivíduo exposto, mas também nas gerações subsequentes. Esse fenômeno levanta questões intrigantes sobre como as experiências de uma geração podem ecoar ao longo do tempo, impactando o desenvolvimento e a saúde das gerações futuras (HÜBEL et al., 2019).

2.2.1 Metilação do DNA

A metilação no DNA é catalisada por uma família de DNA metiltransferases (Dnmts), que transferem o grupamento metil (-CH₃) da S-adenosil metionina (SAM) para o quinto carbono

de uma citosina, formando a 5 metil citosina (5mC) (Figura 2) (MAHMOUD; ALI, 2019). Esse processo de metilação desempenha um papel fundamental na regulação da expressão gênica, influenciando a atividade dos promotores genômicos e ocorre, principalmente, em regiões do genoma chamadas de ilhas CpG (CGIs) que contêm uma alta densidade de dinucleotídeos CpG (DHAR et al., 2021; GHOSH; KHETARPAL; SENAPATI, 2022). Em vertebrados, cerca de 70% dos promotores genômicos estão associados a CGIs, que consistem em citosinas seguidas de guaninas, sendo a classe predominante de promotores (ANGELONI; BOGDANOVIC, 2021).

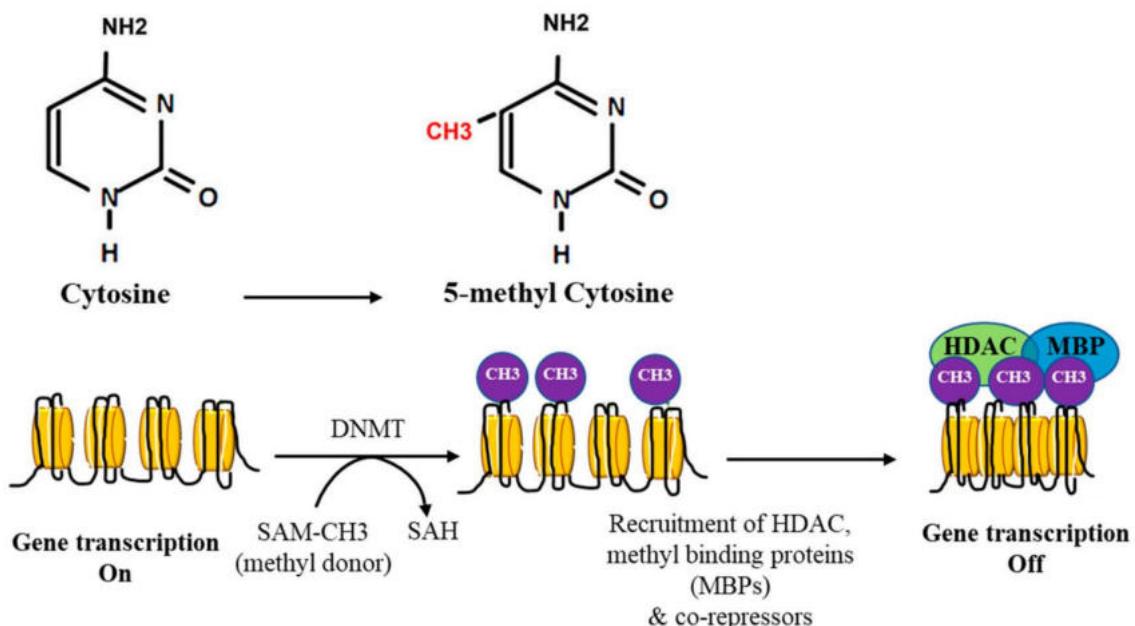


Figura 2: Metilação do DNA. Conformação de uma citosina e sua estrutura metilada em 5mC. O processo de metilação é catalisado pela ação das DNA metil transferases (Dnmt) ao retirar o radical metila (CH_3) de uma S-adenosil metionina (SAM) transformando-a em S-adenosil-homocisteína (SAH). Durante esse processo, ocorre o recrutamento das proteínas HDAC e de proteínas ligadas a metilação (MBPs) que impedem a ligação de fatores de transcrição.
Fonte: Adaptado de MAHMOUD, ALI, 2019.

Vale destacar que a presença ou ausência de metilação nas CGIs têm impactos diferentes na regulação gênica. Enquanto a ausência de metilação não necessariamente desencadeia a transcrição do gene alvo, a metilação de CGIs pode interferir na expressão do gene, bloqueando indiretamente a ligação de fatores de transcrição ao promotor (ANASTASIADI; ESTEVE-CODINA; PIFERRER, 2018). Quando ocorre a metilação de todas as CGIs nos promotores, o gene alvo experimenta um silenciamento estável de sua expressão, e isso pode estar relacionado à compactação do DNA em torno das histonas (KIROV et al., 2015; MA et al., 2023; MANJEGOWDA; GUPTA; LIMAYE, 2017).

A metilação do DNA não é um processo estático, mas sim um mecanismo dinâmico que pode ser influenciado por fatores ambientais e alterado ao longo do tempo, desempenhando um papel vital na plasticidade da regulação gênica (SUELVES et al., 2016; XIE et al., 2023). A metilação do DNA não se restringe apenas às ilhas CpG, mas também ocorre em outros contextos genômicos, por exemplo, em elementos transponíveis, como os *retrotransposons*, que também podem ser alvos de metilação (PAPPALARDO; BARRA, 2021; SARKAR; LANCIANO; CRISTOFARI, 2023). Esses elementos repetitivos são amplamente distribuídos no genoma e, quando metilados, podem inibir sua mobilidade e atenuar seu impacto sobre a integridade genômica (TAM; LEUNG, 2023). A metilação de *retrotransposons* é essencial para manter a estabilidade genômica e prevenir rearranjos cromossômicos indesejados (BHAT et al., 2022). A metilação do DNA não se limita exclusivamente as regiões regulatórias (promotores), mas também pode ocorrer nas regiões codificantes dos genes. A metilação fora da região regulatória tem sido associada ao controle da elongação da transcrição, modulando a eficiência da síntese de RNA (QING et al., 2023).

Além de sua influência na expressão gênica, a metilação do DNA desempenha um papel no desenvolvimento embrionário e na diferenciação celular. Durante o desenvolvimento, as mudanças nos padrões de metilação são responsáveis por direcionar as células para trajetórias específicas de diferenciação (LI et al., 2021; SLIEKER et al., 2015; SUELVES et al., 2016). A reprogramação epigenética é particularmente evidente nas células-tronco, onde a metilação do DNA é remodelada para permitir a pluripotência ou para conferir características celulares especializadas (VAIDYA et al., 2023). A plasticidade da metilação do DNA é observada em resposta a fatores ambientais, como dieta, exposição a toxinas e estresse. Esses estímulos ambientais podem causar alterações nos padrões de metilação, influenciando a regulação gênica e a suscetibilidade a doenças (HÄMÄLÄ et al., 2022).

2.2.2 Modificações pós-traducionais em histonas

Os processos epigenéticos envolvidos nas modificações pós-traducionais em histonas representam uma série de transformações químicas específicas nas histonas, proteínas que desempenham um papel fundamental na organização estrutural do DNA nos cromossomos. Como uma espécie de "assinatura molecular", essas modificações têm uma função na moldagem da acessibilidade do DNA e, por conseguinte, na regulação da expressão gênica (ZHANG et al., 2020).

Entre essas modificações, algumas são protagonistas, como a metilação, que envolve a adição de grupos metil (-CH₃) em pontos específicos dos resíduos de aminoácidos nas histonas.

A dualidade desta marca molecular torna-a capaz de ativar ou reprimir a expressão de genes, dependendo da sua localização na histona, além de ser uma marca para a manutenção da integridade genômica (GIAIMO et al., 2019; LIU et al., 2023; MUSHTAQ et al., 2021). Outra modificação, a acetilação, se traduz na incorporação de grupos acetila (-COCH₃) em resíduos a 3 de aminoácidos, geralmente lisinas, presentes nas histonas. Esta marca está intimamente associada à abertura da estrutura da cromatina e ao desencadeamento da transcrição gênica, tornando a molécula de DNA mais acessível às maquinárias moleculares de transcrição (Figura 3) (ANNUNZIATO; HANSEN, 2000; LONG et al., 2021; VERDONE; CASERTA; DI MAURO, 2005).

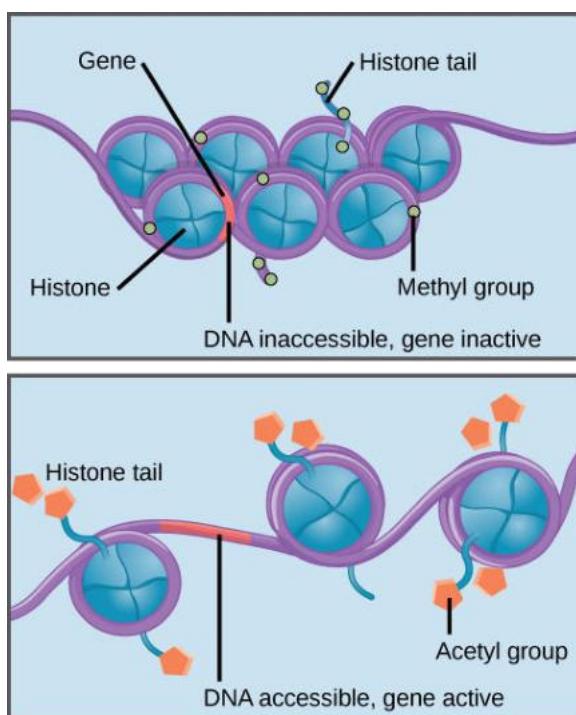


Figura 3: Modificações em histonas e acessibilidade do DNA. A parte superior da figura mostra a metilação das caudas das histonas, resultando em DNA inacessível e gene inativo. A parte inferior da figura ilustra a acetilação das caudas das histonas, tornando o DNA acessível e o gene ativo (*Fonte:* WIKIMEDIA COMMONS, [s.d.]).

A fosforilação, por sua vez, é um processo de anexação de grupos fosfato (-PO₄) em determinados resíduos de aminoácidos nas histonas. Esta modificação tem uma forte presença na regulação de processos celulares como a divisão, influenciando também a arquitetura da cromatina e desempenhando ainda, um papel como marcador de dano ao DNA (Figura 4) (KOMAR; JUSZCZYNSKI, 2020; OKI; AIHARA; ITO, 2007; SHARMA; SINGH; ALMASAN, 2012).

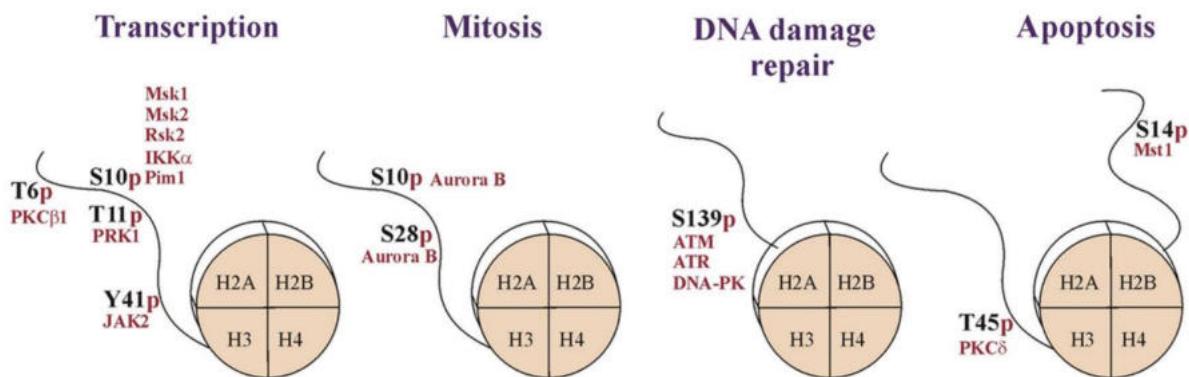


Figura 4: Fosforilação de histonas em processos celulares. A fosforilação das histonas H3, H2AX e H2B está implicada na regulação de diversos processos celulares, incluindo a transcrição, condensação da cromatina durante a mitose, resposta a danos no DNA e apoptose. Os octámeros de histonas e suas caudas modificadas são apresentados esquematicamente. As enzimas responsáveis por essas modificações (em vermelho) e os locais de fosforilação estão indicados (Fonte: COHEN et al., 2011).

A ubiquitinação envolve a adição da proteína ubiquitina às histonas. Esta alteração exerce um impacto variável sobre a regulação genética e a organização da cromatina (WEAKE; WORKMAN, 2008). As histonas H2A e H2B são frequentemente alvo de ubiquitinação. A ubiquitinação da histona H2B, por exemplo, está associada à ativação da transcrição gênica, enquanto a ubiquitinação da histona H2A pode estar envolvida na repressão da transcrição (MATTIROLI; PENENGO, 2021).

A sumoilação envolve a adição de grupos SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*), pequenas proteínas modificadoras relacionadas à ubiquitina, às histonas. Esta marca também influencia a arquitetura da cromatina e a regulação genética (RYU; HOCHSTRASSER, 2021). A ADP-ribosilação, uma outra marcação, ocorre quando grupos ADP-ribose são acrescentados às histonas. Este processo está intrinsecamente relacionado com funções como o reparo de DNA e a resposta a danos celulares (ZHA; TANG; WANG, 2021).

Essas modificações pós-traducionais formam um código epigenético que influencia quais genes são ativados ou silenciados em células diferentes e em resposta a sinais ambientais (Figura 5). O *Histone Code* regula a acessibilidade do DNA e a expressão gênica, com as modificações interagindo em uma rede complexa, podendo ter efeitos sinérgicos ou antagônicos (MILLÁN-ZAMBRANO et al., 2022). Além disso, o *Histone Code* recruta proteínas regulatórias que reconhecem padrões específicos de modificações, desempenhando um papel fundamental na regulação epigenética e permitindo que as células interpretem sinais ambientais, ajustando a atividade gênica de maneira adaptativa (BARRAL; DÉJARDIN, 2023; JENUWEIN; ALLIS, 2001).

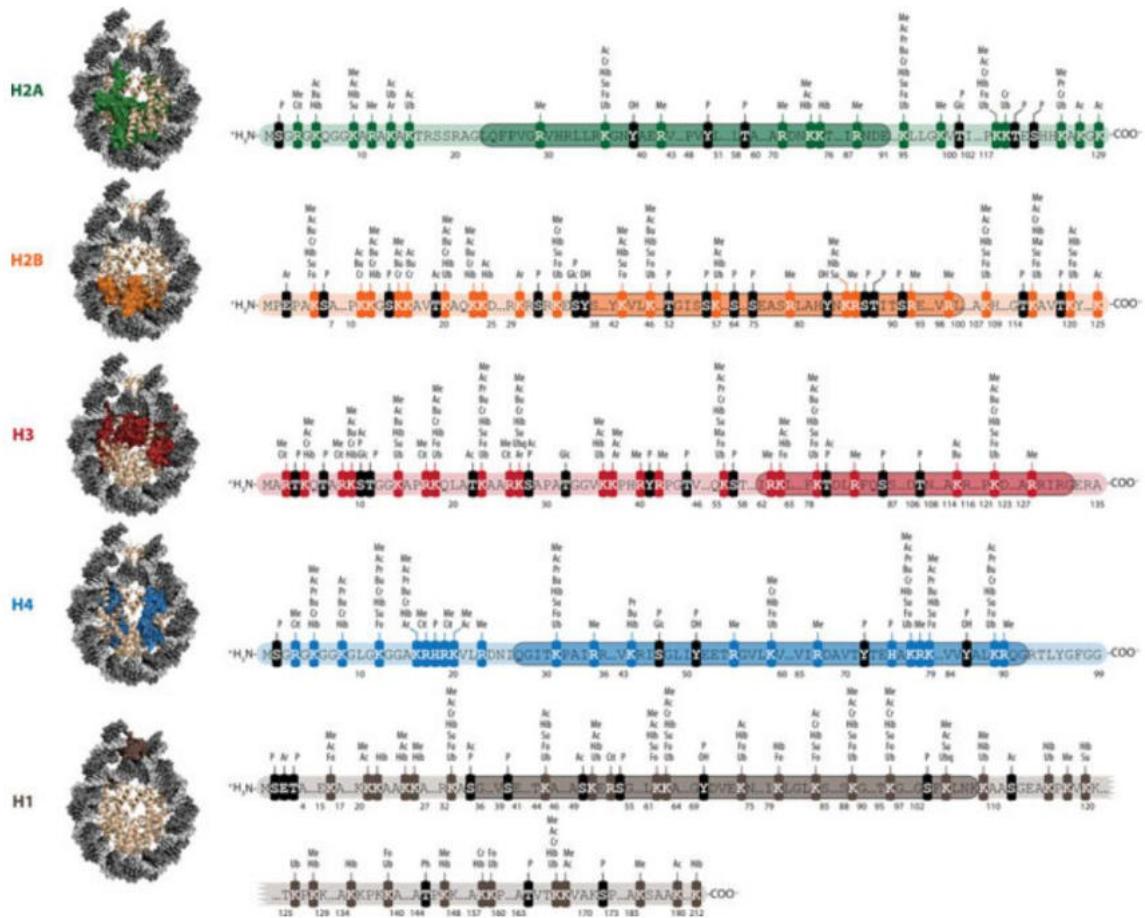


Figura 5: Histone Code. Todas as modificações pós-traducionais atualmente conhecidas das histonas formadoras de nucleossomos H2A, H2B, H3 e H4 e da histona linker H1 são indicadas. Os aminoácidos que podem ser modificados (K = lisina, R = arginina, S = serina, T = treonina, Y = tirosina, E = glutamato) estão destacados; a maioria deles pode carregar diferentes modificações, mas não simultaneamente. Me – metilação (K, R); Ac – acetilação (K, S, T); Pr – propionilação (K); Bu – butirilação (K); Cr – crotonilação (K); Hib – 2-hidroxibutirilação (K); Ma – malonilação (K); Su – succinilação (K); Fo – formilação (K); Ub – ubiquitinação (K); Cit – citrulinação (R); Ph – fosforilação (S, T, Y, H); OH – hidroxilação (Y); Glc – glicosilação (S, T); Ar – ADP-ribosilação (K, E) (Fonte: CARLBERG; MOLNÁR, 2018).

2.2.3 RNAs não codificantes

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são moléculas de RNA que não são traduzidas em proteínas, ao contrário dos RNAs mensageiros (mRNAs), que carregam informações genéticas para a síntese de proteínas. Os ncRNAs desempenham várias funções regulatórias e estruturais nas células, e um desses papéis está relacionado aos mecanismos epigenéticos (GOOD, 2023; MATTICK; MAKUNIN, 2006). Existem diferentes classes de ncRNAs envolvidos em mecanismos epigenéticos, dentre eles estão: i) os RNAs de interferência (RNAi) que incluem dois grupos de sequências, os RNAs pequenos de interferência (siRNAs) e os micro RNAs (miRNAs); ii) os RNAs longos e não codificantes (lncRNAs), iii) os RNAs circulares (circRNAs) e, iv) os RNAs antissensos (Figura 6).

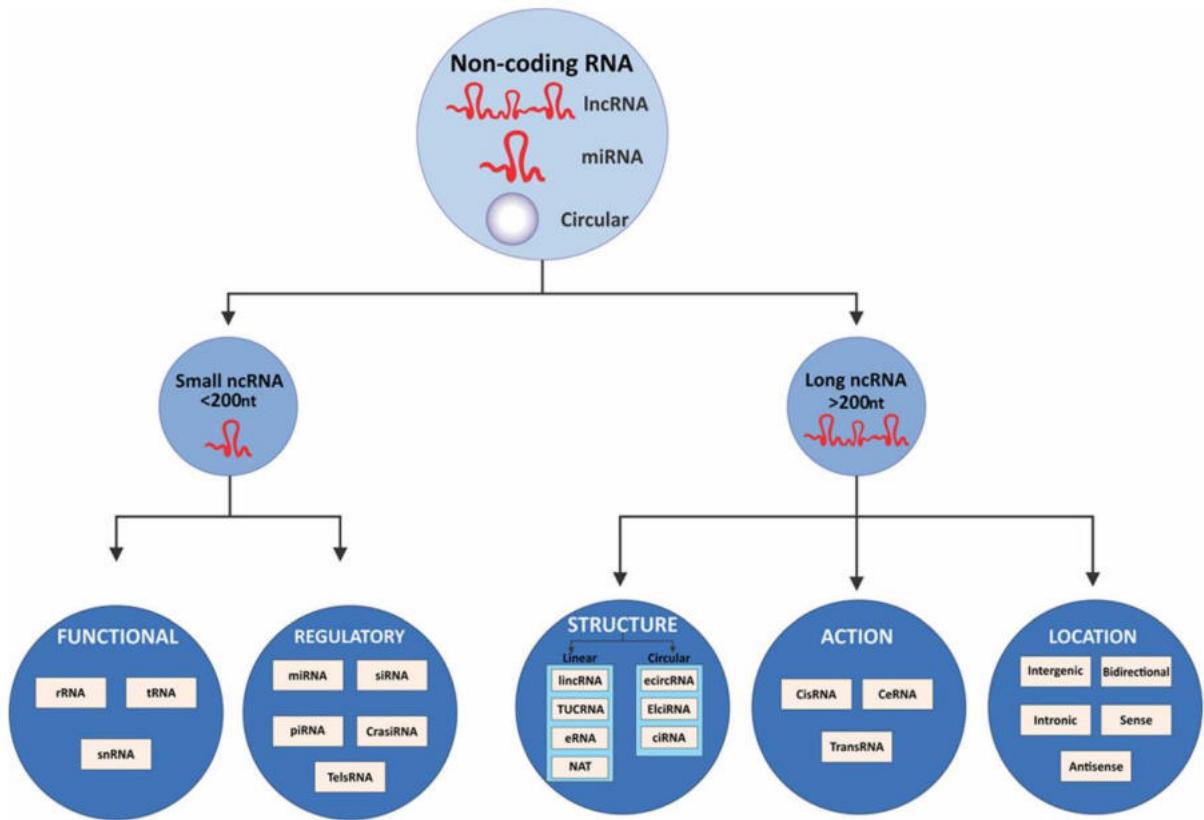


Figura 6: Classificação dos RNAs não codificantes (ncRNAs). Os RNAs não codificantes são classificados em pequenos ncRNAs (< 200 nucleotídeos) ou longos ncRNAs (> 200 nucleotídeos) com base em seu comprimento. Os pequenos ncRNAs são subdivididos em RNAs funcionais e regulatórios, enquanto os longos ncRNAs são classificados de acordo com sua estrutura, função e localização (Fonte: BHAT et al., 2020).

As modificações epigenéticas que envolvem os RNAi representam uma interseção entre os mecanismos de regulação da expressão gênica e a epigenética. Os RNAi são pequenas moléculas de RNA não codificante que participam na regulação pós-transcricional da expressão gênica. Eles funcionam principalmente através do emparelhamento de bases complementares com sequências-alvo nos mRNAs, levando à degradação do mRNA ou à inibição da tradução, resultando em uma diminuição da expressão do gene-alvo (DYKES; EMANUELI, 2017; MANGIAVACCHI; MORELLI; ORLANDO, 2023; RINN; CHANG, 2012).

Os RNAs longos e não codificantes (lncRNAs), que pertencem a classe dos ncRNAs, são definidos por sua extensão, superando 200 nucleotídeos. Ao desempenhar múltiplas funções regulatórias, os lncRNAs influenciam a expressão gênica por meio de mecanismos diversos, tais como: i) modulação da transcrição de genes ao recrutar proteínas regulatórias, ii) interação com a cromatina e modificação de sua estrutura, iii) atuação no ajuste de níveis de miRNAs disponíveis para interagir com mRNAs, iv) função de guias ao direcionar complexos proteicos a locais genômicos específicos, impactando a remodelação da cromatina, e v) participação na

formação de estruturas tridimensionais no núcleo celular, influenciando a organização espacial do genoma (BRIDGES; DAULAGALA; KOURTIDIS, 2021; FANG; FULLWOOD, 2016; RINN; CHANG, 2012).

Os RNAs circulares (circRNAs), são uma classe de RNAs não codificantes que formam uma estrutura circular fechada. Embora inicialmente considerados como produtos de *splicing* defeituoso, pesquisas recentes revelaram que eles têm papéis regulatórios. Em termos epigenômicos, os circRNAs desempenham um papel significativo ao influenciar as modificações epigenéticas, como a interação com micro RNAs (miRNAs), bem como a interação com proteínas envolvidas na modificação da cromatina. Além disso, eles podem influenciar a regulação da metilação do DNA e servir como guias para direcionar complexos proteicos a locais específicos no genoma, contribuindo assim para a remodelação da cromatina e influenciando a regulação epigenética (CHEN; YANG, 2015; LI et al., 2017; MEHTA; DEMPSEY; VEMUGANTI, 2020).

Por fim, os RNAs antissensos (Antisense RNAs) pertencem a uma classe de moléculas de RNA que são transcritas a partir do DNA complementar a um gene alvo específico. Eles têm a capacidade de se parear com o mRNA do gene alvo, formando assim uma interação RNA-RNA. Esse pareamento pode levar à regulação da expressão gênica, interferindo na tradução do mRNA ou promovendo sua degradação. Esses RNAs desempenham um papel importante na modulação da expressão gênica em uma variedade de processos biológicos (BAJAN; HUTVAGNER, 2020; XU; ZHANG; ZHANG, 2018).

2.3 Elementos transponíveis do DNA

Os elementos transponíveis (TEs, do inglês *transposable elements*), são sequências de DNA que podem se transpor em diferentes regiões do genoma. Foram descobertos por Barbara McClintock ao observar um *locus* mutado em milhos. Esses elementos se transportavam de um cromossomo a outro e podiam mudar o padrão de expressão de genes ao seu redor (FESCHOTTE, 2023; MCCLINTOCK, 1950). Em 2003, uma pesquisa sobre esses TEs os categorizou na classe II de DNA transponível (CORNÉ; POIRIER, 2023; REZNIKOFF, 2003).

Os TEs são divididos em duas grandes classes, a classe I engloba todos os *retrotransposons*, estes são TEs que se movem dentro do genoma através de um mRNA. O RNA transcrito é revertido em DNA complementar (cDNA) pela enzima transcriptase reversa e, em seguida, inserido em um novo local do genoma. Já a classe II, são *transposons* também conhecidos como "genes saltadores", pois são capazes de se mover diretamente de um local para outro no genoma

(FESCHOTTE, 2023; WICKER *et al.*, 2007). A principal forma de repressão da expressão dos TEs envolve a metilação das CGIs na região promotora dos mesmos (Figura 7) (BODAK; YU; CIAUDO, 2014; LEE; AYARPADIKANNAN; KIM, 2015; PAPIN *et al.*, 2023).

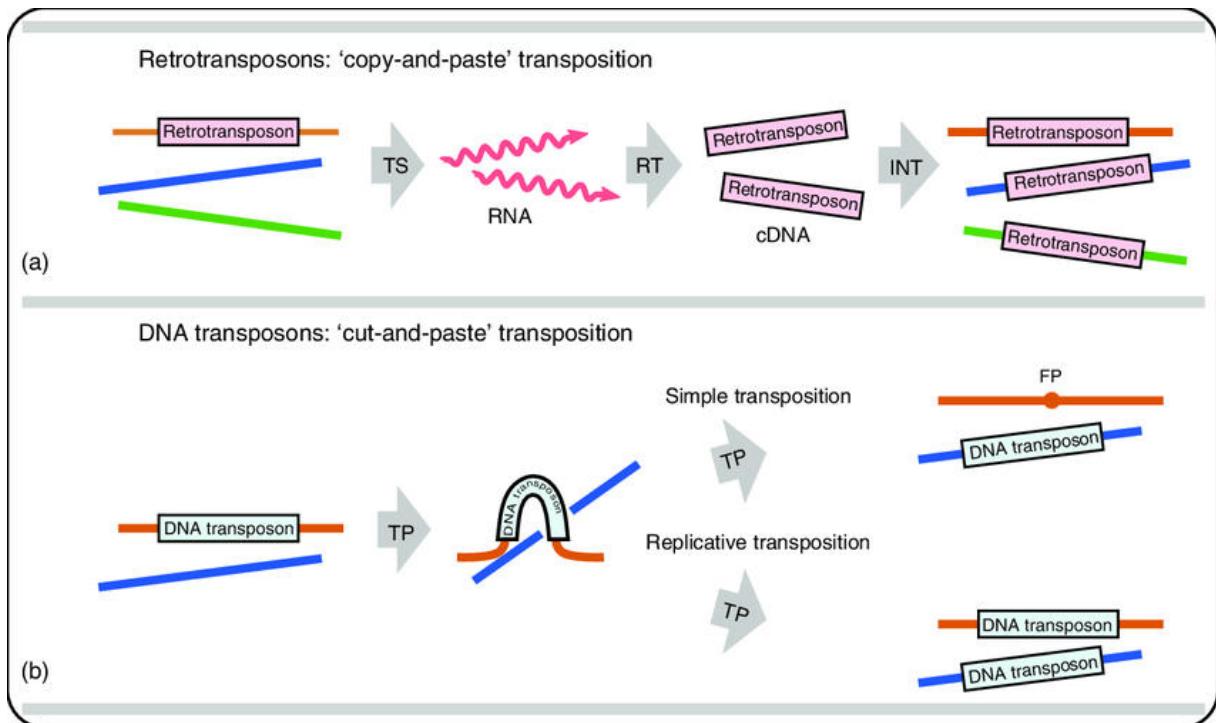


Figura 7: Principais classes de transposons eucarióticos. (a) Retrotransposons (classe I) transponem-se por um mecanismo de 'copiar e colar', onde são transcritos em RNA, convertidos em cDNA e integrados em novas posições no genoma. (b) Transposons de DNA (classe II) utilizam um mecanismo de 'cortar e colar', onde são excisados do sítio doador e reintegrados no DNA alvo, muitas vezes resultando em pequenas mutações no sítio original (Fonte: WANG; KUNZE, 2015).

Existem três principais grupos de TEs de classe I, que são os LINEs (em inglês, *Long Interspersed Nuclear Elements*) que compõe 20% do DNA genômico e são *retrotransposons* autônomos, pois em sua sequência possuem o código de produção da enzima transcriptase reversa, e outras proteínas que auxiliam a transcrição de RNA de line em cDNA e em sua inserção no genoma. O principal elemento desse grupo é o LINE-1 (KINES; BELANCIO, 2012; MARTIN, 1991; ZHANG; ZHANG; YU, 2020). Os SINEs (em inglês, *Short Interspersed Nuclear Elements*) são TEs dependentes de LINEs para se mobilizar, são curtos e não possuem as principais proteínas que auxiliariam esse processo. São *retrotransposons* pois sua mobilidade depende da transcrição de RNA em cDNA. O elemento Alu é o SINE mais abundante do genoma humano compreendendo cerca de 11% do genoma (KOJIMA, 2018; RICHARDSON *et al.*, 2015). Adicionalmente, os LTRs (em inglês, *Long Terminal Repeat Retrotransposons*) possuem longas repetições terminais e apresentam vestígios de infecções virais ancestrais que foram integradas ao genoma humano (KATOH; HONDA, 2023; LEE;

AYARPADIKANNAN; KIM, 2015). Dentre a classe II de TEs podemos destacar os *transposons* "copia e cola" que se movem através de excisão de um local genômico e subsequente reinserção em outra região e os *transposons* replicativos que têm a capacidade de criar cópias de si mesmos durante a transposição, um exemplo notório é o elemento "Tn5" (HAN et al., 2023; NAZARENO; ACHARYA; DUMENYO, 2021).

2.3.1 LINE-1

O LINE-1 comprehende aproximadamente 18% do genoma humano e sua retrotransposição é conhecida como responsável pelas principais formas de mosaicismo de material genético nas células neuronais. Além de estar vinculado à instabilidade genômica, LINE-1 desempenha um papel relevante na compreensão do desenvolvimento cerebral e suas implicações na cognição humana (BODEA; MCKELVEY; FAULKNER, 2018; FAULKNER; GARCIA-PEREZ, 2017; SUAREZ; MACIA; MUOTRI, 2018). Os LINE-1 são formados por três principais regiões: uma sequência promotora, duas sequências ORF (*Open Reading Frame*) chamadas ORF1 e ORF2, e uma sequência com uma série de adeninas (A), chamada cauda poli-A, que confere poliadenilação na extremidade 3'. A ORF1 codifica uma proteína de ligação a RNA que interage com o RNA transcrito do LINE-1, enquanto a ORF2 codifica uma proteína que possui atividade de endonuclease e transcriptase reversa. Essas proteínas são essenciais para a mobilização dos LINE-1 (Figura 8) (MARTIN, 2010; STENZ, 2021).

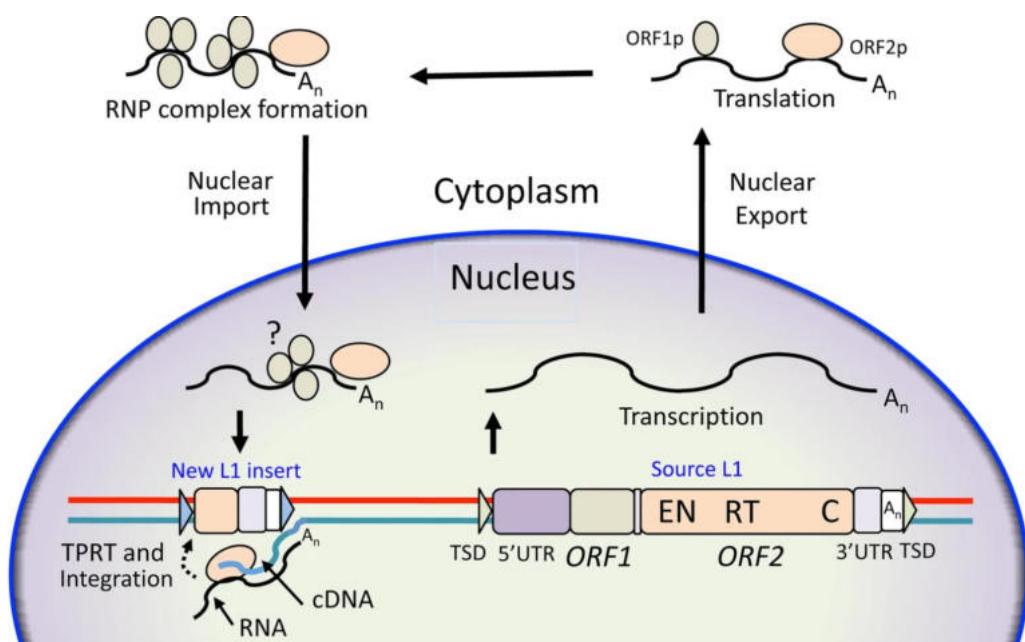


Figura 8: Estrutura e atividade de LINE-1. TSD: duplicação do sítio alvo; UTR: região não traduzida; EN: endonuclease; TR: transcriptase reversa; C: segmento carboxi-terminal; An: sinal e cauda de poliadenilação. O ciclo de replicação do LINE-1 envolve a transcrição e exportação do RNA de LINE para o citoplasma, que é traduzido e montado em uma partícula

de ribonucleoproteína (RNP) juntamente com L1 ORF1p e ORF2p. ORF1p liga-se ao RNA L1 como um trímero. No entanto, não está claro se ele permanece ligado no momento da importação do RNP para o núcleo. A transcrição reversa ocorre no local da inserção cromossômica pelo TPRT (Fonte: LOU; GOODIER; QIANG, 2020).

A grande maioria dos LINE-1 presentes no genoma humano está inativa devido a mutações que afetaram suas sequências essenciais (GILBERT; DOUCET; BUCHETON, 2004; HANCKS; KAZAZIAN, 2016; ZHANG; ZHANG; YU, 2020). No entanto, um pequeno número de LINE-1 ainda apresenta capacidade de mobilização e pode causar inserções em novos locais do genoma. Essa atividade pode levar a variações genômicas e contribuir para condições genéticas e patológicas, incluindo desordens mentais (MISIAK; RICCERI; SĄSIADEK, 2019; SALEH; MACIA; MUOTRI, 2019).

Durante o desenvolvimento embrionário, ocorrem mudanças drásticas na expressão gênica e na reprogramação epigenética para permitir a formação de diferentes tipos de células e tecidos. Os LINE-1 podem influenciar esse processo de várias maneiras. Evidências sugerem que os LINE-1 ativos podem ser expressos em células-tronco embrionárias e em estágios precoces do desenvolvimento. A atividade de mobilização desses elementos pode levar a inserções em regiões regulatórias de genes, o que poderia afetar a regulação gênica e contribuir para a diversidade celular (KOHLRAUSCH et al., 2022a).

Além disso, estudos têm mostrado que os LINE-1 podem ter um impacto na plasticidade genômica ao induzir rearranjos cromossômicos e instabilidade genômica. Essas mudanças estruturais podem ser relevantes durante a embriogênese, contribuindo para a diversificação genética e facilitando a adaptação às demandas específicas de diferentes estágios de desenvolvimento (RAMOS; BOJANG; BOWERS, 2021). No entanto, também é importante destacar que a atividade de LINE-1 em excesso ou desregulada pode ser prejudicial para o desenvolvimento embrionário. A mobilização descontrolada de elementos transponíveis pode levar a mutações prejudiciais, perturbações na expressão gênica e disfunção celular, que estão associadas a anomalias no desenvolvimento embrionário, distúrbios congênitos e até mesmo aborto espontâneo (HANCKS; KAZAZIAN, 2016; LOU; GOODIER; QIANG, 2020; MISIAK; RICCERI; SĄSIADEK, 2019).

Os elementos LINE-1 não são exclusivos dos humanos e estão presentes em diversas espécies ao longo do reino eucariótico, variando em quantidade e atividade. Em humanos, estudos indicam a presença de aproximadamente 266 famílias de LINE-1 potencialmente ativos, com menos de 50% deles demonstrando atividade em culturas celulares. Em contraste,

espécies como o macaco-de-nariz-arrebitado possuem cerca de 2.549 famílias de LINE-1 com ambas ORFs intactas, indicando um potencial retrotransposicional substancialmente maior. A diversidade e atividade dos LINE-1 em outras espécies são notáveis, com variações estruturais significativas observadas entre diferentes grupos de plantas e animais (Figura 9 e Figura 10). Essas diferenças ressaltam tanto os padrões evolutivos herdados quanto os surtos de atividade em espécies individuais, sublinhando a importância dinâmica dos LINE-1 nos eucariotos (IVANCEVIC et al., 2016).

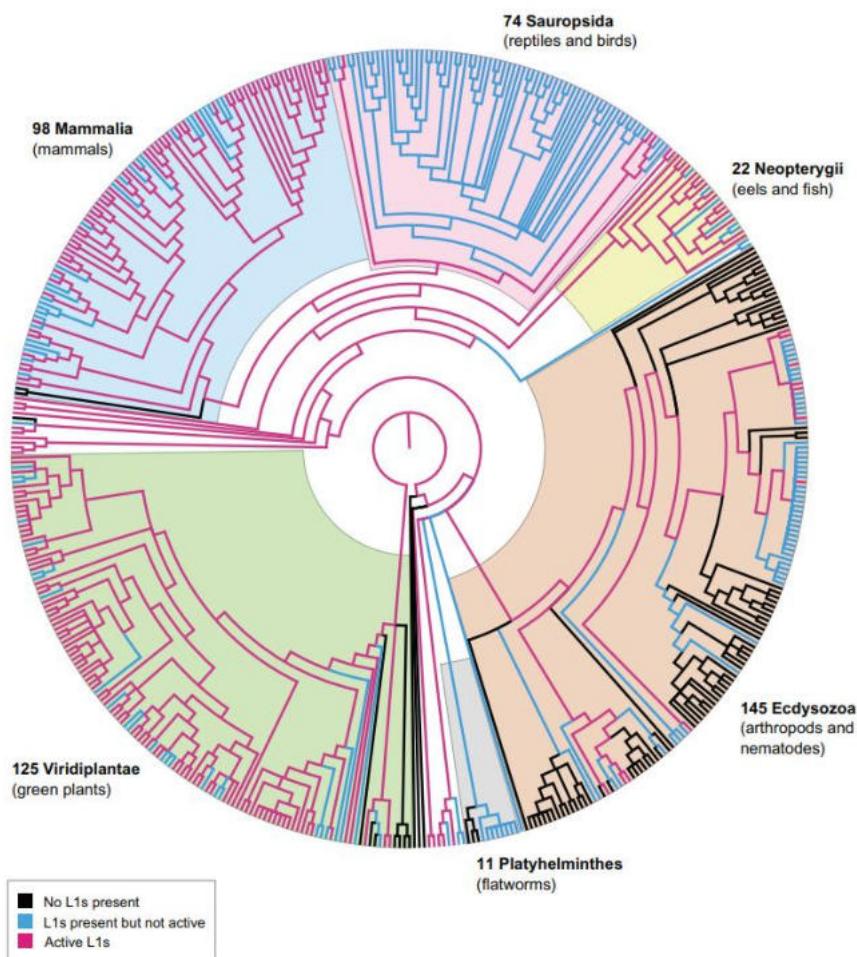


Figura 9: Representação filogenética do conjunto de dados genômicos. As relações entre as 503 espécies representativas utilizadas são ilustradas utilizando o Archaeopteryx para obter a topologia da Árvore da Vida de alguns eucariotos. As etiquetas indicam os principais grupos presentes neste conjunto de dados. Os ramos coloridos indicam o estado dos elementos L1 em cada genoma, conforme mostrado na legenda (Fonte: IVANCEVIC et al., 2016).

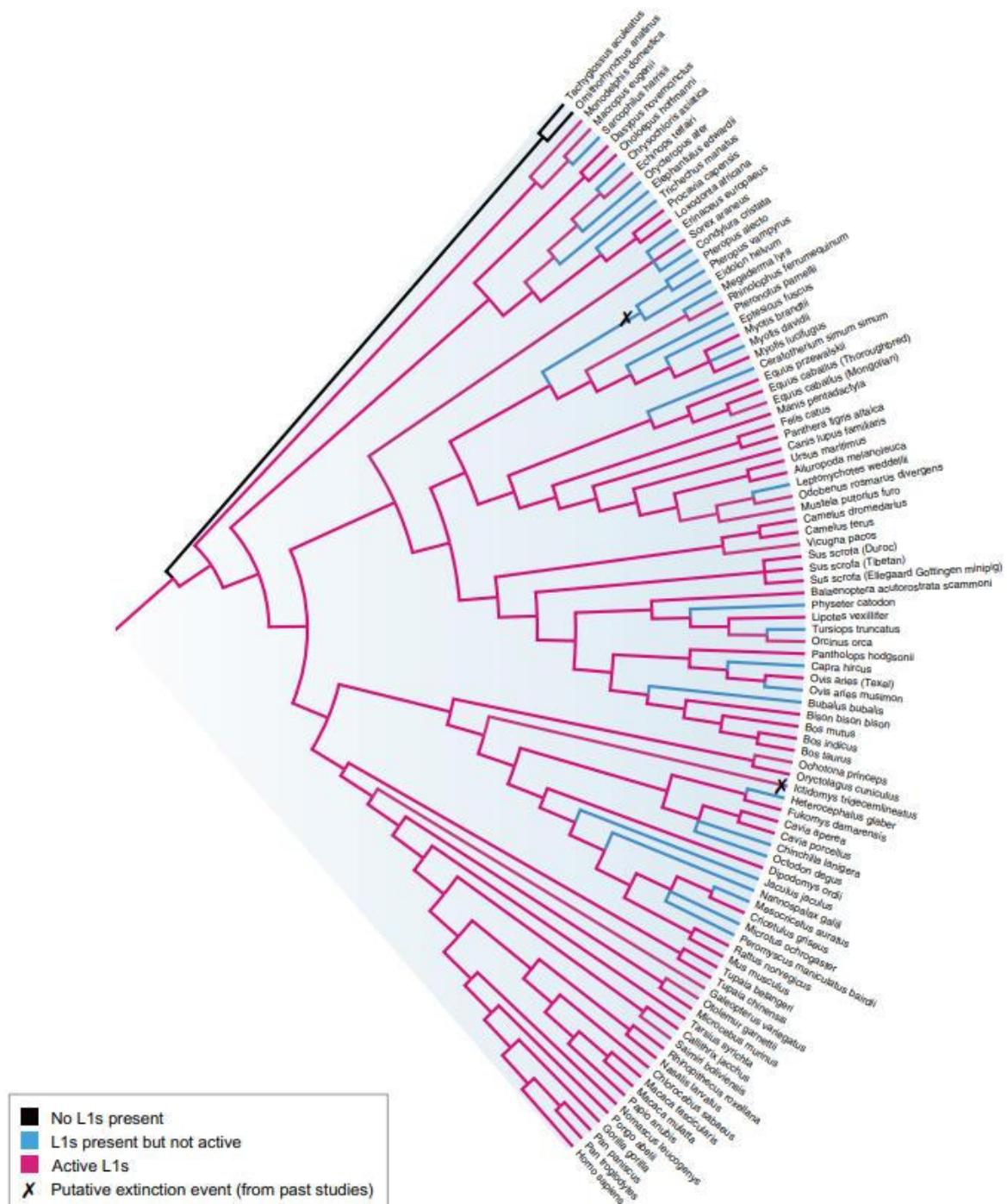


Figura 10: Filogenia dos Mamíferos e Presença de LINE-1 (L1). A filogenia dos mamíferos revela a presença ubíqua de L1 (exceto nos monotremados) e possíveis eventos de extinção. Os genomas são classificados como L1 ausente (L1-) (preto), L1 presente, mas inativo (L1+–L1*) (azul) ou L1 ativo (L1*) (vermelho). Eventos de extinção hipotéticos baseados em estudos anteriores estão marcados (Fonte: IVANCEVIC et al., 2016).

2.3.2 LINE-1 como marcador indireto da metilação global do DNA

Uma abordagem frequentemente utilizada para avaliar o status global de metilação no genoma é analisar o perfil de metilação do promotor do LINE-1. O LINE-1 é um

retrotransposon amplamente distribuído no genoma humano, com aproximadamente 500 mil cópias, e que possui múltiplos sítios de ligação para metilação de citosina em sua região promotora. A metilação do promotor do LINE-1 tem sido considerada um indicador representativo de metilação global do genoma (SHADEMAN et al., 2020; YANG et al., 2004).

A metilação global refere-se ao padrão geral de metilação presente em várias regiões do genoma, refletindo a modificação de citosinas em CGIs. A análise do perfil de metilação do promotor do LINE-1 permite obter uma visão geral da metilação do genoma, uma vez que os *retrotransposons* como o LINE-1 estão amplamente distribuídos e representam uma fração significativa do genoma (LI; TOLLEFSBOL, 2021). A escolha do promotor do LINE-1 como indicador indireto de metilação global baseia-se na hipótese de que mudanças na metilação desses elementos repetitivos podem influenciar a estabilidade genômica e a expressão gênica. A avaliação do estado de metilação do promotor do LINE-1 em diferentes contextos, como desenvolvimento embrionário, envelhecimento e doenças, oferece insights valiosos sobre alterações epigenéticas que podem afetar todo o genoma (BOGDANOVIĆ; GÓMEZ-SKARMETA, 2014; JIANG; GUO, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

O estudo do perfil de metilação do elemento LINE-1 em crianças prematuras é importante devido à carência de informações neste tópico e à relevância que tem sido atribuída às modificações epigenéticas na saúde neonatal e no desenvolvimento infantil. Crianças nascidas prematuramente enfrentam uma série de desafios de saúde e de desenvolvimento. A metilação do DNA é um processo epigenético que desempenha um papel fundamental na regulação da expressão gênica e na determinação de padrões de desenvolvimento (DEATON; BIRD, 2011). Ao analisar o perfil de metilação do elemento LINE-1 nesse contexto, podemos entender melhor como a exposição a condições adversas associadas ao nascimento prematuro pode influenciar a epigenética das crianças e potencialmente contribuir para resultados de saúde e desenvolvimento adversos.

Estudos sugerem que fatores como estresse materno, inflamação, nutrição inadequada e exposição a ambientes desfavoráveis durante a gravidez podem afetar a metilação do DNA nas células do feto (HÜBEL et al., 2019). O LINE-1, por ser um elemento repetitivo amplamente distribuído no genoma, é sensível a essas alterações epigenéticas (KINES; BELANCIO, 2012; MARTIN, 1991). O exame do perfil de metilação do LINE-1 em crianças pré-termo, permite descrever padrões epigenéticos associados a condições pré-natais adversas e contribuir para o entendimento de como essas mudanças podem afetar a saúde e o desenvolvimento dessas crianças em curto e longo prazo.

Além disso, estudar o perfil de metilação do LINE-1 em crianças pré-termo também pode fornecer *insights* sobre o potencial impacto de intervenções clínicas e terapêuticas. Compreender como a metilação global do genoma é afetada por fatores pré-natais corrobora a importância do desenvolvimento de estratégias de intervenção que visem mitigar os efeitos adversos da exposição a ambientes desfavoráveis durante a gestação (LI; TOLLEFSBOL, 2021; YANG et al., 2004).

Portanto, investigar o perfil de metilação do elemento LINE-1 em crianças prematuras contribui para a compreensão dos mecanismos epigenéticos subjacentes associados aos desafios de saúde da prematuridade.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Descrever o perfil de metilação no promotor de LINE-1 em recém-nascidos pré-termo e a termo.

4.2 Objetivos específicos

- Descrever as características demográficas, epidemiológicas e clínicas das gestantes e dos recém-nascidos estudados.
- Quantificar o percentual de metilação em quatro sítios CpG do promotor de LINE-1 (CpGs 21, 22, 23 e 24) em neonatos pré-termo ao nascimento (D0) e no quinto (D5), trigésimo (D30) e nonagésimo dias de vida (D90).
- Quantificar o percentual de metilação nos quatro sítios CpG do promotor de LINE-1 em neonatos à termo ao nascimento (D0) e no quinto dia de vida (D5).
- Comparar os percentuais de metilação de LINE-1 nos dois grupos (pré-termo e a termo).
- Comparar os percentuais de metilação de LINE-1 nos RN pré-termos estratificados de acordo com a idade gestacional em prematuros extremos (< 28 semanas) e muito prematuros (≥ 28 até 31 semanas e 6 dias);
- Descrever a evolução temporal do perfil de metilação nos RN pré-termos através dos marcos de tempo estudados.

5 MÉTODOS

5.1 Características gerais do estudo e da coorte

Este constitui um subestudo da pesquisa denominada "Metilação do gene receptor dos glicocorticoides associada ao estresse no período perinatal e nos primeiros meses de vida", inserida na linha de pesquisa de Epigenética e Desenvolvimento Infantil, conduzida em parceria pelo Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR) e pela Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro (ME-UFRJ).

5.1.1 *Desenho do estudo*

Trata-se de um estudo observacional, longitudinal e prospectivo, envolvendo uma coorte de recém-nascidos prematuros e à termo.

5.1.2 *Local do estudo*

O estudo foi realizado na Maternidade Escola da UFRJ (ME-UFRJ) e no Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR), ambos localizados na cidade do Rio de Janeiro. Na ME-UFRJ foram selecionados os RN elegíveis, prematuros de muito baixo peso ao nascimento ($\leq 1.500\text{g}$), admitidos na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal (UTIN) e RN a termo não internados na UTIN. No IDOR foram processados os exames que identificaram as alterações epigenéticas do DNA dos participantes (metLINE-1).

5.1.3 *População do estudo*

A população do estudo foi constituída por 49 RN a termo e 46 pré-termo, nascidos entre 15 de abril de 2018 e 15 de maio de 2019 na ME-UFRJ. A idade gestacional dos recém-nascidos foi principalmente determinada por meio de ultrassonografia (USG) realizada no primeiro trimestre da gestação. Caso os dados de USG não estivessem disponíveis, a data da última menstruação (DUM) e o método de Capurro foram empregados para estimar a idade gestacional (BALLARD et al., 1991; CAPURRO et al., 1978).

Para avaliar a vitalidade e o estado geral dos recém-nascidos, utilizou-se o escore de APGAR ao nascimento, realizando medições no primeiro e quinto minutos após o parto (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE, 2015)

5.1.4 Critérios de inclusão

Foram incluídos consecutivamente, recém-nascidos prematuros, com peso de nascimento ≤ 1500 gramas e RNs a termo, com idade gestacional entre 37 e 41 semanas e 6 dias, não internados na UTI neonatal, cujos pais concordaram com a sua participação, por meio da assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.1.5 Critérios de exclusão

Recém-nascidos classificados como pequenos para a idade gestacional (PIG) ou grandes para a idade gestacional (GIG); RN com malformações congênitas maiores, tais como cardiopatias congênitas complexas, malformações cirúrgicas do trato gastrointestinal, pulmonares ou renais, ou malformações do sistema nervoso central e RN com suspeita clínica ou confirmação laboratorial de síndromes genéticas.

5.1.6 Critérios de perda

Foram consideradas como perdas (pacientes que saíram do estudo após terem sido incluídos), os casos de retirada da permissão de participar ou óbito durante a internação na UTIN. Neste último grupo, os dados destes participantes foram considerados até o ponto em que participaram do estudo.

5.1.7 Aspectos éticos

Este estudo foi conduzido em concordância com a Resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde do Brasil. Trata-se de subestudo da pesquisa denominada "Metilação do gene receptor dos glicocorticoides associada ao estresse no período perinatal e nos primeiros meses de vida", cujo desenvolvimento foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Maternidade Escola da UFRJ, sob o CAAE nº 79681317.7.3001.5275 (Parecer 2.529.806) e do Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino, sob o CAAE nº 79681317.7.0000.5249 (Pareceres 2.409.633; 2.432.638 e 2.719.832).

5.2 Coleta do material biológico

Para todos os participantes, foram coletados, no momento do nascimento, volumes de sangue total de cordão umbilical, variando de 1 a 2 ml e para as amostras do D5 foram colhidos 0,5 ml de sangue total por punção de veias periféricas. Para os RN que permaneceram internados na UTIN, também foram colhidas amostras de 0,5 ml de sangue total por punção de veias periféricas no trigésimo dia de vida (D30) e nonagésimo dia de vida (D90) ou dia da alta

hospitalar, o que primeiro ocorresse, aqui denominado de D90. Todo o material sanguíneo foi coletado em tubos que continham EDTA potássico (K2EDTA) como anticoagulante. Após a coleta, o material foi armazenado em geladeiras na ME-UFRJ, mantidas a uma temperatura de 4 a 8 °C, por um período de até 48 horas. Posteriormente, os tubos foram transportados até o IDOR em caixas térmicas, mantendo a faixa de temperatura entre 2 e 8 °C.

Uma vez recebido nos laboratórios do IDOR, o sangue de cada tubo foi subdividido em alíquotas de 0,5 ml. Estes criotubos foram prontamente identificados e armazenados em um ultrafreezer, mantidos a uma temperatura de -80 °C. Essas condições de armazenamento foram mantidas até que as etapas subsequentes do processamento fossem realizadas.

Embora amostras de recém-nascidos a termo tenham sido coletadas nos dias 30 e 90 após o nascimento durante o primeiro estudo realizado com esta coorte, sua utilização neste estudo específico foi inviável. Isso ocorreu devido à insuficiência de material biológico (células de mucosa oral) coletado por swab bucal, exclusivamente nesses tempos, neste grupo.

5.3 Extração e quantificação do DNA

Foi efetuada a extração do DNA do sangue colhido, empregando o kit comercial DNeasy Blood and Tissue, desenvolvido pela Qiagen (Hilden, Alemanha). O procedimento foi conduzido de acordo com as diretrizes fornecidas pelo fabricante. Este método de extração se baseia na afinidade do DNA com uma matriz de sílica incorporada em um microtubo. Inicialmente, as células nucleadas presentes na amostra sanguínea são lisadas com uma enzima Proteinase K e detergente. Em seguida, são criadas condições de tamponamento favoráveis para que o ácido nucleico se ligue à matriz de sílica por meio de interação química. A amostra passa por várias etapas de lavagem e centrifugação para remover impurezas indesejadas. A conclusão ocorre com a eluição do DNA usando o tampão de eluição presente no kit.

Após o isolamento do DNA genômico (DNAG), sua concentração e pureza foram mensuradas por espectrofotometria, através do equipamento NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA). Para a leitura, foram empregados 2 µl da amostra. Para verificação da integridade do DNA extraído foi feita uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% e também foi utilizado 2 µl da amostra. Após concluída estas etapas o DNAG foi preservado em criotubos de 2ml, mantidos à temperatura de -20 °C até as etapas subsequentes serem iniciadas.

5.4 Escolha da região alvo

Estudamos a família de LINE-1 específica de seres humanos, a L1HS (*LINE-1 Human specific*), que abrange duas subfamílias – L1HS-A e L1HS-T – cuja região promotora tem a

mesma sequência de nucleotídeos, contendo 41 sítios CpG (Figura 11), de acordo com o consenso genômico revisado para a região da ilha CpG no promotor de LINE-1 em seres humanos (CROWTHER, et al., 1991). O desenho dos primers foi feito para que a região amplificada fosse compatível com os parâmetros do PyroMark Q48 Autoprep (Hilden, Alemanha), abrangendo do nucleotídeo 222 ao 360, referente ao código de acesso X58075.1 no GenBank do NCBI. Nesta região, por questões de viabilidade técnica, financeira e relevância científica foram escolhidos os sítios 21, 22, 23 e 24.

```

1 gggggaggag ccaagatggc cgaataggaa cagctccggt ctacagctcc cagcgtgagc
61 gacgcagaag acggggtatt tctgcatttc catctgaggt accgggttca tctcaactagg
121 gagtgccaga cagtgggcgc aggccactgt gtgcgcgcac cgtgcgcgag ccgaaaggagg
181 gcgaggcatt gcctcacctg ggaagcgcaa ggggtcaggg agttccctt cgagtc当地
241 gaaagggggtg acgacgcac ctggaaaatc gggtcactcc cacccgaata ttgcgctttt
301 cagaccgct taagaaacg cgcaccacga gactatatcc cacacctggc tcagagggtc
361 ctacgcccac ggaatctcgc tgattgctag cacagcagtc tgagatcaaa ctgcaaggcg
421 gcaacgaggc tgggggaggg cgcccgcca ttgcccagc ttgcttaggt aaacaagca
481 gcccgggaagc tcgaactggg tggagcccac cacagctcaa ggaggcctac ctgcctctgt
541 aggctccacc tctggggca gggcacagac aaacaaaaag acagcagtaa cctctgcaga
601 ctttaagtgtc cctgtctgac agctttgaag agagcagtgg ttctccagc acgcagctgg
661 agatctgaga acgggcagac tgcctcctca agtgggtccc tgaccctga cccccgagca
721 gcctaactgg gaggcacccc ccagcaggc acactgacac ctcacacggc agggtattcc
781 aacagacctg cagctgaggg tcctgtctgt tagaaggaaa actaacaacc agaaaggaca
841 tctacacgaa aaccatctg tacatcacca tcatcaaaga cccaaatgtg ataaaaccac
901 aaagatggg aaaaaacaga acagaaaaac tggaaactct aaaacgcaga ggcctctcc
961 tcctccaaag gaacgcagtt cctcaccagc aacagaacaa agctggatgg agaatgattt
1021 tgacgactg agagaagaag gcttcagacg atcaaattac tctgagctac aggaggacat
1081 tcaaaccaa ggcaaagaag ttgaaaactt tgaaaaaat ttagaagaat gtataactag
1141 aataacc

```

Figura 11. Região promotora da família L1HS, específica de humanos. Observa-se em destaque os 41 sítios CpG conforme descrito pelo consenso genômico revisado, referente ao código de acesso X58075.1. Em fundo vermelho os sítios estudados (21, 22, 23 e 24). Em amarelo os demais sítios CpG não estudados. E em azul, os sítios de anelamento dos primers de PCR. No retângulo destacado em vermelho observa-se a região escolhida para desenho dos primers utilizados neste estudo.

Fonte: CROWTHER, et al., 1991. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X58075.1/>

5.5 Modificação com Bissulfito de sódio

A fim de viabilizar a detecção de citosinas metiladas em locais específicos, o DNA purificado passou por um processo de conversão utilizando o método de bissulfito de sódio. Para esta finalidade, foi utilizado o kit comercial EZ DNA Methylation™ (Zymo Research, Irvine, Califórnia, EUA). Essa abordagem é amplamente empregada em análises epigenéticas devido a sua capacidade de detectar com precisão citosinas metiladas no genoma.

O processo de conversão por bissulfito de sódio envolve quatro etapas químicas, as quais são descritas a seguir, com base em estudos anteriores, conforme a Figura 12 (CLARK, STATHAM, et al., 2006; PATTERSON, MOLLOY, et al., 2011) :

1. Desnaturação do DNAg: O DNA genômico é desnaturado por 15 min a 95°C;
2. Sulfonaçao do DNAg: A sulfonaçao do DNA ocorre a 50°C por 16 horas. Durante este processo, um grupo bissulfito (-SO₃⁻) é adicionado ao carbono 5 das citosinas não metiladas, rompendo a ligação dupla entre as posições 5 e 6.;
3. Desaminação hidrolítica: O grupo amina ligado ao carbono 1 é removido por meio de uma reação de hidrólise, resultando na liberação de um íon amônio (-NH₄⁺) a partir de cada citosina;
4. Dessulfonaçao alcalina: O grupo bissulfito adicionado ao carbono 5 é eliminado por meio de tratamento com uma solução alcalina, resultando na formação de uracila.

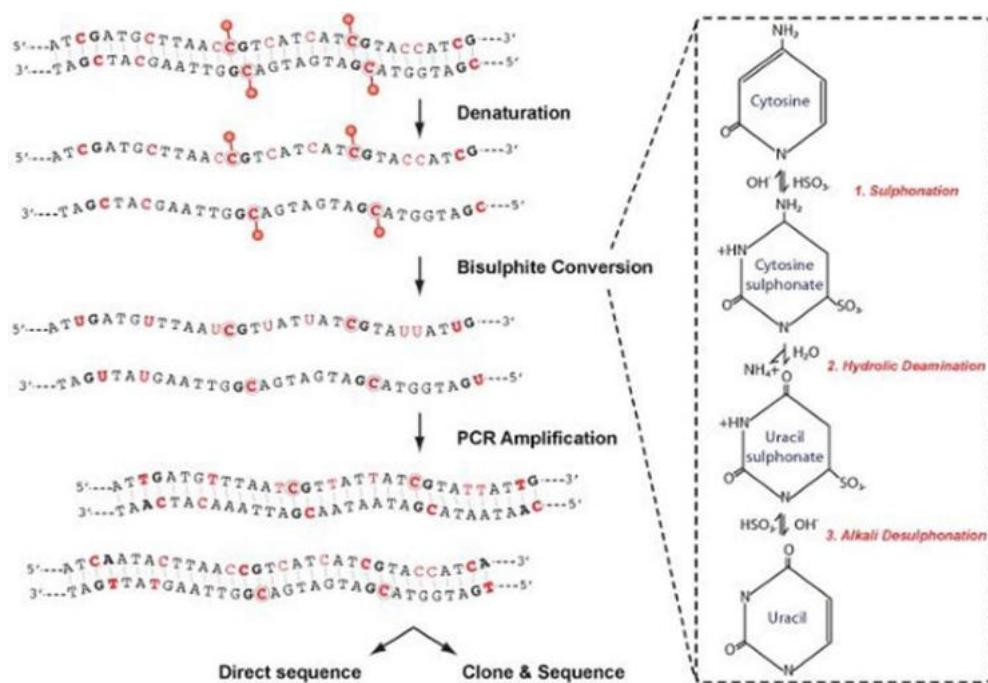


Figura 12: Análise da metilação do DNA. Inclui quatro etapas principais, conforme mostrado: desnaturação, conversão por bissulfito de sódio, amplificação por PCR e análise. No painel à direita, estão representadas as modificações na molécula de citosina que ocorrem durante a conversão por bissulfito.

Fonte: PATTERSON et al., 2011.

Após a conversão, as citosinas não metiladas do genoma são convertidas em uracila, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas. A conversão foi realizada utilizando-se uma concentração de 0,02 µg de DNA por microlitro e água Milli-Q. Posteriormente, o DNA modificado pelo bissulfito foi eluído em 24 µl de um tampão de eluição denominado M-Elution (CLARK et al., 1994; FROMMER et al., 1992).

5.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese

O DNA submetido à conversão com bissulfito foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) no termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems, Waltham, EUA), utilizando o Kit de PCR PyroMark (Qiagen N.V., Venlo, Holanda) (BABA et al., 2010; IRAHARA et al., 2010). As amplificações foram realizadas em placas de 96 poços, com um volume de reação de 50 µl, contendo 2 µl de DNA molde e 48 µl de Master Mix, fornecido no Kit. O processo começou com uma fase inicial de ativação da polimerase a 95 °C por 15 minutos, seguida por 45 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento dos primers a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Houve também uma fase final de extensão a 72 °C por 10 minutos, de acordo com as diretrizes do fabricante.

A amplificação eficaz requer a utilização de primers específicos para sequências tratadas com bissulfito. Estes primers adaptados foram projetados usando o software PyroMark Assay Design SW 2.0 (Qiagen N.V., Venlo, Holanda) e estão detalhados na Tabela 1. Para garantir o adequado sequenciamento do amplicon, o primer *Forward* foi marcado com biotina. Em seguida, todos os produtos gerados pela PCR passaram por uma eletroforese em gel de agarose a 3% utilizando um padrão de baixo peso molecular para identificação da correta dimensão obtida na amplificação e as imagens foram geradas no fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

Tabela 1. Primers para PCR e pirosequenciamento do elemento transponível LINE-1				
Amplicon	Primer Forward	Primer Reverse	Sequência analisada	Primer Seq
139	/5Biosg/GTTTTTTTTT AGAGTTAAAGAAAG GGGTGA	AACCCTCTAAACCA AATATAAAAT	ATRGGTTTAAGAAA RGGRGATTARGAG ATT	CCCTCTAAACCAAAT ATAAAATAT

O primer forward é biotinilado (indicado pela notação '/5Biosg/') para permitir etapas de processamento pós-PCR. Na coluna 'Sequência analisada', a letra 'R' é utilizada para indicar uma posição onde tanto a Guanina (G) quanto a Adenina (A) podem estar presentes.

5.7 Pirosequenciamento e análise da metilação nos sítios CpG

Após a realização da amplificação por PCR, os fragmentos foram submetidos ao sequenciamento utilizando-se o equipamento PyroMark Q48 Autoprep (Qiagen N.V., Venlo, Holanda) em conformidade com as diretrizes fornecidas pelo fabricante (PFEIFER et al., 2020).

Este equipamento é capaz de analisar uma das fitas amplificadas por PCR, especificamente aquela que contém uma biotina em sua extremidade. Para realizar a separação das fitas biotiniladas, são usadas esferas magnéticas revestidas com estreptavidina (PyroMark Q48 Magnetic Beads), que possuem uma forte afinidade com a biotina. Em seguida, ocorre o anelamento com o primer de sequenciamento e o alongamento da região por uma polimerase.

O processo de sequenciamento é essencialmente composto por quatro reações químicas, mostrado na Figura 13:

1. Incorporação do nucleotídeo trifosfatado correto à fita sintetizada pela DNA-polimerase, resultando na liberação de uma molécula de pirofosfato (PPi);
2. Ocorre então a conversão do PPi em ATP por intermédio da enzima ATP-sulfurilase;
3. O ATP gerado é usado como energia para a enzima luciferase converter a luciferina em oxiluciferina. Nesta etapa, ocorre a emissão de um pico de luz amplificado por uma fotomultiplicadora e detectado pelos sensores do equipamento. A intensidade de luz detectada é proporcional ao número de nucleotídeos adicionados à cadeia;
4. Por fim, a enzima apirase degrada os nucleotídeos e as moléculas de ATP não utilizadas na reação, preparando o início do próximo ciclo de incorporação.

Esses passos asseguram a obtenção da sequência de forma precisa e controlada, possibilitando a análise detalhada das modificações de metilação nas sequências de interesse.

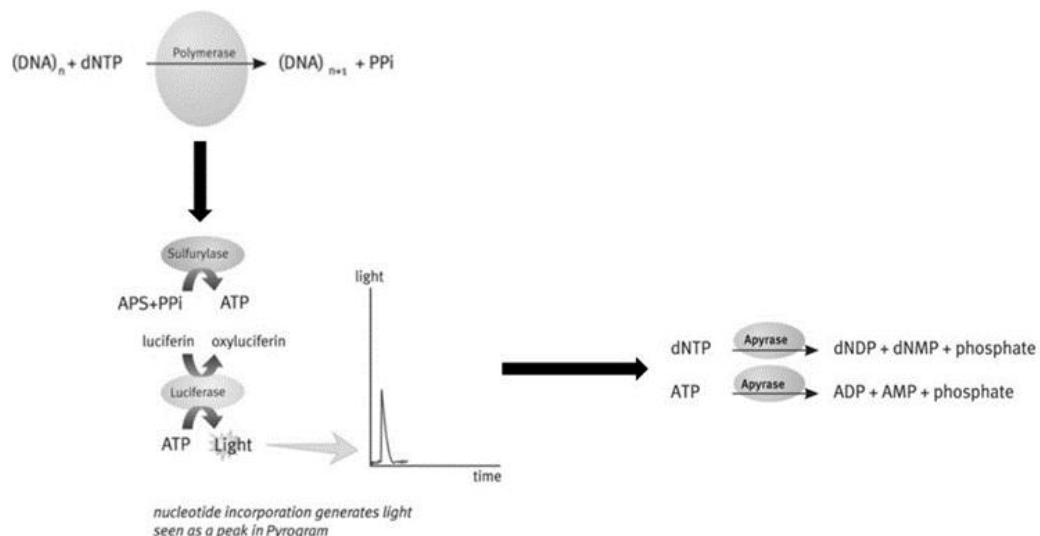


Figura 13: Visão geral simplificada das etapas-chave do pirosequenciamento. Cada dNTP adicionado libera um pirofosfato (PPi), este pirofosfato é convertido em ATP por uma sulfurlase, o ATP é usado por uma luciferase para converter a luciferina em oxiluciferina gerando luz que será amplificada por uma fotomultiplicadora e detectada, então uma apirase é adicionada para eliminar todo o ATP e dNTP não utilizados a cada etapa (Fonte: Figura adaptada do Manual do Q48 Autoprep).

Na fase de conversão com bissulfito, as citosinas não metiladas são convertidas em uracilas e, com a amplificação por PCR, essas uracilas são substituídas por timinas. Portanto, nas regiões variáveis (CpG) lidas pelo equipamento, a quantificação do percentual de metilação se dá pela relação entre citosinas e timinas adicionadas. Este cálculo é dado por:

$$\text{% Metilação} = (C) / (C + T)$$

A unidade de medida utilizada é a intensidade do sinal luminoso obtido para cada nucleotídeo incorporado. Isso proporciona uma maneira precisa para quantificar a metilação nas sequências em análise. Para avaliar a eficácia de nossos primers, realizamos a amplificação de controles de DNA não metilado e metilado usando amostras de DNA não metilado e metilado de HCT116 DKO humano da Zymo Research Corporation.

Para cada um dos quatro sítios CpG de LINE-1 estudados (posições 306, 318, 321 e 328, *GenBank X58075.1*) foram calculadas as medianas e intervalos interquartílicos do percentual de metilação encontrado nos marcos de tempo descritos para cada grupo estudado (pré-termo e a termo). Também foi calculada a média do percentual de metilação dos quatro sítios, chamada aqui de “metilação global do LINE-1”, para cada participante, bem como a mediana e intervalo interquartílico desta metilação global de cada grupo, em cada marco de tempo estudado.

5.8 Análise estatística

Os dados referentes as amostras estudadas foram catalogados e organizados no formato .csv e em seguida todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando-se a linguagem de programação de alto nível Python 3.7 (Python Software Foundation, Wilmington, Delaware, EUA), em um ambiente de Jupyter Notebook em que as principais bibliotecas utilizadas foram Pandas, Numpy, Scipy e Seaborn.

Na análise descritiva das características epidemiológicas e clínicas das gestantes e dos recém-nascidos a termos e pretermos foi utilizado o teste de Mann-Whitney para as variáveis numéricas e o qui-quadrado para as viáveis categóricas.

Na análise descritiva da porcentagem de metilação, as variáveis contínuas foram apresentadas como mediana e seus intervalos interquartílicos 25% a 75% ou média e desvio padrão, de acordo com a característica da distribuição. A comparação de medianas entre os grupos estudados foi feita utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Os resultados de metilação

global foram também representados em gráficos do tipo diagrama de caixa (*box plot*) e violino (*violin plot*). A evolução temporal da metilação em cada sítio CpG foi definida com base na média de metilação deste sítio para cada um dos grupos estudados. Seus dados então tabelados e representados em gráfico de pontos juntamente com uma reta hipotética obtida por meio da regressão linear destes conjuntos de dados e suas respectivas estimativas de R^2 , slope e P-valor. Para todos os cálculos, o nível de significância foi estabelecido em 0,05.

6 RESULTADOS

6.1 Características epidemiológicas e clínicas da população de estudo

As principais características epidemiológicas e clínicas da população do estudo são apresentadas na Tabela 2. Observa-se que o binômio gestante-RN no grupo dos prematuros tinha renda familiar mais baixa ($p=0,023$). As demais variáveis sócio-econômicas, demográficas e de saúde gestacional foram semelhantes entre os grupos, ressalvado o número de consultas de pré-natal, proporcional à idade gestacional.

Quanto às variáveis relativas ao nascimento e ao recém-nascido, as diferenças encontradas refletem a idade gestacional, ressalvada a variável sexo, que teve proporção semelhante entre os dois grupos.

Tabela 2. Características epidemiológicas e clínicas das gestantes, recém-nascidos prematuros e a termo.

Características	Pré Termos (n = 46)	Termos (n = 49)	P-valor
Idade Materna (anos): mediana (IQR)	31 (25,2-34)	27 (23,5 - 33,5)	0,197 ^a
Educação Materna (anos) : n(%)			0,474 ^b
1 - 4	1 (2,2)	0 (0)	
5 - 8	7 (15,2)	9 (18,4)	
9 - 11	8 (17,4)	13 (26,5)	
>12	30 (65,2)	27 (55,1)	
Renda Familiar (BRL Min): n(%)			0,023 ^b
< 1 salário mínimo	13 (28,3)	4 (8,2)	
1-2 salário mínimo	17 (37)	28 (57,1)	
> 2 salário mínimo	16 (34,8)	15 (30,6)	
Etnia: n(%)			0,114 ^b
Branco	19 (41,3)	22 (44,9)	
Preto	12 (26,1)	5 (10,2)	
Pardo	15 (32,6)	22 (44,9)	
Condições de Saúde			
Fumantes: n(%)			1,000 ^b
Não	43 (93,5)	46 (93,9)	
Sim	3 (6,5)	3 (6,1)	
Consumo de Álcool: n(%)			0,321 ^b
Não	42 (91,3)	48 (98)	
Sim	4 (8,7)	1 (2)	
Consultas Perinatais: mediana (IQR)	5 (4 - 7)	9 (7 - 10)	< 0,001 ^a
Idade Gestacional (semanas): mediana (IQR)	28 (27 - 30)	39 (38 - 40)	< 0,001 ^a
Escala Apgar (1min): mediana (IQR)	7 (4,2 - 8)	8 (8 - 9)	< 0,001 ^a
Escala Apgar (5min): mediana (IQR)	8,5 (8 - 9)	9 (9 - 9)	< 0,001 ^a
Sexo: n(%)			0,529 ^b
Masculino	25 (54,3)	25 (51)	
Feminino	20 (43,5)	24 (49)	
Indeterminado	1 (2,2)	0 (0)	
Peso ao Nascimento (g)			< 0,001 ^a
Média (DP)	1074,2 (289,9)	3393,6 (385,0)	
Mediana (IQR)	1075 (860 - 1345)	3320 (3150 - 3575)	
Comprimento (cm)			< 0,001 ^a
Média (DP)	35,9 (1,8)	48,9 (3,4)	
Mediana (IQR)	36,35 (34 - 37,5)	49 (47,5 - 49,6)	
Circunferência da Cabeça (cm)			< 0,001 ^a
Média (DP)	26 (2,4)	34,4 (1,5)	
Mediana (IQR)	26 (24,7 - 28)	34 (33,5 - 35)	

a: Teste de Mann-Whitney.

b: Teste do qui-quadrado.

6.2 Percentual de metilação nos diferentes marcos de tempo

Os níveis de metilação são apresentados na Tabela 3, onde se observam as medianas de metilação de cada sítio individualmente (metilação sítios-específica) e em conjunto (metilação global, CpG 1 a 4).

Tabela 3. Comparação das medianas da porcentagem de metilação entre a termo e pré termos nos diferentes marcos de tempo.			
		Termo (%)	p-valor
D0 N: T (49) PT (45)	CpG1	69,5 (68,2 - 70,7)	0,038
	CpG2	65,7 (64,4 - 67,3)	<0,001
	CpG3	69,7 (64,4 - 67,3)	0,012
	CpG4	78,0 (64,4 - 67,3)	<0,001
	CpG 1-4	70,9 (69,5 - 71,8)	0,002
	CpG1	70,4 (69,3 - 71,5)	0,112
D5 N: T (40) PT (40)	CpG2	66,5 (65,7 - 67,4)	0,02
	CpG3	70,4 (69,5 - 71,2)	0,931
	CpG4	79,5 (78,4 - 80,3)	0,01
	CpG 1-4	71,8 (71,1 - 72,4)	0,053
	CpG1	N/D	N/D
	CpG2	N/D	N/D
D30 N: T (0) PT (36)	CpG3	N/D	N/D
	CpG4	N/D	N/D
	CpG 1-4	N/D	71,6 (71,1 - 72,8)
	CpG1	N/D	N/D
	CpG2	N/D	N/D
	CpG 1-4	N/D	71,3 (71,0 - 72,3)
D90 N: T (0) PT (34)	CpG3	N/D	N/D
	CpG4	N/D	N/D
	CpG 1-4	N/D	N/D
	CpG1	N/D	N/D
	CpG2	N/D	N/D
	CpG 1-4	N/D	N/D

D0: dia do nascimento; D5: quinto dia de vida; D30: trigésimo dia de vida; D90: nonagésimo dia de vida;
N/D: não disponível.

Os valores entre parênteses representam o intervalo interquartílico; p-valor: teste de Mann-Whitney.

Ao nascimento (D0), foi observado um percentual significativamente maior de metilação, tanto sítio-específica como global, no grupo de recém-nascidos a termo. No quinto dia de vida (D5), as diferenças nos sítios individuais e no perfil global entre os grupos parecem atenuar-se, haja vista que o percentual de metilação permanece significativamente maior no grupo de RN a termo apenas nos sítios 2 e 4. Embora a diferença no percentual de metilação global entre os grupos não tenha atingido significância estatística, encontrou-se um p-valor marginal de 0,053.

A Figura 14 mostra graficamente a comparação entre o percentual de metilação global do LINE-1 entre neonatos a termo e pré-termo ao nascimento (D0) e no quinto dia de vida (D5), através de diagramas de caixa to tipo violino (*violin plot*).

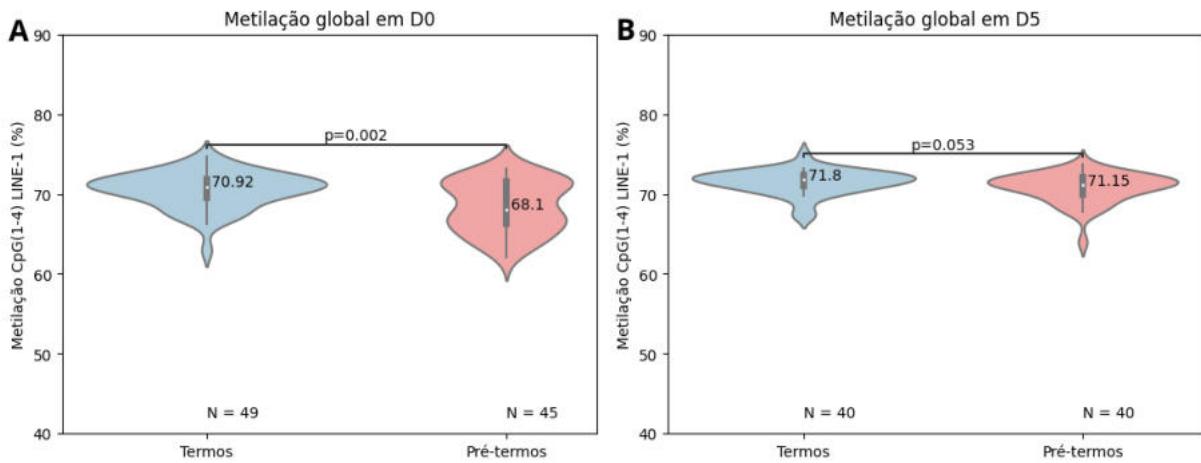


Figura 14: Metilação global de LINE-1 em recém-nascidos a termo e pré-termos ao nascimento (A) e no quinto dia de vida (B).

A Tabela 4 fornece uma visão detalhada dos níveis de metilação de LINE-1 em RN a termo (apenas D0 e D5) e em neonatos prematuros, estratificados em dois grupos: prematuros extremos e muito prematuros. As diferenças estatisticamente significantes que ocorreram no D0 e D5 entre o grupo de RN a termo e muito prematuros encontram-se representadas na Figura 15 e descritas de modo mais abrangente nos parágrafos seguintes.

Table 4. Comparação da porcentagem global de metilação do LINE-1 entre bebês a termo, muito prematuros e extremamente prematuros.

Tempo	n	Grupo de RNs	Metilação global (LINE-1) (%) (IQR)	P-valor, comparação com a termo ^a	P-valor, comparação com muito prematuros ^a
D0	49	A termo	70,92 (69,55 - 71,88)		
	31	Muito prematuros	67,21 (64,72 - 71,14)	< 0,001	
	14	Extremamente prematuros	70,58 (67,70 - 71,52)	0,376	0,082
D5	40	A termo	71,80 (71,05 - 72,40)		
	29	Muito prematuros	71,06 (69,32 - 71,77)	0,021	
	11	Extremamente prematuros	71,66 (71,06 - 72,28)	0,81	0,112
D30	25	Muito prematuros	71,54 (71,05 - 72,50)		
	11	Extremamente prematuros	72,50 (72,04 - 72,84)		0,164
D90	24	Muito prematuros	71,19 (70,64 - 71,53)		
	10	Extremamente prematuros	71,94 (71,21 - 72,55)		0,052

^a teste U de Mann-Whitney

Na Figura 15 (paineis A e B) são apresentadas as comparações entre o percentual de metilação global do LINE-1 no D0 e D5 entre RN a termo e prematuros, agora estratificados de acordo com a idade gestacional em muito prematuros (≥ 28 até 31 semanas e 6 dias) e prematuros extremos (< 28 semanas). No painel A, observa-se uma diferença significativa na metilação de DNA entre os neonatos a termo (70,92%) e os muito prematuros (67,21%),

indicando uma associação forte entre maior prematuridade e menor percentual de metilação. Por outro lado, a comparação entre RN muito prematuros e prematuros extremos não mostrou uma diferença estatisticamente significativa. Os prematuros extremos apresentaram uma mediana de 70,58%, mais próxima dos RN a termo do que dos RN muito prematuros, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa em relação aos RN a termo ($p=0,376$).

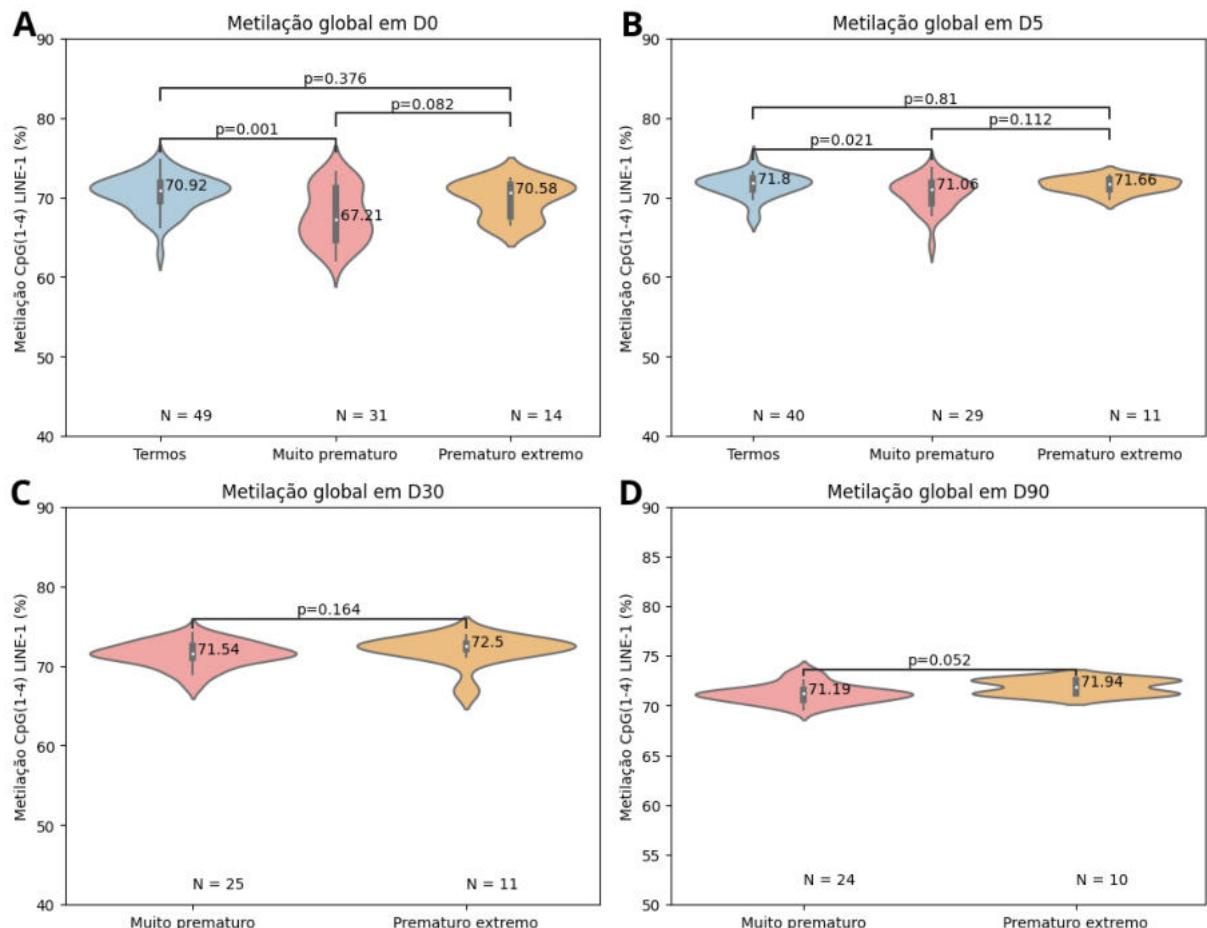


Figura 15: Metilação global em recém-nascidos a termo, muito prematuros e em prematuros extremos ao nascimento (A), no quinto dia de vida (B), no trigésimo (C) e nonagésimo dias de vida (D).

No painel B (Figura 15), observa-se que no D5 a diferença entre o percentual de metilação global dos RN a termo e RN muito prematuros torna-se estatisticamente significativa ($p=0,021$), significância não encontrada quando os RN a termo foram comparados ao grupo de prematuros como um todo ($p=0,053$, Tabela 3 e Figura 5). Por outro lado, a diferença entre os RN muito prematuros e RN prematuros extremos não foi significativa ($p=0,112$), assim como entre os RN a termo e os prematuros extremos ($p=0,81$).

Nos painéis C e D (Figura 15) observam-se as comparações apenas entre os estratos de RN muito prematuros e prematuros extremos, em D30 e D90, respectivamente. Não há diferenças

estatisticamente significativas no percentual de metilação global entre estes grupos ($p=0,164$ em D60 e $p=0,052$ em D90), embora o p-valor em D90 se aproxime da significância estatística.

6.3 Evolução temporal da metilação do DNA em RN pré-termo

A evolução temporal da metilação em RN prematuros nos quatro sítios CpG específicos do elemento LINE-1 (CpG1, CpG2, CpG3 e CpG4), do nascimento (D0) ao nonagésimo dia de vida (D90) é apresentada na Figura 16. Embora observe-se uma inclinação positiva (*slope* de 0,50 a 0,75) nos quatro sítios, esta tendência de aumento não foi estatisticamente significativa.

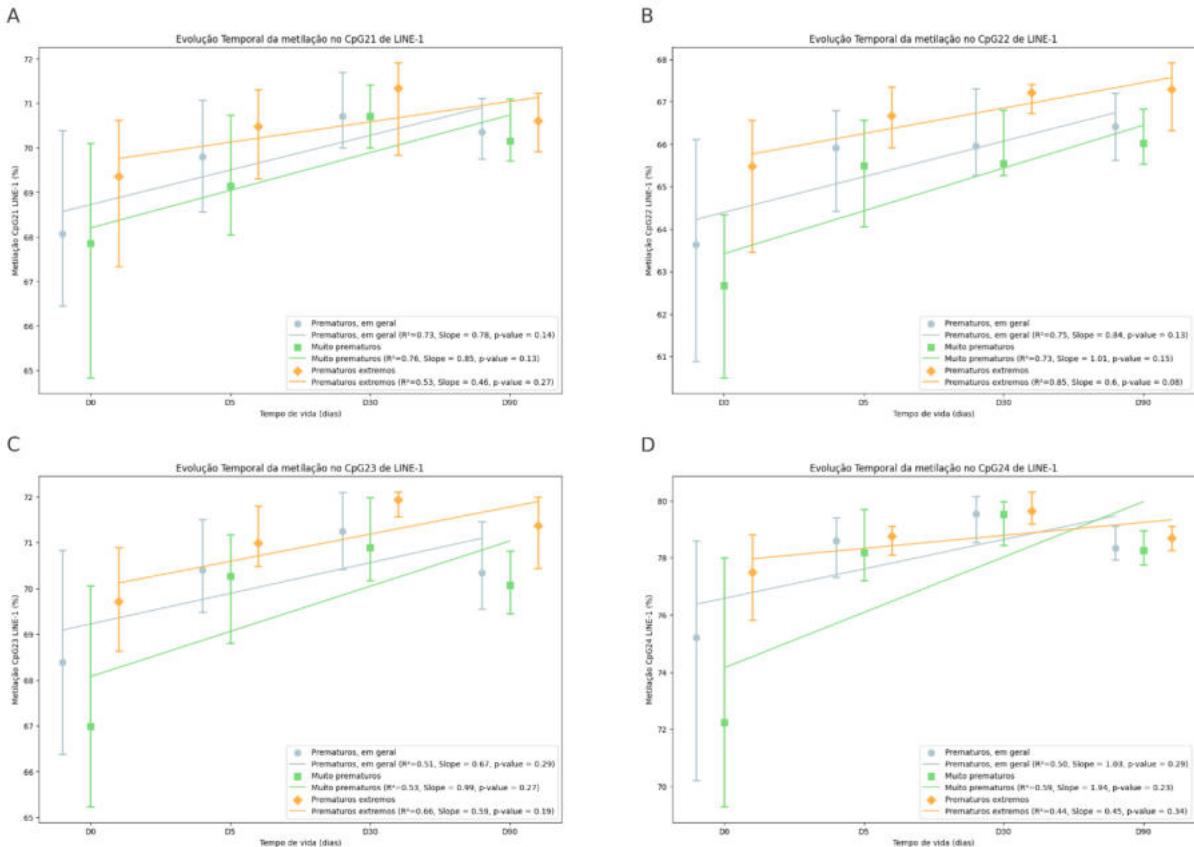


Figura 16: Evolução temporal da metilação sítio-específica em recém-nascidos pré-termo nos sítios CpG 21 (A), CpG 22 (B), CpG 23 (C) e CpG 24 (D) do elemento transponível LINE-1 nos marcos de tempo D0, D5, D30 e D90.

Por outro lado, a Figura 17 mostra a evolução temporal da metilação global do LINE-1 nos quatro sítios CpG, do nascimento aos 90 dias de vida. Observa-se inclinação positiva (*slope* 1,01), mas tendência ascendente não significante (estacionária).

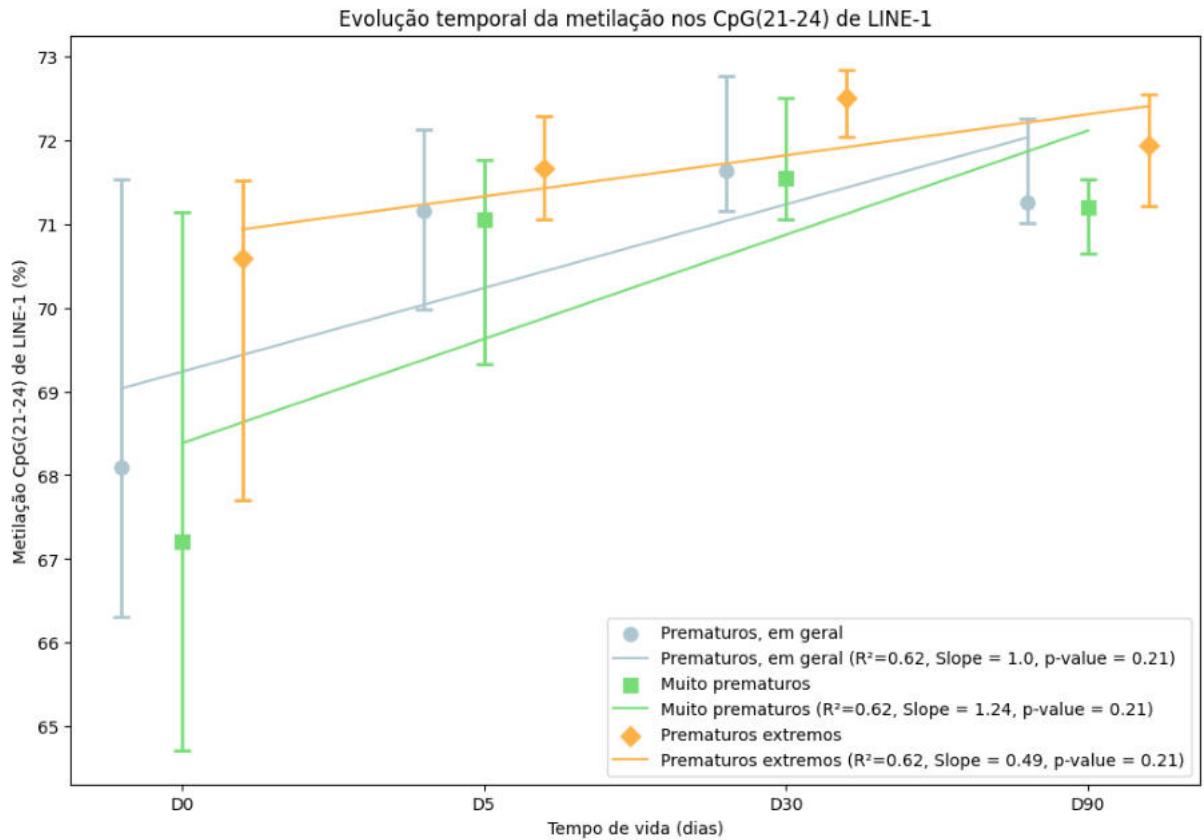


Figura 17: Evolução temporal da metilação global em recém-nascidos pré-termo nos 4 sítios CpG de LINE-1 nos marcos de tempo D0, D5, D30 e D90.

7 Discussão

Este estudo revelou níveis significativamente reduzidos de metilação do LINE-1 em neonatos prematuros ao nascimento em comparação com recém-nascidos a termo e também que este padrão persiste, pelo menos nos sítios CpG 2 e 4, no quinto dia de vida. Demonstramos ainda que esta diferença também ocorre quando comparamos o percentual global de metilação entre RN a termo e o subgrupo de RN muito prematuros nos quatro sítios estudados. Entretanto, parece haver uma tendência à estabilização do percentual de metilação do LINE-1 no grupo de recém-nascidos prematuros ao longo dos primeiros 90 dias de vida, alcançando valores próximos aos encontrados em recém-nascidos a termo ao nascimento.

Conforme mencionado na seção de metodologia, este estudo integra um projeto anterior, cujo propósito inicial foi descrever os percentuais de metilação na região 1F do gene *NR3C1* (receptor do glicocorticoide) em uma coorte de recém-nascidos prematuros e a termo ao nascimento e nos dias 5, 30 e 90 (ou alta hospitalar), cujos resultados resultaram em uma publicação adicionada ao Apêndice desta dissertação. Neste estudo, utilizamos a mesma coorte para estudar o padrão de metilação do LINE-1 nos mesmos marcos de tempo.

Embora o objetivo deste estudo não tenha sido descrever os fatores de risco para prematuridade, é possível que estes fatores possam estar associados a alterações epigenéticas, inclusive do elemento LINE-1 (WU et al., 2019). Encontramos menor renda familiar no grupo de prematuros, o que é descrito na literatura como um dos fatores associados à prematuridade (LANCASTER et al., 2021). Grupos de baixa renda também são mais suscetíveis a diversas condições comprovadamente associadas à prematuridade. Fatores como exposição à poluição do ar, intoxicação por arsênio, dieta inadequada, obesidade, estresse crônico e tabagismo podem influenciar negativamente a metilação de LINE-1 (BANDYOPADHYAY et al., 2016; DING et al., 2016; KHAN et al., 2021; MAUGERI, 2020; NON et al., 2012). Por outro lado, fatores como uma dieta rica em vegetais e isoflavonas, suplementação com zinco e a prática de exercícios físicos podem influenciar positivamente essa metilação (AZIMI et al., 2022; BARCHITTA et al., 2019; ŚWIATOWY et al., 2021; ZHANG; ZHANG; YU, 2020). O ácido fólico, especialmente quando suplementado durante a gestação, não só previne o comportamento invasivo do trofoblasto e o risco de pré-eclâmpsia, mas também tem um efeito positivo na metilação de LINE-1 (RAHAT et al., 2022).

Essencialmente, ao revelar variações na metilação de sítios CpG específicos de LINE-1, particularmente menor em prematuros no momento do nascimento, este estudo sugere uma

influência direta da prematuridade na configuração epigenética inicial. Entretanto, as diferenças observadas parecem se atenuar nos primeiros dias de vida, indicando um processo de normalização no perfil epigenético dos prematuros após o nascimento, o que pode ter implicações na compreensão do desenvolvimento neonatal neste grupo de pacientes. Além disso, apesar de haver uma inclinação positiva no percentual de metilação do LINE-1 ao longo do tempo, esta progressão não se comprovou uma tendência estatisticamente significante, (estacionária), a qual se estabilizou em proporções comparáveis aos valores encontrados no grupo de RN a termo do nascimento até o quinto dia de vida. Este padrão sugere processos adaptativos ou de recuperação em curso e um possível aprimoramento progressivo do epigenoma (maturação) nos primeiros meses de vida, independentemente da prematuridade. Quanto maiores os níveis globais de metilação (LINE-1), maior é a capacidade de manutenção da estrutura e da sequência do material genético ao longo do tempo, sem alterações indesejadas ou mutações significativas (integridade genômica) (JÖNSSON, LUDVIK BRATTÅS, et al., 2019). Sendo assim, a natureza dinâmica dessa metilação pode ser um reflexo de adaptações e desenvolvimento pós-natal, tanto para recém-nascidos a termo quanto para os prematuros, com possíveis implicações tanto na estabilidade genômica quanto na expressão gênica. A análise desses dados abre um campo para a discussão, não apenas em termos de suas implicações biológicas, mas também no que diz respeito às interseções entre condições de nascimento, contexto socioeconômico e saúde neonatal.

Contrariando nossas expectativas, percebemos que, ao estratificar as crianças prematuras pelos seus níveis de prematuridade, as crianças extremamente prematuras apresentaram índices de metilação mais elevados que as muito prematuras. Estudos recentes destacam que a ativação de LINE-1 após a fertilização é crucial para a acessibilidade global da cromatina no embrião inicial, especialmente na fase de 8 células. A falta de ativação adequada de LINE-1 pode resultar em defeitos no desenvolvimento pré-implantação e aborto espontâneo (JACHOWICZ et al., 2017; KOHLRAUSCH et al., 2022b; LOU; GOODIER; QIANG, 2020). Assim, é possível que a elevação da metilação no promotor de LINE-1 (menor atividade) nesse grupo de crianças extremamente prematuras seja um dos fatores responsáveis pelo nascimento precoce. Além disso, nota-se que a metilação nesse grupo é semelhante à das crianças nascidas a termo. No entanto, mais estudos são necessários para entender completamente esta associação e as possíveis consequências da perda de atividade de LINE-1 durante a gestação.

A complexidade da prematuridade e seu impacto no desenvolvimento neonatal são temas de vital importância na pesquisa neonatal e pediátrica. Um estudo recente, conduzido por Fontana *et al.* (2021), intitulado "*Early maternal care restores LINE-1 methylation and*

"enhances neurodevelopment in preterm infants", têm lançado luz sobre a intersecção entre a prematuridade, a metilação do DNA no elemento LINE-1, e o desenvolvimento neurocognitivo de neonatos (FONTANA, MARASCA, et al., 2021). Este estudo, como o nosso, também identificou que o promotor do LINE-1 é hipometilado em neonatos prematuros ao nascimento, condição que é restaurada com o cuidado materno precoce. Tais achados indicam a sensibilidade do epigenoma neonatal aos fatores ambientais, especialmente em prematuros. Além disso, o estudo de Fontana *et al.* estabelece uma correlação direta entre a metilação do LINE-1 e os resultados no desenvolvimento neurocognitivo, demonstrando que o cuidado materno precoce não apenas restaura os níveis de metilação do LINE-1 em prematuros, mas também associa-se a melhores resultados no desenvolvimento neurocognitivo infantil (FONTANA, MARASCA, et al., 2021). Estes achados podem possivelmente contribuir para a melhor compreensão de algumas resultados observados neste estudo, como a evolução da metilação do LINE-1 nos primeiros meses de vida, sugerindo que o processo de estabilização do epigenoma acontece de fato e pode ser influenciado pelo ambiente pós-natal.

O presente estudo, a nosso ver, vem somar conhecimentos aos trazidos por Fontana *et al.*, pois: i) aborda a metilação em diferentes intervalos de tempo (D5, D30 e D90) em recém-nascidos prematuros, enquanto o estudo italiano examina apenas dois momentos, ao nascimento e após a alta hospitalar; ii) utiliza uma amostra cerca de três vezes maior para as análises de metilação; e iii) emprega a técnica de pirosequenciamento (*Pyromark Q48 Autoprep*), mais apropriada, moderna, precisa e sensível, em contraste com o método de Sanger utilizado por Fontana *et al.* Devido às diferenças nas abordagens metodológicas adotadas entre o presente estudo, baseado em pirosequenciamento, e o estudo conduzido por Fontana *et al.*, que empregou o método de Sanger; aliadas aos sítios CpGs analisados, pertencentes a subtipos distintos de LINE-1 (X58075.1 e L19092.1), os dados de metilação obtidos por Fontana *et al.* não podem ser diretamente confrontados com os deste estudo. Portanto, neste manuscrito, optamos por não efetuar comparações numéricas entre ambos. No entanto, ambos estudos convergem para destacar a prematuridade como um fator importante que afeta (reduz) a metilação do DNA no elemento LINE-1, o que pode ter implicações para o desenvolvimento neurocognitivo destes pacientes. O estudo de Fontana *et al.* ainda enfatiza a importância das intervenções pós-natais, como o cuidado materno precoce, como estratégias para mitigar os efeitos negativos da prematuridade no desenvolvimento infantil, através da influência no epigenoma. Essas descobertas abrem caminho para futuras investigações e lançam luz sobre o mecanismo de ação de estratégias clínicas voltadas para melhorar os resultados de saúde em neonatos prematuros.

A relação entre a metilação do LINE-1 e desfechos neurológicos e psiquiátricos é um tema emergente na pesquisa em neurociência e psiquiatria. Os achados desta pesquisa sobre a baixa metilação global (LINE-1) em neonatos prematuros, pelo menos ao nascimento e nos primeiros dias de vida, adquire maior significado se levarmos em consideração relatos de estudos recentes associando alterações de metilação do LINE-1 com doenças psiquiátricas e transtorno do espectro autista (ALVES, MICALI, et al., 2023, SAELIW, PERMPOON, et al., 2022). O estudo sobre assinaturas de metilação do LINE-1 e Alu no transtorno do espectro do autismo (TEA) destaca uma relação complexa entre a metilação de elementos repetitivos específicos e a expressão de genes relacionados ao TEA (SAELIW, PERMPOON, et al., 2022). Este achado sugere que alterações na metilação do DNA, incluindo a hipometilação do LINE-1, podem ter implicações significativas no desenvolvimento neurológico e na expressão gênica. Além disso, a revisão sistemática sobre o perfil de metilação do LINE-1 em transtornos psiquiátricos revela que níveis mais baixos de metilação do LINE-1 estão associados a uma variedade de transtornos mentais, incluindo TEA, transtorno de estresse pós-traumático e transtornos de pânico (ALVES, MICALI, et al., 2023). Esta associação com TEA e vários transtornos psiquiátricos sublinha a importância do estudo do estado de metilação do LINE-1 como um potencial biomarcador e fator influenciador no desenvolvimento de condições psiquiátricas, especialmente na população de RN prematuros.

Por outro lado, outros estudos indicam que a metilação de elementos repetitivos como Alu e LINE-1 em humanos é considerada um substituto para a metilação global do DNA (YANG, ESTÉCIO, et al., 2004). Aplicar estes achados ao contexto do neurodesenvolvimento infantil levanta a preocupação de que a baixa metilação do LINE-1 em recém-nascidos prematuros, ao ter implicações na metilação global, possa afetar também a expressão de genes essenciais para o neurodesenvolvimento, como o gene *HES1* (*Hairy and Enhancer of Split 1*), por exemplo. Isso não apenas devido à retrotransposição do LINE-1 sobre os promotores, mas também como indicador de baixa metilação em promotores que deveriam estar metilados. Uma diminuição na metilação do promotor de *HES1* em recém-nascidos sugere fragilidades no neurodesenvolvimento infantil (LILLYCROP et al., 2015).

A retrotransposição de LINE-1 também é uma preocupação quando falamos sobre genes que deveriam estar ativos, como os genes que codificam o receptor de glicocorticóide (*NR3C1*), importante para a resposta ao estresse, e também o transportador de serotonina (*SLC6A4*). Ambos, quando estão desregulados, acarretam alterações significativas nos desfechos de neurodesenvolvimento infantil (CHALFUN, et al., 2022, PROVENZI, GIORDA, et al., 2016). Já a hipometilação global do DNA é considerada uma característica fundamental do câncer,

resultando em aumento da expressão de oncogenes e instabilidade genômica (FANG, FULLWOOD, 2016, IRAHARA, NOSHIO, et al., 2010).

A compreensão da metilação do DNA, especificamente do elemento LINE-1, representa um grande avanço na biologia molecular e pode oferecer novas perspectivas para abordagens terapêuticas e preventivas em diversos contextos clínicos. Neste cenário, a influência de fatores externos, como a dieta e a exposição a poluentes, sobre a metilação do DNA tem sido um foco de pesquisa intensa (CAO, ZHANG, et al., 2013). Estudos têm demonstrado que a nutrição materna durante a gravidez pode desempenhar um papel fundamental na configuração epigenética do feto, sugerindo que intervenções dietéticas e a redução da exposição a poluentes ambientais podem ter impactos benéficos na metilação do LINE-1 e, consequentemente, no desenvolvimento fetal (AMORÍN, LIU, et al., 2023, DAS, MAITRA, 2021).

No âmbito do cuidado neonatal e pediátrico, a importância do ambiente de cuidado tem sido cada vez mais reconhecida. Estratégias que focam no cuidado materno e no suporte nutricional adequado podem influenciar positivamente a metilação do DNA em neonatos, especialmente em prematuros. Essas intervenções podem ser fundamentais para a saúde epigenética e para o desenvolvimento saudável desses indivíduos vulneráveis, destacando a importância de um ambiente de cuidado otimizado desde os primeiros estágios da vida (INDRIO, MARTINI, et al., 2017).

Este estudo apresenta forças e limitações. A principal força reside na originalidade da investigação da metilação global (LINE-1) utilizando uma técnica de sequenciamento genético avançada, conhecida como pirosequenciamento (*Pyromark Q48 Autoprep*), em amostras humanas de recém-nascidos a termo e, notavelmente, em prematuros. Entre as limitações, destacamos: i) a amostra de conveniência e o pequeno tamanho amostral, determinado por questões logísticas e orçamentárias; ii) a ausência de dados do percentual de metilação em recém-nascidos a termo no D30 e D90, prejudicando a análise comparativa nestes marcos de tempo; e iii) a não avaliação de possível herança transgeracional, **tanto materna quanto paterna**, na metilação do LINE-1.

Desta forma, mais pesquisas nessa área podem mostrar que as alterações na metilação do LINE-1 são capazes de refletir mudanças mais amplas na paisagem epigenética, que por sua vez podem influenciar a expressão gênica, o desenvolvimento neurológico e outras áreas da saúde humana. Assim, o estudo da metilação do LINE-1 em neonatos prematuros e o acompanhamento destas coortes pode oferecer informações valiosas sobre riscos no desenvolvimento cerebral, na saúde mental e na saúde em geral, mais tarde na vida.

8 Conclusão

Este estudo demonstrou que os recém-nascidos prematuros apresentam percentuais menores de metilação na região promotora do elemento transponível LINE-1 em relação aos recém-nascidos a termo, ao nascimento e nos primeiros dia de vida, refletindo a influência da prematuridade na configuração epigenética inicial. Entretanto, parece haver uma tendência a estabilização deste percentual ao longo dos primeiros 90 dias de vida no grupo de prematuros, sugerindo um possível processo dinâmico de maturação epigenética que poderia estar relacionado às adaptações ao ambiente pós-natal. Esses achados sublinham a complexidade da regulação epigenética em resposta à prematuridade e reforçam a necessidade de novos estudos que possam relacionar o epigenoma ao desenvolvimento infantil.

Referências

- AARNOUDSE-MOENS, C. S. H. et al. Meta-Analysis of Neurobehavioral Outcomes in Very Preterm and/or Very Low Birth Weight Children. **Pediatrics**, v. 124, n. 2, p. 717–728, 1 ago. 2009.
- ALVES, V. R. G. et al. A Systematic Review of LINE-1 Methylation Profile in Psychiatric Disorders. **Complex psychiatry**, v. 9, n. 1–4, p. 119–129, 2023.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN; AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE. The Apgar Score. **Pediatrics**, v. 136, n. 4, p. 819–22, out. 2015.
- AMORÍN, R. et al. Maternal diet induces persistent DNA methylation changes in the muscle of beef calves. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 1587, 28 jan. 2023.
- 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**, v. 11, n. 1, p. 37, 29 jun. 2018.
- ANGELONI, A.; BOGDANOVIC, O. Sequence determinants, function, and evolution of CpG islands. **Biochemical Society transactions**, v. 49, n. 3, p. 1109–1119, 30 jun. 2021.
- ANNUNZIATO, A. T.; HANSEN, J. C. Role of histone acetylation in the assembly and modulation of chromatin structures. **Gene expression**, v. 9, n. 1–2, p. 37–61, 2000.
- AZIMI, Z. et al. Association of zinc level with DNA methylation and its consequences: A systematic review. **Heliyon**, v. 8, n. 10, p. e10815, out. 2022.
- BABA, Y. et al. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. **Molecular cancer**, v. 9, p. 125, 27 maio 2010.
- BAJAN, S.; HUTVAGNER, G. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. **Cells**, v. 9, n. 1, 7 jan. 2020.
- BALLARD, J. L. et al. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. **The Journal of pediatrics**, v. 119, n. 3, p. 417–23, set. 1991.
- BANDYOPADHYAY, A. K. et al. Reduced LINE-1 methylation is associated with arsenic-induced genotoxic stress in children. **BioMetals**, v. 29, n. 4, p. 731–741, 27 ago. 2016.
- BARCHITTA, M. et al. Dietary Patterns are Associated with Leukocyte LINE-1 Methylation in Women: A Cross-Sectional Study in Southern Italy. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1843, 9 ago. 2019.
- BARRAL, A.; DÉJARDIN, J. The chromatin signatures of enhancers and their dynamic regulation. **Nucleus (Austin, Tex.)**, v. 14, n. 1, p. 2160551, dez. 2023.
- BARRETT, T. J. et al. Chronic stress primes innate immune responses in mice and humans. **Cell reports**, v. 36, n. 10, p. 109595, 7 set. 2021.

BERNSTEIN, C. DNA Methylation and Establishing Memory. **Epigenetics insights**, v. 15, p. 25168657211072500, 2022.

BHAT, A. et al. Role of Transposable Elements in Genome Stability: Implications for Health and Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 14, 15 jul. 2022.

BHAT, A. A. et al. Role of non-coding RNA networks in leukemia progression, metastasis and drug resistance. **Molecular Cancer**, v. 19, n. 1, p. 57, 12 dez. 2020.

BLENCOWE, H. et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. **The Lancet**, v. 379, n. 9832, p. 2162–2172, jun. 2012.

BODAK, M.; YU, J.; CIAUDO, C. Regulation of LINE-1 in mammals. **Biomolecular concepts**, v. 5, n. 5, p. 409–28, out. 2014.

BODEA, G. O.; MCKELVEY, E. G. Z.; FAULKNER, G. J. Retrotransposon-induced mosaicism in the neural genome. **Open biology**, v. 8, n. 7, jul. 2018.

BOGDANOVIĆ, O.; GÓMEZ-SKARMETA, J. L. Embryonic DNA methylation: insights from the genomics era. **Briefings in functional genomics**, v. 13, n. 2, p. 121–30, mar. 2014.

BRIDGES, M. C.; DAULAGALA, A. C.; KOURTIDIS, A. LNCcation: lncRNA localization and function. **The Journal of cell biology**, v. 220, n. 2, 1 fev. 2021.

CAO, J.-X.; ZHANG, H.-P.; DU, L.-X. [Influence of environmental factors on DNA methylation]. **Yi chuan = Hereditas**, v. 35, n. 7, p. 839–46, jul. 2013.

CAPURRO, H. et al. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. **The Journal of pediatrics**, v. 93, n. 1, p. 120–2, jul. 1978.

CARLBERG, C.; MOLNÁR, F. DNA Methylation. Em: **Human Epigenomics**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 57–73.

CHALFUN, G. et al. NR3C1 gene methylation and cortisol levels in preterm and healthy full-term infants in the first 3 months of life. **Epigenomics**, v. 14, n. 24, p. 1545–1561, dez. 2022.

CHAUVISTRÉ, H.; SERÉ, K. Epigenetic aspects of DC development and differentiation. **Molecular immunology**, v. 128, p. 116–124, dez. 2020.

CHEN, L.-L.; YANG, L. Regulation of circRNA biogenesis. **RNA biology**, v. 12, n. 4, p. 381–8, 2015.

CLARK, S. J. et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 15, p. 2990–7, 11 ago. 1994.

CLARK, S. J. et al. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2353–64, 2006.

COHEN, I. et al. Histone Modifiers in Cancer: Friends or Foes? **Genes & Cancer**, v. 2, n. 6, p. 631–647, 1 jun. 2011.

CORNEC, A.; POIRIER, E. Z. Interplay between RNA interference and transposable elements in mammals. **Frontiers in immunology**, v. 14, p. 1212086, 2023.

CROWTHER, P. J. et al. Revised genomic consensus for the hypermethylated CpG island region of the human L1 transposon and integration sites of full length L1 elements from recombinant clones made using methylation-tolerant host strains. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 9, p. 2395–401, 11 maio 1991.

DAS, J.; MAITRA, A. Maternal DNA Methylation During Pregnancy: a Review. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 28, n. 10, p. 2758–2769, out. 2021.

DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes & development**, v. 25, n. 10, p. 1010–22, 15 maio 2011.

DEL CASTILLO-MATAMOROS, S. E.; POVEDA, N. E. Importance of nutrition in pregnant women. **Revista colombiana de obstetricia y ginecología**, v. 72, n. 4, p. 339–345, 30 dez. 2021.

DELGADO-MORALES, R. et al. Epigenetic mechanisms during ageing and neurogenesis as novel therapeutic avenues in human brain disorders. **Clinical epigenetics**, v. 9, p. 67, 2017.

DEPARTAMENTO CIENTÍFICO DE NEONATOLOGIA. **SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA**. , 17 nov. 2019. Disponível em: <https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/DocCient-Neonatol-SBP_Prematuridade_18112019_1_.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2024

DHAR, G. A. et al. DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. **The Nucleus : an international journal of cytology and allied topics**, v. 64, n. 3, p. 259–270, 2021.

DING, R. et al. Characteristics of DNA methylation changes induced by traffic-related air pollution. **Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis**, v. 796, p. 46–53, 15 jan. 2016.

DYKES, I. M.; EMANUELI, C. Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 15, n. 3, p. 177–186, jun. 2017.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457–63, 27 maio 2004.

FANG, Y.; FULLWOOD, M. J. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 42–54, fev. 2016.

FAREWELL, C. V et al. Exploring the timing and duration of maternal stress exposure: Impacts on early childhood BMI. **Early human development**, v. 117, p. 15–19, fev. 2018.

- FAROOQI, A. et al. Mental Health and Social Competencies of 10- to 12-Year-Old Children Born at 23 to 25 Weeks of Gestation in the 1990s: A Swedish National Prospective Follow-up Study. **Pediatrics**, v. 120, n. 1, p. 118–133, 1 jul. 2007.
- FAULKNER, G. J.; GARCIA-PEREZ, J. L. L1 Mosaicism in Mammals: Extent, Effects, and Evolution. **Trends in genetics : TIG**, v. 33, n. 11, p. 802–816, nov. 2017.
- FEE, C. et al. Chronic Stress-induced Behaviors Correlate with Exacerbated Acute Stress-induced Cingulate Cortex and Ventral Hippocampus Activation. **Neuroscience**, v. 440, p. 113–129, 1 ago. 2020.
- FESCHOTTE, C. Transposable elements: McClintock's legacy revisited. **Nature reviews. Genetics**, v. 24, n. 11, p. 797–800, nov. 2023.
- FONTANA, C. et al. Early maternal care restores LINE-1 methylation and enhances neurodevelopment in preterm infants. **BMC Medicine**, v. 19, n. 1, p. 42, 5 fev. 2021.
- FRAGA, M. F. et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10604–9, 26 jul. 2005.
- FRIDOVICH-KEIL, J. L.; ROGERS, K. **Epigenetics**, 2 mar. 2024. (Nota técnica).
- FROMMER, M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 5, p. 1827–1831, mar. 1992.
- GAWRA, J. et al. Epigenetic variations are more substantial than genetic variations in rapid adaptation of oyster to Pacific oyster mortality syndrome. **Science advances**, v. 9, n. 36, p. eadh8990, 8 set. 2023.
- GHOSH, S.; KHETARPAL, P.; SENAPATI, S. Functional implications of the CpG island methylation in the pathogenesis of celiac disease. **Molecular biology reports**, v. 49, n. 10, p. 10051–10064, out. 2022.
- GIACOMAN-LOZANO, M. et al. Epigenetics of neural differentiation: Spotlight on enhancers. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 10, p. 1001701, 2022.
- GIAIMO, B. D. et al. The histone variant H2A.Z in gene regulation. **Epigenetics & chromatin**, v. 12, n. 1, p. 37, 14 jun. 2019.
- GILBERT, N.; DOUCET, A. J.; BUCHETON, A. [Genomic instability associated with human LINE-1 retrotransposition]. **Journal de la Societe de biologie**, v. 198, n. 4, p. 419–24, 2004.
- GOLDENBERG, R. L. et al. The preterm birth syndrome: issues to consider in creating a classification system. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 206, n. 2, p. 113–8, fev. 2012.
- GOLDSTEIN, D. S. Stress and the “extended” autonomic system. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 236, p. 102889, dez. 2021.

GOOD, D. J. Non-Coding RNAs in Human Health and Diseases. **Genes**, v. 14, n. 7, p. 1429, 11 jul. 2023.

GRENIER, L. N. et al. Be Healthy in Pregnancy: Exploring factors that impact pregnant women's nutrition and exercise behaviours. **Maternal & child nutrition**, v. 17, n. 1, p. e13068, jan. 2021.

GYLLENHAMMER, L. E. et al. Prospective association of maternal immune pro-inflammatory responsivity and regulation in pregnancy with length of gestation. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 85, n. 5, p. e13366, maio 2021.

HÄMÄLÄ, T. et al. Environmental response in gene expression and DNA methylation reveals factors influencing the adaptive potential of *Arabidopsis lyrata*. **eLife**, v. 11, 28 out. 2022.

HAN, M. et al. Advances in transposable elements: from mechanisms to applications in mammalian genomics. **Frontiers in genetics**, v. 14, p. 1290146, 2023.

HANCKS, D. C.; KAZAZIAN, H. H. Roles for retrotransposon insertions in human disease. **Mobile DNA**, v. 7, p. 9, 2016.

HENIKOFF, S. The epigenetic landscape: An evolving concept. **Frontiers in Epigenetics and Epigenomics**, v. 1, 20 mar. 2023.

HOON, A. H.; STASHINKO, E. E. Neuroimaging: connecting the pixels. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 53, n. 6, p. 482–482, jun. 2011.

HÜBEL, C. et al. Epigenetics in eating disorders: a systematic review. **Molecular psychiatry**, v. 24, n. 6, p. 901–915, jun. 2019.

HUNT, R. W. et al. Early surgery and neurodevelopmental outcomes of children born extremely preterm. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 103, n. 3, p. F227–F232, maio 2018.

INDRIO, F. et al. Epigenetic Matters: The Link between Early Nutrition, Microbiome, and Long-term Health Development. **Frontiers in pediatrics**, v. 5, p. 178, 2017.

IRAHARA, N. et al. Precision of pyrosequencing assay to measure LINE-1 methylation in colon cancer, normal colonic mucosa, and peripheral blood cells. **The Journal of molecular diagnostics : JMD**, v. 12, n. 2, p. 177–83, mar. 2010.

IVANCEVIC, A. M. et al. LINEs between species: Evolutionary dynamics of LINE-1 retrotransposons across the eukaryotic tree of life. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 11, p. 3301–3322, 1 nov. 2016.

JACHOWICZ, J. W. et al. LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo. **Nature Genetics**, v. 49, n. 10, p. 1502–1510, 1 out. 2017.

- JAIN, V. G. et al. Genetics, epigenetics, and transcriptomics of preterm birth. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 88, n. 4, p. e13600, out. 2022.
- JAVIERRE, B. M. et al. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. **Genome research**, v. 20, n. 2, p. 170–9, fev. 2010.
- JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1074–80, 10 ago. 2001.
- JIANG, S.; GUO, Y. Epigenetic Clock: DNA Methylation in Aging. **Stem cells international**, v. 2020, p. 1047896, 2020.
- JOBE, A. H. Mechanisms of Lung Injury and Bronchopulmonary Dysplasia. **American journal of perinatology**, v. 33, n. 11, p. 1076–8, set. 2016.
- JÖNSSON, M. E. et al. Activation of neuronal genes via LINE-1 elements upon global DNA demethylation in human neural progenitors. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 3182, 18 jul. 2019.
- KATO, M.; NATARAJAN, R. Epigenetics and epigenomics in diabetic kidney disease and metabolic memory. **Nature reviews. Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 327–345, jun. 2019.
- KATOH, H.; HONDA, T. Roles of Human Endogenous Retroviruses and Endogenous Virus-Like Elements in Cancer Development and Innate Immunity. **Biomolecules**, v. 13, n. 12, p. 1706, 24 nov. 2023.
- KEVERNE, J.; BINDER, E. B. A Review of epigenetics in psychiatry: focus on environmental risk factors. **Medizinische Genetik**, v. 32, n. 1, p. 57–64, 27 ago. 2020.
- KHAN, M. F. J. et al. MTHFR promoter methylation might mitigate the effect of smoking at the level of LINE-1 in cleft lip tissues: A preliminary study. **Birth defects research**, v. 113, n. 20, p. 1463–1469, 1 dez. 2021.
- KIM, S. Different maternal age patterns of preterm birth: Interplay of race/ethnicity, chronic stress, and marital status. **Research in nursing & health**, v. 45, n. 2, p. 151–162, abr. 2022.
- KINES, K. J.; BELANCIO, V. P. Expressing genes do not forget their LINEs: transposable elements and gene expression. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 17, n. 4, p. 1329–44, 1 jan. 2012.
- KIROV, J. V et al. Reporter Gene Silencing in Targeted Mouse Mutants Is Associated with Promoter CpG Island Methylation. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0134155, 2015.
- KOHLRAUSCH, F. B. et al. Control of LINE-1 Expression Maintains Genome Integrity in Germline and Early Embryo Development. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 29, n. 2, p. 328–340, fev. 2022a.

- KOHLRAUSCH, F. B. et al. Control of LINE-1 Expression Maintains Genome Integrity in Germline and Early Embryo Development. **Reproductive Sciences**, v. 29, n. 2, p. 328–340, 22 fev. 2022b.
- KOJIMA, K. K. LINEs Contribute to the Origins of Middle Bodies of SINEs besides 3' Tails. **Genome biology and evolution**, v. 10, n. 1, p. 370–379, 1 jan. 2018.
- KOMAR, D.; JUSZCZYNSKI, P. Rebelled epigenome: histone H3S10 phosphorylation and H3S10 kinases in cancer biology and therapy. **Clinical epigenetics**, v. 12, n. 1, p. 147, 14 out. 2020.
- KUSTERS, C. D. J. et al. [The impact of a premature birth on the family; consequences are experienced even after 19 years]. **Nederlands tijdschrift voor geneeskunde**, v. 157, n. 25, p. A5449, 2013.
- LACAL, I.; VENTURA, R. Epigenetic Inheritance: Concepts, Mechanisms and Perspectives. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 11, p. 292, 2018.
- LANCASTER, E. E. et al. Maternal biological age assessed in early pregnancy is associated with gestational age at birth. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 15440, 29 jul. 2021.
- LASSI, Z. S. et al. Preconception care: caffeine, smoking, alcohol, drugs and other environmental chemical/radiation exposure. **Reproductive health**, v. 11 Suppl 3, n. Suppl 3, 26 set. 2014.
- LEE, H.-E.; AYARPADIKANNAN, S.; KIM, H.-S. Role of transposable elements in genomic rearrangement, evolution, gene regulation and epigenetics in primates. **Genes & genetic systems**, v. 90, n. 5, p. 245–57, 2015.
- LI, E.; ZHANG, Y. DNA methylation in mammals. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 5, p. a019133, 1 maio 2014.
- LI, S.; TOLLEFSBOL, T. O. DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 187, p. 28–43, mar. 2021.
- LI, X. et al. DNA methylation dynamics of long noncoding RNA during human fetal development. **Epigenomics**, v. 13, n. 17, p. 1347–1358, set. 2021.
- LI, Z. et al. Corrigendum: Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. **Nature structural & molecular biology**, v. 24, n. 2, p. 194, 6 fev. 2017.
- LILLYCROP, K. A. et al. Association between perinatal methylation of the neuronal differentiation regulator *HES1* and later childhood neurocognitive function and behaviour. **International Journal of Epidemiology**, v. 44, n. 4, p. 1263–1276, ago. 2015.
- LIU, N. et al. Histone H3 lysine 27 crotonylation mediates gene transcriptional repression in chromatin. **Molecular cell**, v. 83, n. 13, p. 2206- 2221.e11, 6 jul. 2023.

LONG, M. et al. A Histone Acetylation Modulator Gene Signature for Classification and Prognosis of Breast Cancer. **Current oncology (Toronto, Ont.)**, v. 28, n. 1, p. 928–939, 17 fev. 2021.

LOU, C.; GOODIER, J. L.; QIANG, R. A potential new mechanism for pregnancy loss: considering the role of LINE-1 retrotransposons in early spontaneous miscarriage. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 6, 21 dez. 2020.

MA, Y. et al. Tuning Methylation-Dependent Silencing Dynamics by Synthetic Modulation of CpG Density. **ACS synthetic biology**, v. 12, n. 9, p. 2536–2545, 15 set. 2023.

MAHMOUD, A. M.; ALI, M. M. Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation and Cancer Outcome. **Nutrients**, v. 11, n. 3, 13 mar. 2019.

MANGIAVACCHI, A.; MORELLI, G.; ORLANDO, V. Behind the scenes: How RNA orchestrates the epigenetic regulation of gene expression. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 11, p. 1123975, 2023.

MANJEGOWDA, M. C.; GUPTA, P. S.; LIMAYE, A. M. Hyper-methylation of the upstream CpG island shore is a likely mechanism of GPER1 silencing in breast cancer cells. **Gene**, v. 614, p. 65–73, 30 maio 2017.

MARTIN, S. L. LINEs. **Current opinion in genetics & development**, v. 1, n. 4, p. 505–8, dez. 1991.

MARTIN, S. L. Nucleic acid chaperone properties of ORF1p from the non-LTR retrotransposon, LINE-1. **RNA biology**, v. 7, n. 6, p. 706–11, 2010.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human molecular genetics**, v. 15 Spec No 1, p. R17-29, 15 abr. 2006.

MATTIROLI, F.; PENENGO, L. Histone Ubiquitination: An Integrative Signaling Platform in Genome Stability. **Trends in genetics : TIG**, v. 37, n. 6, p. 566–581, jun. 2021.

MAUGERI, A. The Effects of Dietary Interventions on DNA Methylation: Implications for Obesity Management. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8670, 17 nov. 2020.

MAZZONE, R. et al. The emerging role of epigenetics in human autoimmune disorders. **Clinical Epigenetics**, v. 11, n. 1, p. 34, 26 dez. 2019.

MCCLINTOCK, B. The origin and behavior of mutable loci in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 36, n. 6, p. 344–55, jun. 1950.

MEHTA, S. L.; DEMPSEY, R. J.; VEMUGANTI, R. Role of circular RNAs in brain development and CNS diseases. **Progress in neurobiology**, v. 186, p. 101746, mar. 2020.

MILLÁN-ZAMBRANO, G. et al. Histone post-translational modifications - cause and consequence of genome function. **Nature reviews. Genetics**, v. 23, n. 9, p. 563–580, set. 2022.

- MISAN, N. et al. Nutritional behavior in pregnancy. **Ginekologia polska**, v. 90, n. 9, p. 527–533, 2019.
- MISIAK, B.; RICCERI, L.; SĄSIADEK, M. M. Transposable Elements and Their Epigenetic Regulation in Mental Disorders: Current Evidence in the Field. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 580, 2019.
- MITTELSTAEDT, N. N. et al. DNA Methylation and Immune Memory Response. **Cells**, v. 10, n. 11, 29 out. 2021.
- Molecular Biology of the Cell - NCBI Bookshelf.** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>>. Acesso em: 25 jul. 2024.
- MONTACCHIESI, G.; PACE, L. Epigenetics and CD8+ T cell memory. **Immunological reviews**, v. 305, n. 1, p. 77–89, jan. 2022.
- MORLEY, R. et al. Epigenetics and Neonatology. **NeoReviews**, v. 10, n. 8, p. e387–e395, 1 ago. 2009.
- MUSHTAQ, A. et al. Role of Histone Methylation in Maintenance of Genome Integrity. **Genes**, v. 12, n. 7, 29 jun. 2021.
- NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. **EPIGENETICS**. Disponível em: <<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Epigenetics>>. Acesso em: 27 mar. 2024.
- NAZARENO, E. S.; ACHARYA, B.; DUMENYO, C. K. A mini-Tn5-derived transposon with reportable and selectable markers enables rapid generation and screening of insertional mutants in Gram-negative bacteria. **Letters in applied microbiology**, v. 72, n. 3, p. 283–291, mar. 2021.
- NEBBIOSO, A. et al. Cancer epigenetics: Moving forward. **PLoS genetics**, v. 14, n. 6, p. e1007362, jun. 2018.
- NON, A. L. et al. DNA methylation of stress-related genes and LINE-1 repetitive elements across the healthy human placenta. **Placenta**, v. 33, n. 3, p. 183–7, mar. 2012.
- OHUMA E; MOLLER A-B; BRADLEY E. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth in 2020, with trends from 2010: a systematic analysis. **Lancet**, v. In Press, 2023.
- OKI, M.; AIHARA, H.; ITO, T. Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. **Sub-cellular biochemistry**, v. 41, p. 319–36, 2007.
- PAPIN, C. et al. MBD4 loss results in global reactivation of promoters and retroelements with low methylated CpG density. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 42, n. 1, p. 301, 14 nov. 2023.
- PAPPALARDO, X. G.; BARRA, V. Losing DNA methylation at repetitive elements and breaking bad. **Epigenetics & chromatin**, v. 14, n. 1, p. 25, 3 jun. 2021.

PATTERSON, K. et al. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 56, 21 out. 2011.

PEEDICAYIL, J. Genome–Environment Interactions and Psychiatric Disorders. **Biomedicines**, v. 11, n. 4, p. 1209, 19 abr. 2023.

PFEIFER, M. et al. Inter-laboratory adaption of age estimation models by DNA methylation analysis-problems and solutions. **International journal of legal medicine**, v. 134, n. 3, p. 953–961, maio 2020.

PRAVIA, C. I.; BENNY, M. Long-term consequences of prematurity. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 87, n. 12, p. 759–767, dez. 2020.

PROVENZI, L. et al. SLC6A4 methylation as an epigenetic marker of life adversity exposures in humans: A systematic review of literature. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 71, p. 7–20, dez. 2016.

QING, L. et al. Sex-dependent association of DNA methylation in the coding region of the corticotropin-releasing hormone gene and schizophrenia spectrum disorder. **Annals of human biology**, v. 50, n. 1, p. 1–8, fev. 2023.

RAHAT, B. et al. Folic Acid Levels During Pregnancy Regulate Trophoblast Invasive Behavior and the Possible Development of Preeclampsia. **Frontiers in nutrition**, v. 9, p. 847136, 2022.

RAJASEKHARAN, A. et al. Stress and psoriasis: Exploring the link through the prism of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inflammation. **Journal of psychosomatic research**, v. 170, p. 111350, jul. 2023.

RAMOS, K. S.; BOJANG, P.; BOWERS, E. Role of long interspersed nuclear element-1 in the regulation of chromatin landscapes and genome dynamics. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 246, n. 19, p. 2082–2097, out. 2021.

REZENDE, J. **Obstretícia Fundamental**. 15^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2024.

REZNIKOFF, W. S. Tn5 as a model for understanding DNA transposition. **Molecular microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1199–206, mar. 2003.

RICHARDSON, S. R. et al. The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 2, p. MDNA3- 0061–2014, abr. 2015.

RIDEOUT, W. M.; EGGAN, K.; JAENISCH, R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1093–8, 10 ago. 2001.

RINN, J. L.; CHANG, H. Y. Genome regulation by long noncoding RNAs. **Annual review of biochemistry**, v. 81, p. 145–66, 2012.

RYU, H.-Y.; HOCHSTRASSER, M. Histone sumoylation and chromatin dynamics. **Nucleic acids research**, v. 49, n. 11, p. 6043–6052, 21 jun. 2021.

- SAELIW, T. et al. LINE-1 and Alu methylation signatures in autism spectrum disorder and their associations with the expression of autism-related genes. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 13970, 17 ago. 2022.
- SALEH, A.; MACIA, A.; MUOTRI, A. R. Transposable Elements, Inflammation, and Neurological Disease. **Frontiers in neurology**, v. 10, p. 894, 2019.
- SARKAR, A.; LANCIANO, S.; CRISTOFARI, G. Targeted Nanopore Resequencing and Methylation Analysis of LINE-1 Retrotransposons. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2607, p. 173–198, 2023.
- SHADEMAN, M. et al. Promoter methylation, transcription, and retrotransposition of LINE-1 in colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, p. 426, 1 dez. 2020.
- SHAPIRO-MENDOZA, C. K. et al. CDC Grand Rounds: Public Health Strategies to Prevent Preterm Birth. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, n. 32, p. 826–830, 19 ago. 2016.
- SHARMA, A.; SINGH, K.; ALMASAN, A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 920, p. 613–26, 2012.
- SLIEKER, R. C. et al. DNA Methylation Landscapes of Human Fetal Development. **PLoS genetics**, v. 11, n. 10, p. e1005583, out. 2015.
- SPITTLE, A. et al. Early developmental intervention programmes provided post hospital discharge to prevent motor and cognitive impairment in preterm infants. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2015, n. 11, 24 nov. 2015.
- STENZ, L. The L1-dependant and Pol III transcribed Alu retrotransposon, from its discovery to innate immunity. **Molecular biology reports**, v. 48, n. 3, p. 2775–2789, mar. 2021.
- SUAREZ, N. A.; MACIA, A.; MUOTRI, A. R. LINE-1 retrotransposons in healthy and diseased human brain. **Developmental neurobiology**, v. 78, n. 5, p. 434–455, maio 2018.
- SUELVES, M. et al. DNA methylation dynamics in cellular commitment and differentiation. **Briefings in functional genomics**, v. 15, n. 6, p. 443–453, nov. 2016.
- SUFF, N. et al. Amniotic fluid sludge is associated with earlier preterm delivery and raised cervicovaginal interleukin 8 concentrations. **American journal of obstetrics & gynecology MFM**, v. 5, n. 11, p. 101161, nov. 2023.
- SUN, L. et al. Chromatin and Epigenetic Rearrangements in Embryonic Stem Cell Fate Transitions. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 637309, 2021.
- SUTTORA, C. et al. Speech and Language Skills of Low-Risk Preterm and Full-Term Late Talkers: The Role of Child Factors and Parent Input. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 20, 21 out. 2020.

ŚWIATOWY, W. J. et al. Physical Activity and DNA Methylation in Humans. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, 30 nov. 2021.

TAKAHASHI, Y. et al. Transgenerational inheritance of acquired epigenetic signatures at CpG islands in mice. **Cell**, v. 186, n. 4, p. 715- 731.e19, 16 fev. 2023.

TAM, P. L. F.; LEUNG, D. The Molecular Impacts of Retrotransposons in Development and Diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 22, 16 nov. 2023.

TOBI, E. W. et al. Early gestation as the critical time-window for changes in the prenatal environment to affect the adult human blood methylome. **International journal of epidemiology**, v. 44, n. 4, p. 1211–23, ago. 2015.

TRAYLOR, C. S. et al. Effects of psychological stress on adverse pregnancy outcomes and nonpharmacologic approaches for reduction: an expert review. **American journal of obstetrics & gynecology MFM**, v. 2, n. 4, p. 100229, nov. 2020.

TSIGOS, C. et al. **Stress: Endocrine Physiology and Pathophysiology**. [s.l: s.n].

UNITED NATIONS INTER-AGENCY GROUP FOR CHILD MORTALITY ESTIMATION (UN IGME). Levels & trends in child mortality: Report 2022. 2023.

VAIDYA, H. et al. DNA methylation entropy as a measure of stem cell replication and aging. **Genome biology**, v. 24, n. 1, p. 27, 16 fev. 2023.

VAN DEN BERGH, B. R. H. et al. Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 117, p. 26–64, out. 2020.

VERDONE, L.; CASERTA, M.; DI MAURO, E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 83, n. 3, p. 344–53, jun. 2005.

VINK, J.; GYAMFI-BANNERMAN, C. Current preterm birth prevention strategies. **Seminars in perinatology**, v. 41, n. 7, p. 385–386, nov. 2017.

VITNER, D. et al. Community-based, population-focused preterm birth prevention programs - a review. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 302, n. 6, p. 1317–1328, dez. 2020.

VOGT, G. Epigenetics and Phenotypic Plasticity in Animals. Em: **Epigenetics, Development, Ecology and Evolution**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 35–108.

WADDINGTON, C. H. An Introduction to Modern Genetics. By C. H. Waddington. **Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology**, v. 14, n. 4–6, p. 82–82, 2 abr. 2009.

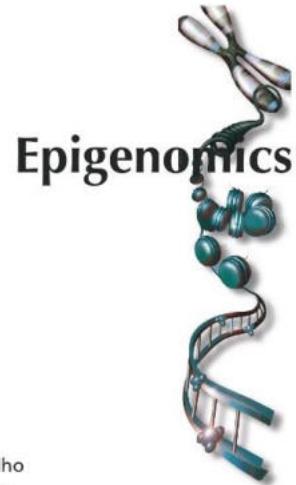
WANG, Z.; KUNZE, R. Transposons in Eukaryotes: Structures, Mechanisms and Applications. 2015.

- WEAKE, V. M.; WORKMAN, J. L. Histone ubiquitination: triggering gene activity. **Molecular cell**, v. 29, n. 6, p. 653–63, 28 mar. 2008.
- WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973–82, dez. 2007.
- WIKIMEDIA COMMONS. **Histone modifications and DNA accessibility**. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Histone_modifications_and_DNA_accessibility.png>. Acesso em: 25 jul. 2024.
- WILSON, C. A. et al. Alcohol, smoking, and other substance use in the perinatal period. **BMJ**, v. 369, 11 maio 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Born Too Soon: Decade of action on preterm birth. 2023.
- WU CT; MORRIS, J. R. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1103–5, 10 ago. 2001.
- WU, Y. et al. Analysis of two birth tissues provides new insights into the epigenetic landscape of neonates born preterm. **Clinical Epigenetics**, v. 11, n. 1, p. 26, 11 dez. 2019.
- XIE, J. et al. Dynamic Regulation of DNA Methylation and Brain Functions. **Biology**, v. 12, n. 2, 18 jan. 2023.
- XU, J.-Z.; ZHANG, J.-L.; ZHANG, W.-G. Antisense RNA: the new favorite in genetic research. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 19, n. 10, p. 739–749, 2018.
- YANG, A. S. et al. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 3, p. e38, 18 fev. 2004.
- YANG, C.-H.; ANDREW POSPISILIK, J. Polyphenism - A Window Into Gene-Environment Interactions and Phenotypic Plasticity. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 132, 2019.
- ZHA, J.-J.; TANG, Y.; WANG, Y.-L. Role of mono-ADP-ribosylation histone modification (Review). **Experimental and therapeutic medicine**, v. 21, n. 6, p. 577, jun. 2021.
- ZHANG, X.; ZHANG, R.; YU, J. New Understanding of the Relevant Role of LINE-1 Retrotransposition in Human Disease and Immune Modulation. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 657, 2020.

ANEXOS

Anexo 1 Artigo publicado – Revista Qualis A2 – Fator de Impacto (2022) = 3,8

Research Article



NR3C1 gene methylation and cortisol levels in preterm and healthy full-term infants in the first 3 months of life

Georgia Chalfun^{1,2}, Aline de Araújo Brasil¹, Vitor Barreto Paravidino^{3,4}, Sheila Coelho Soares-Lima⁵, Monique de Souza Almeida Lopes⁵, Margarida dos Santos Salú¹, Paulo Victor Barbosa E dos Santos¹, Ana Carolina P da Cunha Trompiere¹, Leo Travassos Vieira Milone¹, Gustavo Rodrigues-Santos¹, Mariana Barros Genuíno de Oliveira¹, Jaqueline Rodrigues Robaina¹, Fernanda Lima-Setta¹, Marcelo Martins Reis¹, Antônio José Ledo Alves da Cunha^{1,6}, Arnaldo Prata-Barbosa^{*,1,6} & Maria Clara de Magalhães-Barbosa¹

¹Department of Pediatrics, D'Or Institute for Research & Education (IDOR), Rio de Janeiro, RJ, 22281-100, Brazil

²Department of Neonatology, Maternity School, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), RJ, 22240-000, Brazil

³Department of Epidemiology, Institute of Social Medicine, University of the State of Rio de Janeiro (UERJ), 20550-013, Brazil

⁴Department of Physical Education & Sports, Naval Academy, Brazilian Navy, Rio de Janeiro, RJ, 20021-010, Brazil

⁵Molecular Carcinogenesis Program, Brazilian National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, 20230-130, Brazil

⁶Postgraduate Program in Perinatal Health, Maternity School, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), RJ, 22240-000, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 21 3883 6000; arnaldo.prata@idor.org

Aim: To describe *NR3C1* exon-1F methylation and cortisol levels in newborns. **Materials & methods:** Preterm ≤ 1500 g and full-term infants were included. Samples were collected at birth and at days 5, 30 and 90 (or at discharge). **Results:** 46 preterm and 49 full-term infants were included. Methylation was stable over time in full-term infants ($p = 0.3116$) but decreased in preterm infants ($p = 0.0241$). Preterm infants had higher cortisol levels on the fifth day, while full-term infants showed increasing levels ($p = 0.0177$) over time. **Conclusion:** Hypermethylated sites in *NR3C1* at birth and higher cortisol levels on day 5 suggest that prematurity, reflecting prenatal stress, affects the epigenome. Methylation decrease over time in preterm infants suggests that postnatal factors may modify the epigenome, but their role needs to be clarified.

Plain language summary: We investigated the methylation of a gene, *NR3C1* exon-1F, and cortisol levels in newborns. DNA methylation is a biochemical process that can modify gene activity. In the case of this gene, higher methylation might be associated with higher cortisol levels. We studied 46 preterm infants (born weighing 1500 g or less) and 49 full-term infants. Our results revealed that the preterm infants had hypermethylation at birth and higher cortisol levels on day 5, but decreasing methylation and stable cortisol levels over time. Meanwhile, methylation remained stable and cortisol levels increased in full-term babies with time. These unexpected results suggest that prematurity can be associated with prenatal epigenetic changes in the *NR3C1* gene, but postnatal factors may induce further modifications. More research is needed to understand these findings better.

Tweetable abstract: Preterm infants have higher rates of *NR3C1* gene methylation and cortisol levels at birth than term infants, but this difference reverses over time in the first 3 months of life. #Epigenetics #NR3C1

First draft submitted: 7 December 2022; Accepted for publication: 2 February 2023; Published online: 2 March 2023

Keywords: DNA methylation • epigenetics • glucocorticoid receptor • neonatal intensive care unit • *NR3C1* gene • perinatal stress

The first 1000 days of life after conception represent a period in which the developing brain is more subject to external influences, impacting learning, behavior and physical and mental health [1]. Exposure to intense and

Future
Medicine

prolonged adversities in this period can unbalance the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, the main mechanism for stress regulation [2,3], and can be harmful to neurological and behavioral development [4–6].

Epigenetic alterations in *NR3C1*, responsible for glucocorticoid receptor transcription, seem to play an essential role in the HPA axis disarrangement. Methylation of *NR3C1* decreases its expression and impairs the negative feedback loop's sensitivity, further enhancing cortisol levels and subsequently predisposing individuals to disease [7]. Several studies describe associations between early stress in life (e.g., childhood adversities) and *NR3C1* gene methylation in different tissues, including the brain [8], peripheral blood [9,10] and saliva [11,12]. *NR3C1* gene methylation is related to the type and chronicity of adverse experiences in childhood [13]. Maternal stress during pregnancy has also been associated with methylation of *NR3C1* in the cord blood and placenta [14–19]. Most studies have reported increased methylation of *NR3C1* related to traumatic childhood experiences [2]. The 1_F region of the *NR3C1* gene, which corresponds to region 1_T in rodents, has been the most investigated after a pioneering study by Weaver *et al.* demonstrated an association between greater maternal care in rats and a lower HPA axis response to stress, with reduced methylation in the *NR3C1* gene in pups [20].

One of human life's earliest potential adversities is prematurity (with extremely or very low birthweight), which is always associated with the need for prolonged care in a neonatal intensive care unit (NICU) [21]. Premature birth itself may reflect prenatal stress [22]. Although essential for the survival of very low-birthweight infants, prolonged NICU admission is associated with intense stress due to excessive sound and light stimulation, frequent venipunctures, ventilatory support, infections and other sources of suffering, with reduced interaction with the mother and family [23,24]. Repeated activation of the stress response in a period of great sensitivity to external stimuli for brain remodeling can have severe consequences for the newborn [25].

Chronic and intense activation of the stress response system can cause an excessive and prolonged release of mediators, leading to chronic hyperactivation or hypoactivation of the HPA axis [6]. In the first week of life, a proportion of extremely preterm infants are transiently unable to produce cortisol at adequate levels to maintain homeostasis, with an adaptation of the HPA axis around 14 days of life [26]. However, late preterm and critically ill term infants also have an inadequate hormonal response to stress, keeping adrenocorticotropin and cortisol levels low [27]. The adrenal gland undergoes complex adaptive changes in the neonatal period, causing transient hypoadrenalinism and a decline in cortisol concentration [28,29], both by gland immaturity and transitory enzyme deficiencies [26]. As the placenta produces large amounts of corticotropin-releasing hormone, the loss of stimulus at birth may compromise the ability to respond to HPA axis disease in the immediate neonatal period, causing relative adrenal insufficiency [30]. External factors, such as antenatal corticosteroid use, also reduce cortisol levels immediately after delivery [28].

A few studies have evaluated *NR3C1* gene methylation in preterm infants admitted to the NICU [31–33] but showed contradictory results. Hypermethylation [31,32] and hypomethylation [33] were associated with more severe conditions. The heterogeneity of studies due to different methods of methylation analysis and different CpG sites analyzed makes it challenging to interpret the results. Many gaps remain regarding the impact of prematurity and NICU admission on the methylation status of the 1_F region of *NR3C1*. We hypothesized that preterm infants have hypermethylation of the 1_F region of *NR3C1* at birth, reflecting prenatal stress, compared with healthy full-term infants. Another hypothesis is that the methylation status of this region in premature infants increases during NICU stay compared with the methylation status of healthy full-term newborns during the first 3 months of life.

This study aims to describe the methylation pattern of the 1_F region of the *NR3C1* gene and cortisol levels from birth to hospital discharge in premature newborns during their stay in the NICU compared with healthy full-term newborns not hospitalized in the first 3 months of life.

Materials & methods

Study design, study population & ethics

This is an observational, longitudinal, prospective study. Preterm infants ≤ 1500 g and appropriate for gestational age [34], who were those with an expected prolonged NICU stay, were included consecutively from April 2018 to May 2019. Healthy full-term infants born at ≥ 37 weeks and appropriate for gestational age who were born in the same period were also included [35]. Data from patients who died or did not return for follow-up after entering the study were considered up to the point at which they participated. The research ethics committees of the institutions involved approved the study. All parents or legal guardians signed written informed consent agreeing to their children's participation in the study and to the inclusion of their data, which have been anonymized.

Collection of sociodemographic, clinical & laboratory data

Sociodemographic and clinical variables of neonates and pregnant women were extracted from medical records. Gestational age was determined by first-trimester ultrasound, supplemented by the date of the last menstrual period. In the absence of these data, the neonatologist used the newborn's physical examination (Ballard and/or Capurro methods). For preterm infants, severity scores (Clinical Risk Index for Babies [36] and Score for Neonatal Acute Physiology Perinatal Extension [37]) were collected on admission to the NICU, and the Neonatal Therapeutic Intervention Scoring System score [38] was recorded daily.

Umbilical cord blood samples were collected from all infants at birth (day 0: D0) to analyze *NR3C1* gene methylation. Peripheral blood samples were collected for testing of *NR3C1* methylation and cortisol levels on day 5 of life (D5) in all infants (preterm and term newborns) and on day 30 of life (D30) and day of hospital discharge (Dd) in preterm infants. Term newborns had buccal swabs collected for both exams (*NR3C1* methylation and cortisol levels) on D30 and D90 of life.

For *NR3C1* methylation testing, blood samples were collected in tubes containing potassium ethylenediaminetetraacetic acid as an anticoagulant and initially stored at 2–8°C at the maternity hospital for up to 72 h before being transported to the epigenetic laboratory, where they were aliquoted and held at -80°C until the subsequent processing steps were carried out. Buccal swabs (Oracollect-DNA, OCR-100, DNA GENOTEK Inc, Ottawa, Canada) were collected by placing the swab where the gum touched the cheek mucosa. When positioned, the swab was gently rubbed ten-times in this region and on the opposite side of the mouth, with repetitive forward and backward movements. Then the swab was placed in the tube containing the collection liquid, which was closed and vigorously inverted for 15 s. The tubes with the biological material were stored at laboratory room temperature (20–25°C) until being analyzed up to 3 months after collection [39].

For cortisol analysis, preterm newborns had blood samples collected in a gel tube on D5, D30 and D90, and term newborns on D5. After clot retraction, they were centrifuged for 12 min at 3200 r.p.m. Salivary samples were collected from term newborns on D30 and D90 using a tube with a V-bottom (Salivette, Sarstedt, São Paulo, Brazil), which was kept in the mouth for 3 min or as long as necessary to become saturated with saliva. Then they were centrifuged for 5 min at 4000 r.p.m. Serum and salivary cortisol samples were always collected at 8 am and stored at 2–8°C in the maternity hospital for up to 72 h until they were transported to the epigenetic laboratory.

A neonatologist of the NICU team collected all samples.

Methylation analysis of *NR3C1*

Genomic DNA was extracted from blood mononuclear cells or buccal cells using a DNeasy Blood & Tissue Kit (#69506, Qiagen, Hilden, Germany). The quantity and purity of DNA were determined using a NanoDrop™ spectrophotometer 2000c (ThermoFisher Scientific, MA, USA). The amount of 1000 ng of genomic DNA was bisulfite-converted using the EZ-96 DNA Methylation Kit (#D5002, Zymo Research, CA, USA). According to the manufacturer's instructions, the converted DNA was eluted with 24 µl of the M-elution buffer. Next, 2 µl of bisulfite-converted DNA was amplified by PCR on the Veriti™ 96-well thermal cycler (Applied Biosystems, CA, USA) using a PyroMark PCR kit (#978703, Qiagen) in a total volume of 50 µl containing 0.2 µM of primers and PyroMark PCR Master Mix; 1% agarose gel electrophoresis was used to confirm DNA amplification. Biotinylated PCR products in a total volume of 40 µl were immobilized on streptavidin-coated sepharose beads (GE Healthcare, IL, USA). Subsequently, pyrosequencing was performed using PyroGold PyroMark Q96 reagents on the PyroMark Q96 ID (both from Qiagen). The methylation percentage of each CpG site was generated automatically using the PyroMark Q96 software (v. 2.5.8) with standard quality control settings. PCR primers and pyrosequencing primers were designed with PyroMark Assay Design SW2.0 (Qiagen) to target 40 CpG sites of the *NR3C1* 1_F region (8–47, according to standard numbering sites revised by Chalfun *et al.* [40]) (Figure 1). A detailed protocol with the steps for methylation analysis is provided in Supplementary Material 1.

Analysis of cortisol

Serum cortisol was measured using an enzymatic chemiluminescence assay with a Cobas 8000 analyzer series e602 (Roche Diagnostics, São Paulo, Brazil), and salivary cortisol was measured using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, according to the manufacturer's instructions (Waters/Micromass, Manchester, UK).

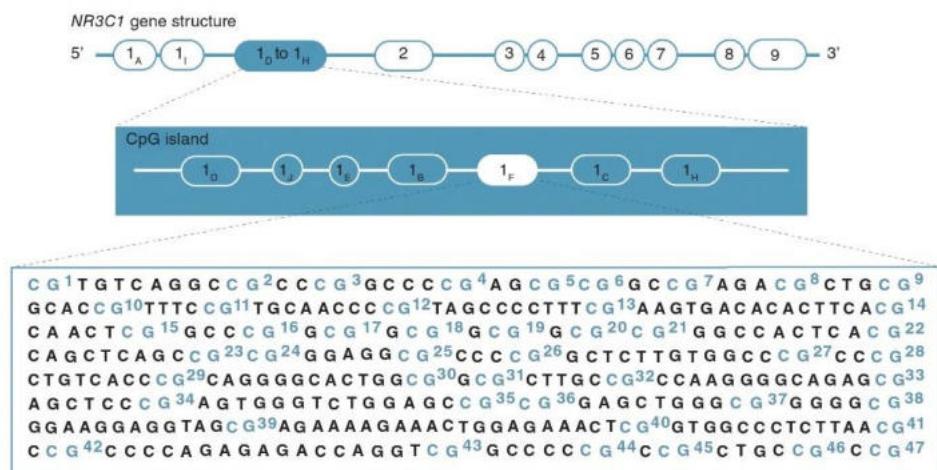


Figure 1. CpG sites at the 1_F exon of the *NR3C1* gene.

Statistical analysis

Depending on the required analyses, methylation percentages were reported as mean and standard deviation or median and interquartile range (IQR). Cortisol levels were reported as z-scores due to different reference levels for blood and saliva samples. The medians between groups were compared using the Mann–Whitney U test. Using generalized linear models, longitudinal analyses of the percentage of methylation were performed for each CpG site and the 40 CpG sites in conjunction (total methylation). The analysis was performed using the PROC GENMOD procedure in SAS OnDemand for Academics (SAS Institute, Inc., NC, USA), with a log-link function and γ -distribution due to the asymmetric distribution of the outcome variable. We fitted models to our data, including the variables time, group, and the time*group interaction. Autoregressive, exchangeable, independent and unstructured covariance matrix structures were tested, and the appropriate structure was selected for each site based on the ‘quasi-likelihood under the independence model criterion’ parameter. Longitudinal analysis of the z-scores of cortisol levels was performed using a linear mixed-effects model (PROC MIXED procedure in SAS) with an unstructured covariance matrix. The trend of changes in the percentage of methylation and cortisol levels over time (increase or decrease) in each group and the comparison between groups of the course of methylation percentage and cortisol levels over time were evaluated.

Results

Study data, demographic & clinical features

A total of 46 premature babies and 49 full-term babies were included in the study. In the preterm group, 34 babies completed the study with all samples collected; five died between D5 and D10 but had samples from D0 and D5 analyzed, and seven had no Dd sample. In the group of full-term newborns, 35 completed the study until D90, one returned only on D5, and 13 did not return for follow-up.

In premature infants, the median gestational age was 28.5 weeks (IQR: 27–30), and the median birth weight was 1075 g (IQR: 860–1345); 76% were born by cesarean section, with a 5-min median Apgar score of 8 (IQR: 8–9). The median length of stay in the NICU was 61 days (IQR: 38–74). The mean Dd of the preterm infants who had samples collected on this day was widely variable (69.5 ± 32 days); the median was 62 days (IQR: 45–75). The median Neonatal Therapeutic Intervention Scoring System score was 19 (IQR: 16–25.8). The most frequent clinical conditions in this group were metabolic disorders (56.5%), patent ductus arteriosus (47.8%), hyaline membrane disease (43.5%) and bronchopulmonary dysplasia (41.3%). Confirmed sepsis occurred in 19.6%. Approximately 80% used nasal continuous positive airway pressure, 53% underwent invasive mechanical ventilation, and 37% used inhaled corticosteroids at the time of hospital discharge. Term infants had a median gestational age of 39 weeks (IQR: 38–40) and median birth weight of 3320 g (IQR: 3150–3575); 45% were born by cesarian section,

Table 1. Demographic and clinical characteristics of pregnant women, preterm and term newborns.

Characteristics	Preterm (n = 46)	Term (n = 49)
Maternal age (years): median (IQR)	31 (25.25–34)	28 (24–34)
Maternal education (years): n (%)		
1–4	1 (2.2)	0 (0.0)
5–8	7 (15.2)	9 (18.4)
9–11	8 (17.4)	13 (26.5)
>12	30 (65.2)	27 (55.1)
Family income (USD): n (%)		
<\$200	13 (28.3)	4 (8.2)
\$200–400	17 (37)	29 (59.2)
>\$400	16 (34.8)	16 (32.7)
Ethnicity: n (%)		
White	18 (39.1)	22 (44.9)
Black	13 (28.3)	5 (10.2)
Mixed race	15 (32.6)	22 (44.9)
Health conditions: n (%)		
Diabetes	7 (15.2)	10 (20.4)
Hypertension	11 (23.9)	6 (12.2)
Preeclampsia	12 (26.1)	3 (6.1)
Hypothyroidism	5 (10.9)	3 (6.1)
Smoking: n (%)	2 (4.3)	3 (6.1)
Alcohol consumption: n (%)	4 (8.7)	1 (2.0)
Prenatal consultations: median (IQR)	5 (4–7)	9 (7–10)
Gestational age (weeks): median (IQR)	28.5 (27–30)	39 (38–40)
Mode of delivery: n (%)		
Cesarean section	35 (76.1)	22 (44.9)
Vaginal delivery	11 (23.9)	27 (55.1)
Apgar score (1 min): median (IQR)	7 (4.25–8)	8 (8–9)
Apgar score (5 min): median (IQR)	8 (8–9)	9 (9–9)
Sex: n (%)		
Male	25 (54.3)	29 (59.2)
Female	21 (45.7)	20 (40.8)
Birthweight (g)		
Mean (SD)	1074.46 (290)	3393 (385)
Median (IQR)	1075 (860–1345)	3320 (3150–3575)
Length (cm)		
Mean (SD)	35.9 (3.4)	48.8 (1.8)
Median (IQR)	36.4 (34–37.5)	49 (47.5–49.6)
Head circumference (cm)		
Mean (SD)	26 (2.4)	34.4 (1.5)
Median (IQR)	26 (24.6–28)	34 (33.5–35)

IQR: Interquartile range; SD: Standard deviation.

with a 5-min median Apgar score of 9 (IQR: 9–9). These and other demographic and clinical features are shown in Tables 1 & 2.

Comparison of the magnitude of methylation between groups

At birth, we detected methylation (any percentage other than zero) at 32 sites in preterm infants and 26 in full-term infants (Table 3). Preterm newborns showed significantly higher percentages of methylation in CpG 12 ($p = 0.029$), 42 ($p = 0.001$) and 47 ($p = 0.005$) compared with full-term infants. On D5, the only significant difference between groups was a lower percentage of methylation at CpG 33 ($p = 0.036$) in preterm infants; on

Table 2. Clinical characteristics of the preterm infants (n = 46).

Gestational age (weeks): median (IQR)	28.5 (27–30)
Anthropometric measures at birth: median (IQR)	
Birth weight (g)	1075 (860–1345)
Length (cm)	36.4 (34–37.5)
Head circumference (cm)	26 (24.6–28)
Length of NICU stay (days): median (IQR)	61 (38–74)
Anthropometric measures at discharge: median (IQR)	
Weight (g)	2390 (2010–3011)
Length (cm)	44.5 (42–47.9)
Head circumference (cm)	32.5 (31–33.9)
Severity scores: median (IQR)	
CRIB score	2 (1–5)
SNAPPE II score	23 (13–34)
NTISS total score	19 (16–25.8)
Clinical conditions during NICU stay	
Respiratory	
Respiratory distress syndrome: n (%)	20 (43.5)
Days of supplemental oxygen: median (IQR)	18 (6–51.8)
CPAP: n (%)	37 (80.4)
Days of CPAP: median (IQR)	12 (1.25–35.5)
Mechanical ventilation: n (%)	25 (53.3)
Days of mechanical ventilation: median (IQR)	1 (0–6)
Bronchopulmonary dysplasia: n (%)	19 (41.3)
Inhaled corticosteroid: n (%)	17 (37.0)
Venous corticosteroid: n (%)	5 (10.9)
Infectious and cardiovascular	
Confirmed sepsis (positive blood culture): n (%)	9 (19.6)
Suspected sepsis (negative blood culture): n (%)	27 (58.7)
Shock: n (%)	16 (34.8)
Vasopressor administration: n (%)	15 (32.6)
Necrotizing enterocolitis: n (%)	5 (10.9)
PDA: n (%)	22 (47.8)
Neurological and ophthalmological	
Intracranial hemorrhage: n (%)	14 (30.4)
Retinopathy of prematurity: n (%)	11 (23.9)
Retinopexy: n (%)	2 (4.3)
Metabolic and surgical	
Metabolic and electrolyte disorders: n (%)	26 (56.5)
Metabolic bone disease: n (%)	4 (8.7)
Surgeries: n (%)	6 (13.0)
General care	
Central venous line: n (%)	46 (100)
Days of central venous line: median (IQR)	14 (9–16.8)
Phototherapy: n (%)	40 (87.0)
Red blood cell transfusion: n (%)	27 (58.7)
Days of total parenteral nutrition: median (IQR)	9 (6–11)

CPAP: Continuous positive airway pressure; CRIB: Clinical Risk Index for Babies; IQR: Interquartile range; NICU: Neonatal intensive care unit; NTISS: Neonatal Therapeutic Intervention Scoring System; PDA: Patent ductus arteriosus; SNAPPE II: Score for Neonatal Acute Physiology Perinatal Extension.



Table 3. Methylation of CpG sites 8–47 of exon 1_F of *NR3C1* from birth to hospital discharge in preterm infants and from birth to day 90 of life in healthy full-term newborns.

		Preterm infants	Full-term infants	p-value [†]
Day 0	Sites with 0% methylation (n)	8	14	
	Number of sites with detectable methylation (n)	32	26	
	Mean overall methylation percentage (%)	0.54 ± 1.94	0.40 ± 1.76	0.001 [‡]
Day 5	Sites with 0% methylation (n)	18	16	
	Number of sites with detectable methylation (n)	22	24	
	Mean overall methylation percentage (%)	0.36 ± 1.64	0.44 ± 1.90	0.793
Day 30	Sites with 0% methylation (n)	23	25	
	Number of sites with detectable methylation (n)	17	15	
	Mean overall methylation percentage (%)	0.27 ± 1.21	0.59 ± 2.33	0.760
Dd/day 90	Sites with 0% methylation (n)	17	19	
	Number of sites with detectable methylation (n)	23	21	
	Mean overall methylation percentage (%)	0.28 ± 1.12	0.51 ± 2.09	0.450

[†]Mann–Whitney U test.

[‡]Percentage of methylation in preterm infants higher than in term infants. Bold value indicates p < 0.01.

D0: Day of birth; Dd: Day of hospital discharge in premature infants.

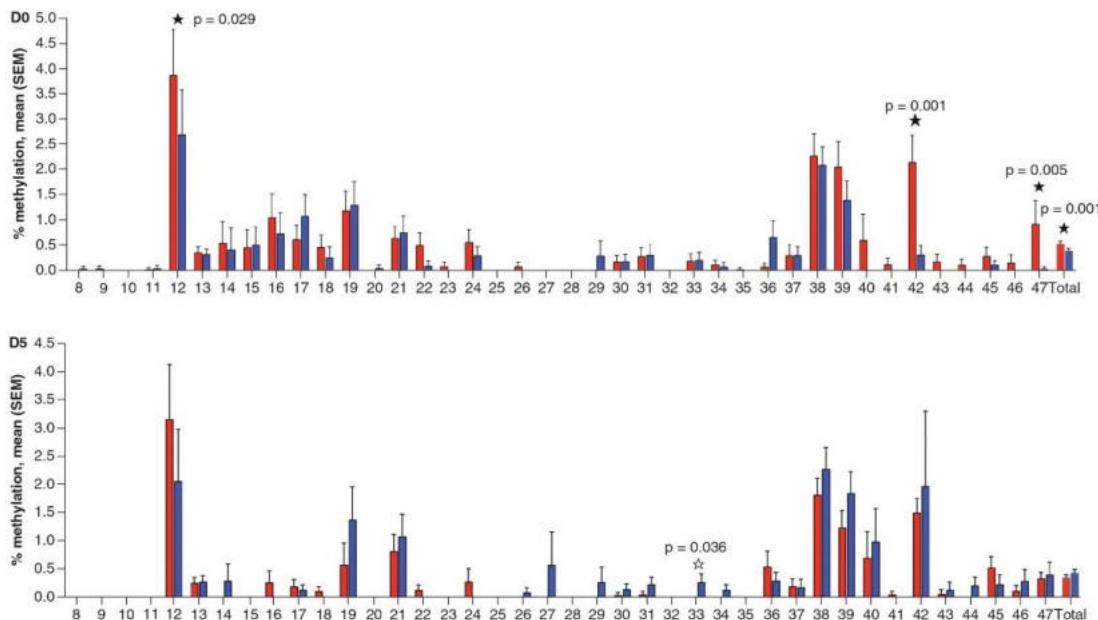


Figure 2. Mean percentage of methylation and its standard error (whisker) at *NR3C1* CpG sites 8–47 of preterm infants (red bars) compared with term infants (blue bars) on day of birth and day 5. Solid stars mean that preterm infants had a significantly higher methylation percentage in these sites. Empty stars indicate that term infants had a significantly higher methylation rate at these sites (Mann–Whitney U test).

D0: Day of birth; D5: Day 5 of life.

D30, methylation percentages in preterm infants were significantly lower in CpG 21 ($p = 0.003$), 36 ($p = 0.004$), 37 ($p = 0.013$), 38 ($p = 0.030$) and 47 ($p = 0.046$), and higher in CpG 42 ($p = 0.001$) and 45 ($p = 0.043$). On Dd in preterm infants, compared with D90 in full-term infants, the percentage of methylation was significantly lower in CpG 21 ($p = 0.004$) and 36 ($p = 0.008$) and higher in CpG 42 ($p = 0.002$) (Figures 2 & 3 & Supplementary

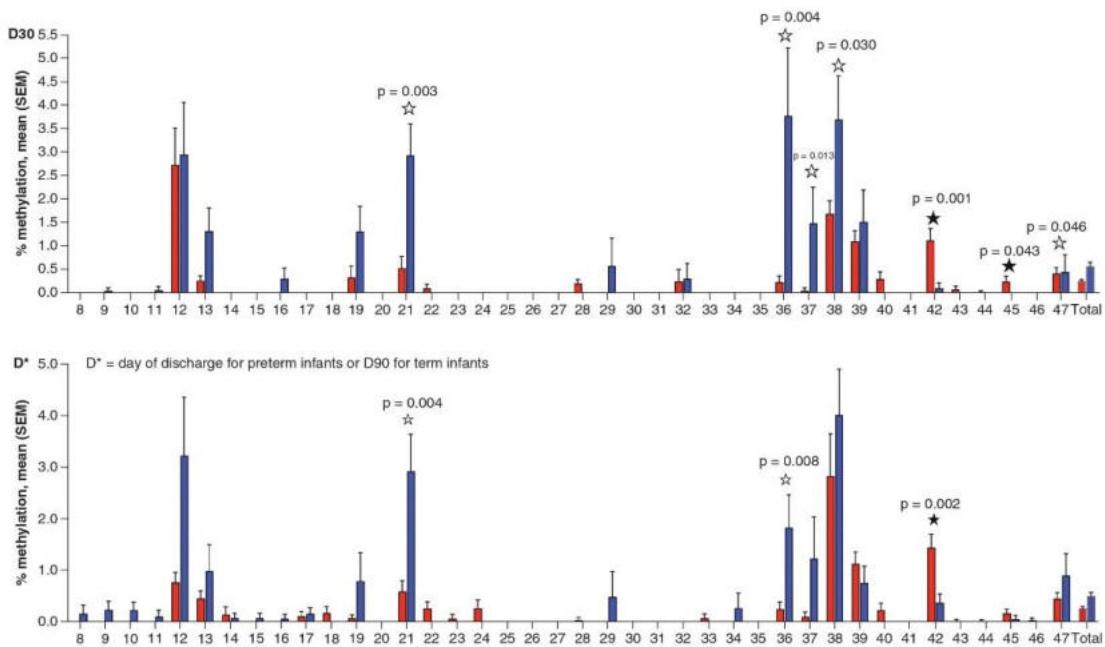


Figure 3. Mean percentage of methylation and its standard error (whisker) at NR3C1 CpG sites 8–47 of preterm infants (red bars) compared with term infants (blue bars) on day 30, day of discharge from the neonatal intensive care unit for preterm infants, and day 90 for term infants. Solid stars mean that preterm infants had a significantly higher methylation percentage in these sites. Empty stars indicate that term infants have a significantly higher methylation rate at these sites (Mann–Whitney U test).

Dd: Day of discharge; D30: Day 30 of life; D90: Day 90 of life.

Tables 1–4). Regarding the mean overall methylation percentage of sites 8–47 of exon 1_F, preterm newborns had a significantly higher percentage methylation at birth compared with full-term infants (0.54 ± 1.94 vs 0.40 ± 1.76 ; $p = 0.001$), but there was no difference between the groups on D5 (0.36 ± 1.64 vs 0.44 ± 1.90 ; $p = 0.793$), on D30 (0.27 ± 1.21 vs 0.59 ± 2.33 ; $p = 0.760$) or on the last day (0.28 ± 1.12 vs 0.51 ± 2.09 ; $p = 0.450$) (Table 3 & Supplementary Tables 1–4).

The trend of methylation over time in each group

In preterm infants, methylation percentages decreased over time at eight sites (CpG 12, 15, 16, 19, 30, 31, 34 and 41), increased at two sites (CpG 28 and 32) and remained undetectable at six sites (CpG 8, 10, 20, 25, 27 and 29). In 24 sites, the changes were not significant (Figures 2 & 3 & Supplementary Table 5). In full-term infants, methylation percentages decreased over time at 11 sites (CpG 18, 24, 26, 27, 30, 31, 33, 40, 43, 44 and 46), increased at eight sites (CpG 9, 10, 13, 21, 32, 36, 37 and 38) and remained undetectable at five sites (CpG 23, 25, 28, 3 and 41). In 16 sites, the changes were not significant (Figures 2 & 3 & Supplementary Table 5). It was not possible to analyze changes at CpG 25, as the percentage methylation remained undetectable on all occasions in both groups. The mean overall methylation percentage of sites 8–47 exhibited no significant change over time in the full-term infant group ($p = 0.3116$) but decreased in the preterm infant group ($p = 0.0241$) (Figure 4 & Supplementary Table 5).

Comparison of methylation changes over time between groups

Comparing the changes in the methylation percentage over time between groups showed significant differences at 13 sites (CpG 9, 10, 16, 19, 21, 24, 27, 28, 33, 36, 40, 41 and 47), nine of which (CpG 9, 10, 16, 19, 21, 27, 36, 47 and 33) showed smaller changes in methylation percentage in the preterm group compared with the full-term infants. It was impossible to compare changes at CpG 25 between groups, as the percentage of methylation

NR3C1 gene methylation & cortisol levels in preterm & healthy full-term infants in the first 3 months of life Research Article

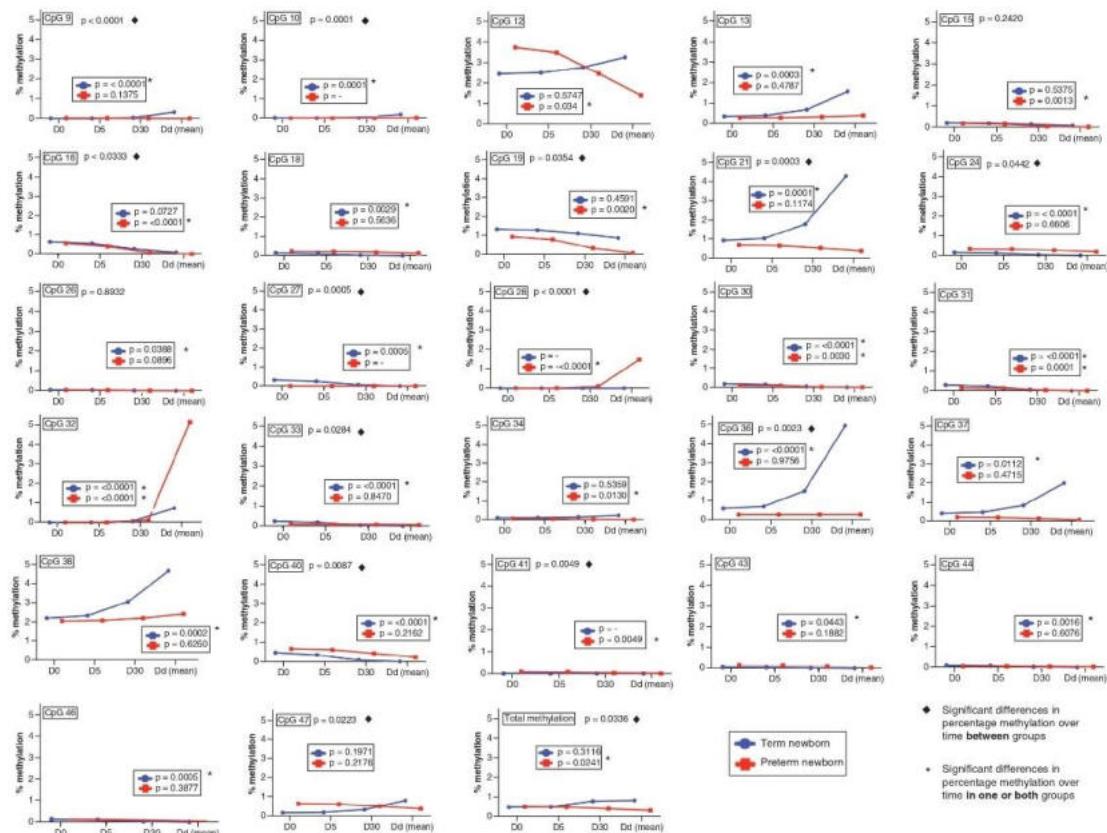


Figure 4. Longitudinal analysis of the methylation percentage over time at CpG sites 8–47 of exon 1F of NR3C1 from the day of birth to the mean day of discharge in preterm infants admitted to the neonatal intensive care unit (red line) or up to the 90th day of life in healthy term infants (blue line). The figure shows the 26 sites (out of 40 sites analyzed) that exhibited a significant trend of changes over time in one or both groups (*) and the total methylation trend over time (CpGs 8–47). When there were no changes in the methylation percentage over time, p-values could not be estimated ($p = -$). The figure also shows the 13 CpG sites (out of 40 sites analyzed) that exhibited significant differences in percentage methylation over time between groups (♦). The trend of changes in each group (preterm and term infants) and the comparison of methylation percentages between groups (group*time) were estimated using the GENMOD procedure of SAS OnDemand for Academics (SAS Institute, Inc., NC, USA).

remained undetectable on all occasions in both groups. A significant difference was also observed when comparing the changes in the mean overall methylation percentage of exon 1F between groups ($p = 0.0336$) (Figure 4 & Supplementary Table 6).

Analysis of cortisol levels

On D5, cortisol levels were significantly higher in preterm infants than in full-term infants ($p < 0.0001$). On D30 and the day of the last measurement, there was no significant difference between the groups ($p = 0.245$ and $p = 0.866$, respectively) (Figure 5 & Supplementary Table 7). Between D5 and the last measurement, cortisol levels increased significantly in full-term infants ($p = 0.0177$) but showed a nonsignificant decrease in preterm infants ($p = 0.6375$) (Figure 5 & Supplementary Table 8). The comparison of changes in cortisol levels over time between the groups showed no difference ($p = 0.0879$) (Figure 5 & Supplementary Table 9). The intra- and inter-assay

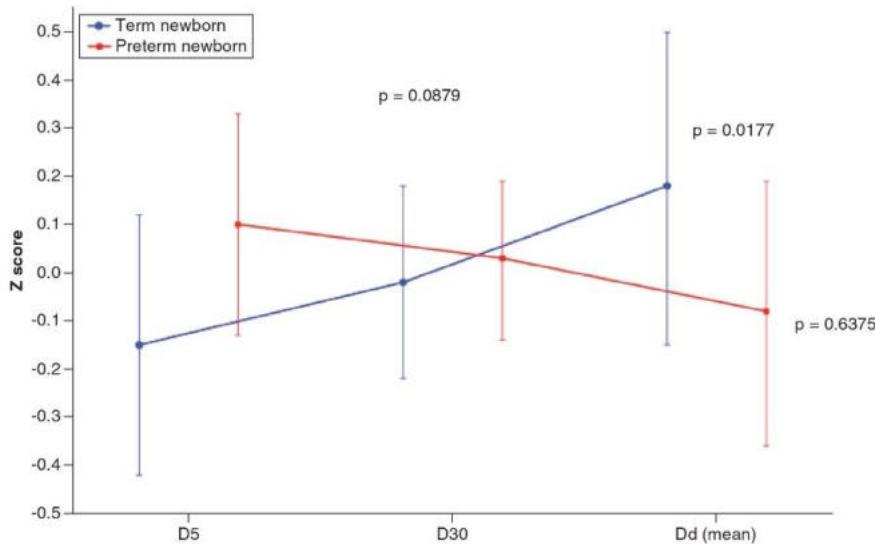


Figure 5. Longitudinal analysis of z-scores of cortisol levels, from the fifth day of life to the mean day of discharge in preterm infants admitted to the neonatal intensive care unit (red line) or 90th day of life in healthy term infants (blue line). There was a significant change over time in the preterm group, but no difference between groups. The trend of changes in cortisol levels over time (decrease or increase) in each group (p-values next to the curves) and the comparison between groups (p-value at the top) were estimated using the mixed procedure of SAS OnDemand for Academics (SAS Institute, Inc., NC, USA).

coefficients of variation (imprecision) for measured cortisol levels were: for serum cortisol, 6.7% (intra-assay) and 7.9% (inter-assay); for salivary cortisol, 3.52% (intra-assay) and 3.56% (inter-assay).

Discussion

In this study we observed a similar number of methylated sites (except on the day of birth) in the 1_F promoter region of *NR3C1* in both preterm and full-term newborns during the first 3 months of life. Hypermethylation was present in a few sites in the preterm infants at birth, but hypomethylation predominated later. Preterm infants had fewer sites with changes in the percentage methylation over time (decrease or increase), but the predominant change in specific sites in both cohorts was a decrease. On the other hand, the mean overall methylation percentage of the studied sites of exon 1_F showed no significant change over time in full-term infants, but decreased in preterm infants. The clinical meaning of these observations is still obscure and difficult to interpret given that we expected to see an overall increase in methylation percentages in the preterm group during the NICU stay. Comparing the changes in methylation over time between groups, significant differences were observed in one-third of the CpG sites. In parallel, cortisol levels on D5 were higher in preterm than in full-term infants. While cortisol levels did not significantly change over time in preterm infants, they increased in full-term infants. Still, no significant difference between groups was observed when comparing these changes over time. The higher cortisol levels observed in preterm infants on the fifth day of life compared with full-term newborns may reflect the clinical severity of preterm infants included in this study.

Some studies have assessed factors such as prematurity and NICU admission and compared the methylation status of different genes in preterm and term newborns [41–44]; however, few have evaluated the *NR3C1* gene [31–33], which is crucial in regulating the HPA axis.

Our results were intriguing and the opposite of what we expected. Our hypothesis – based on theories about HPA dysregulation associated with stress-induced glucocorticoid receptor gene methylation [40,45–47] – was that prematurity and adverse experiences during NICU admission would result in an increased percentage of methylation in exon 1_F of *NR3C1* and increased cortisol levels in preterm infants from birth to hospital discharge compared with

healthy full-term newborns discharged home and evaluated in the same time window. Studies have demonstrated that prolonged and repeated exposure to painful procedures in the neonatal period affects brain organization and neurodevelopment and is associated with increased methylation in stress-related genes [23,48]. This evidence supports our hypothesis. However, we observed that, except at birth, the predominant difference between groups was hypomethylation in preterm infants compared with full-term infants. It is possible that the inadequate intrauterine environment, culminating in preterm labor, represents a more intense source of stress than the subsequent adversities experienced in the NICU after birth. The first days of hospitalization, in which the premature infant is submitted to invasive and painful procedures and exposed to an excess of light and sound stimuli, are the most critical. As the premature infant improves, these negative stimuli decrease and are replaced by a more appropriate environment, including increasing time with parents. Currently, more humanized strategies are employed, with the encouragement of the kangaroo method, skin-to-skin contact with the mother in the first hour of life when possible, greater inclusion of the family in care [49–51], precautions regarding noise and light, and measures that provide some comfort and better organization to the newborns [25].

However, the findings of our study contrast with the results obtained by Kantake *et al.*, who conducted the only study comparing exon 1_F methylation of *NR3C1* in preterm and full-term infants [31]. In that study, CpG sites 1–33 were analyzed only at birth and on the fourth day of life, and preterm infants had higher weight and gestational age than our patients. The authors observed higher methylation percentages than ours and those reported in similar studies [11,14,15,19,33,52,53]. At birth, Kantake *et al.* reported a higher methylation rate in preterm infants only at CpG 4, and a lower percentage in CpGs 1, 5 and 8 compared with full-term infants [31]. On the fourth day, preterm infants had a higher methylation rate at several sites, including 15, 16, 21, 25, 26, 27 and 28. Between birth and the fourth day of life, these authors found an increase in methylation percentage in 11 sites in preterm infants (CpG 1, 2, 8, 9, 10, 14, 16, 25, 26, 28 and 29) and stability in term newborns. In our study, changes in methylation over time showed a predominance of decrease versus increase in both cohorts. Differences in methylation course between the two cohorts were present in 13 of the 40 sites studied. There are no studies in the literature with a similar longitudinal analysis. Despite the differences in the population of preterm infants and the follow-up time between our study and that of Kantake *et al.* [31], the results of the two studies seem contradictory. It is possible that the simplified information of a single gene obtained through these studies has captured different moments of a highly dynamic process and does not reflect the complexity of the interactions between the different genes and transcription factors involved. According to studies in animals and humans, epigenetic processes can be dynamic, with more remarkable plasticity in the first years of life, a fundamental phase for the growth and development of the brain and other organs, and less intense, but also possible in more advanced stages of life, such as adolescence and adulthood [25,54,55].

Numerous transcription factors bind to sites included in our study, such as NGFI-A, AP1 and SP1 [56]. Differences in the methylation status of specific CpG sites interfere with transcription factor binding and gene expression. For example, CpG sites 16–21, 37 and 38 are canonical binding sites for NGFI-A, while CpG sites 12, 13 and 30–32 are noncanonical binding sites [8]. NGFI-A has essential regulatory functions, including the growth and differentiation of nerve cells in the central and peripheral nervous systems [57]. NGFI-A binding sites have been more widely studied since Weaver *et al.* demonstrated alterations in methylation in the equivalent promoter region in rodents, according to maternal behavior [20]. Human studies indicated an association between early stress in the perinatal period and childhood and increased *NR3C1* methylation at exon 1_F in CpG 37 [9,14,58]. Lester *et al.* observed increased methylation at this site in preterm infants at higher neurobehavioral risk [53]. Raffetti *et al.* reported an association between methylation at this site and drug and alcohol use in adolescents [59]. We observed an increase in methylation over time at some NGFI-A binding sites in full-term newborns, while in preterm infants, changes occurred in both directions, but decreases occurred in more NGFI-A binding sites than increases. Giarraputo *et al.* observed hypomethylation at site CpG 35 before hospital discharge (mean of 99 days) in more severe compared with less severe preterm infants [33]. We observed lower methylation percentages at sites 21 and 36 in preterm infants before hospital discharge compared with full-term infants. Compensatory epigenetic mechanisms may be triggered in premature newborns to increase the activity of the *NR3C1* gene in situations of great adversity, such as admission to the NICU.

Another unexpected result was related to cortisol levels. Several studies have reported low serum cortisol levels in the neonatal period due to relative adrenal insufficiency, mainly in premature and critically ill infants [27–30,60]. Grunau *et al.* observed lower production of cortisol in extremely preterm infants exposed to painful procedures during their NICU stay [60]. Our study observed higher cortisol levels in preterm infants on the fifth day of life

compared with full-term newborns. Some factors that denote greater severity, such as confirmed sepsis (19.6%), hyaline membrane disease (43.5%) and the need for mechanical ventilation (53.3%) in preterm infants included in our study, may be related to this exacerbated cortisol response after birth. Other factors, such as low Apgar score and vaginal delivery, should also be considered [28]. We did not observe differences in cortisol levels between preterm and full-term newborns on the 30th day of life and before hospital discharge. There was also no difference in the changes in cortisol levels between the two groups over time. However, premature newborns showed a decreasing trend of cortisol levels (though not significant) and decreasing mean percentage methylation over time. In contrast, term newborns showed increasing cortisol levels and mean methylation percentage over time. These findings support a relationship between cortisol and epigenetic changes in *NR3C1* in the perinatal period. They are consistent with the premise that methylation of *NR3C1* decreases gene expression and impairs the negative feedback loop's sensitivity, which further enhances cortisol levels. However, data relating corticosteroid levels to *NR3C1* gene methylation are inconsistent, showing both positive and negative associations [46]. Mediators other than cortisol may be involved in gene methylation changes in response to stress. Several neurochemical systems (e.g., protein complexes, activators and suppressors at the transcriptional level) are influenced by adverse experiences and interact, generating different outcomes [61].

Finally, in the present study, the percentage of methylation found at several sites was low and, in a significant number, was zero. The highest mean percentage in each site was around 4%, and considering all sites together, the mean percentage was below 1%. Would low methylation levels in peripheral tissues be enough to alter gene expression? Other studies that have evaluated perinatal and childhood adversity and methylation in the 1_F exon of *NR3C1* in different tissues and cell types found similar results in the cord blood of newborns [14,16], in buccal swabs of infants [33,53], in the peripheral blood of newborns and infants [32] and in the saliva of preschool children [11]. In a systematic review of the association between *NR3C1* gene methylation and perinatal stress experiences, Palma-Gudiel *et al.* reported less than 5% methylation in the included studies [46]. According to Leenen *et al.*, minor methylation variations in the *NR3C1* gene CpG sites result in the reorganization of transcription and production of protein isoforms in tissues, causing diseases such as Type 2 diabetes, depression, schizophrenia, arterial hypertension and cardiovascular diseases [62].

This study has strengths and limitations. It is the first study to perform a longitudinal analysis of methylation of the 1_F region of the *NR3C1* gene and cortisol levels in very low-birthweight infants and full-term infants on four different occasions in the first 3 months of life. Our aim was exclusively descriptive, because healthy full-term infants are not an ideal control group for very low-birthweight infants who remain in the NICU; full-term infants were included only as a reference for the expected methylation pattern in supposedly less stressful conditions. The only similar study (Kantake *et al.*) evaluated methylation in both cohorts at birth and on the fourth day of life [31]. The other few studies assessed the associations of clinical and demographic variables with the magnitude of *NR3C1* methylation only in preterm infants [32,33]. As a first limitation, a convenient sample was used based primarily on budget restrictions. Also, we did not find literature data on the expected difference in methylation rate between the study groups to calculate the ideal sample size. The only study comparing methylation rates between preterm and full-term newborns reported statistical significance but not the magnitude of the difference [31]. It is possible that due to insufficient sample size, significant differences at sites other than those described in this study may not have been detected. A second limitation was using different tissues (cord blood, peripheral blood and saliva) to analyze *NR3C1* gene methylation. However, although tissue methylation patterns are tissue-specific [63,64], there is a high degree of similarity between subjects [65], and intra-individual DNA methylation can be more variable than inter-individual DNA methylation [66]. Studies show that there is a correlation between CpG island methylation levels in cord blood [67], peripheral blood [68,69], buccal cells [64,70], saliva [71] and brain tissue. Given the impossibility of using brain tissue in clinical studies, peripheral tissues are used to assess epigenetic patterns in newborns, children and adults exposed to adversities. They are considered representative of the global methylation profile [64,67–70]. A third limitation of the study was the collection of a single blood or saliva sample for cortisol analysis at each time frame and the changes in the laboratory cortisol reference values. However, premature and term infants do not show the same patterns of the circadian cortisol cycle as are observed in adults [72]; the cycle is generally established around 2–4 months of age [73,74]. Even so, all the samples were collected at 8 a.m, and the variability in cortisol reference values due to blood or saliva collection was minimized using the z-score. A fourth limitation was the asynchrony between the Dd time point of the preterm group, which took place at an average of 69.5 days, and the D90 time point of the full-term group. While these time points may not be comparable, they show the direction of the methylation course over time in both groups. Finally, we did not control for several possible confounding

variables that could influence the *NR3C1* gene methylation course or the cortisol levels, and the results of this study should be interpreted with caution. The impact of demographic, clinical and social covariates on methylation and cortisol levels will be the subject of a later study.

Conclusion

This study showed that NR3C1 exon 1F hypomethylation was predominant in preterm newborns who remained in the NICU compared with non-hospitalized term infants in the same time window. Higher methylation levels at birth, associated with higher cortisol levels on the fifth day of life in preterm infants and with subsequent decline, suggest that the prenatal stress and unfavorable conditions of prematurity may impact the epigenome and that postnatal factors may modify these acquired epigenetic changes in a dynamic process. More studies on preterm infants are essential, because the perinatal period represents a critical phase for modulating brain architecture and functioning.

Future perspective

Many gaps remain to be elucidated in future research about the relationship between early stress and epigenetic changes. We are examining a single gene (*NR3C1*), but several other genes, such as *NFKBIA*, *FKBP5*, *BDNF*, *GILZ* and *SLC6A4*, are related to endocrine regulation (HPA axis and stress response) [3,44]. Some of these genes can influence each other, interacting in situations of adversity. Methylome-wide association studies examine thousands of genes but have reduced coverage for CpG sites in each gene and may not identify genes of interest [75,76]. The combination of methylome-wide studies and studies focused on a single gene may contribute to elucidating the complexity of epigenetic interactions. In addition, assessments of the association between methylation status and levels of mRNA and transcription factors are needed to provide more direct evidence on the role of epigenetic changes in gene expression [8], allowing us to make correlations between methylation patterns and phenotypic profiles [56].

Summary points

- This study is the first to describe the pattern of exon 1_F methylation of *NR3C1* and cortisol levels in the first 3 months of life in preterm newborns who remained in the neonatal intensive care unit compared with healthy full-term infants who were discharged from hospital.
- At birth, three sites were hypermethylated in preterm compared with term infants. However, hypomethylation predominated later.
- Preterm infants exhibited fewer sites with significant changes in methylation over time, but the predominant pattern in both cohorts was a decrease.
- Significant differences between groups in the changes in methylation over time were observed in one-third of the CpG sites.
- Preterm infants had significantly higher cortisol levels on the fifth day compared with full-term newborns, but cortisol levels in full-term infants increased over time.
- A higher *NR3C1* methylation percentage at birth and higher cortisol levels on day 5 in preterm compared with full-term infants, which disappeared over time, suggests that the stress of prematurity significantly impacts the epigenome, but postnatal factors may attenuate these epigenetic changes.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/epi-2022-0444

Author contributions

A Prata-Barbosa, A Ledo Alves da Cunha, M de Magalhães-Barbosa and G Chalfun conceived and designed the study. G Chalfun, M dos Santos Salú, M Barros Genuíno de Oliveira and J Rodrigues Robaina performed data collection and management. A de Araújo Brasil, S Coelho Soares-Lima, M de Souza Almeida Lopes, M dos Santos Salú, P Barbosa Eleutério dos Santos, A Pereira da Cunha Trompiere, L Travassos Vieira Milone, M Barros Genuíno de Oliveira and M Martins Reis performed the laboratory part of the study. G Rodrigues-Santos, F Lima-Setta, A Prata-Barbosa, M de Magalhães-Barbosa and V Barreto Paravidino performed the statistical analysis. G Chalfun, A de Araújo Brasil, A Prata-Barbosa and M de Magalhães-Barbosa drafted the manuscript, and all authors revised the manuscript critically and approved the final version.

Acknowledgments

The authors would like to thank the staff at the Obstetric Center and the Neonatal ICU at the UFRJ Maternity School for their assistance in collecting data for this research.

Financial & competing interests disclosure

Funding for the presented work was provided by the Department of Pediatrics of D'Or Institute for Research and Education (IDOR), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, www.idor.org

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate approval from the Research Ethics Committees of the Maternity School of the Federal University of Rio de Janeiro (no. 2,529,806) and the D'Or Institute for Research and Education (no. 2,432,638) and have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki. In addition, written informed consent has been obtained from the participants' parents or legal guardians.

Open access

This work is licensed under the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest

- 1. Derbyshire E, Obeid R. Choline, neurological development and brain function: a systematic review focusing on the first 1000 days. *Nutrients* 12(6), 1731 (2020).
- 2. Anacker C, O'Donnell KJ, Meaney MJ. Early life adversity and the epigenetic programming of hypothalamic–pituitary–adrenal function. *Dialogues Clin. Neurosci.* 16(3), 321–333 (2014).
- 3. Papadopoulou Z, Vlaikou A-M, Theodoridou D et al. Stressful newborn memories: pre-conceptual, *in utero*, and postnatal events. *Front. Psychiatry* 10, 220 (2019).
- 4. McEwen BS, Nasca C, Gray JD, Milliken M. Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 41(1), 3–23 (2016).
- 5. Agorastos A, Pervanidou P, Chrousos GP, Kolaitis G. Early life stress and trauma: developmental neuroendocrine aspects of prolonged stress system dysregulation. *Hormones* 17(4), 507–520 (2018).
- 6. Pervanidou P, Chrousos GP. Early-life stress: from neuroendocrine mechanisms to stress-related disorders. *Horm. Res. Paediatr.* 89(5), 372–379 (2018).
- 7. Liu PZ, Nusslock R. How stress gets under the skin: early life adversity and glucocorticoid receptor epigenetic regulation. *Curr. Genomics* 19(8), 653–664 (2018).
- 8. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat. Neurosci.* 12(3), 342–348 (2009).
- 9. Romens SE, McDonald J, Svaren J, Pollak SD. Associations between early life stress and gene methylation in children. *Child Dev.* 86(1), 303–309 (2015).
- 10. Van Der Knaap IJ, Ries H, Hudziak JJ et al. Glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) methylation following stressful events between birth and adolescence: the TRAILS study. *Transl. Psychiatry* 4(4), e381 (2014).
- 11. Tyrka AR, Parade S, Eslinger N et al. Methylation of exons 1D, 1F, and 1H of the glucocorticoid receptor gene promoter and exposure to adversity in pre-school aged children. *Dev. Psychopathol.* 27(2), 577–585 (2015).
- 12. Parent J, Parade SH, Laumann LE et al. Dynamic stress-related epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor gene promoter during early development: the role of child maltreatment. *Dev. Psychopathol.* 29(5), 1635–1648 (2017).
- 13. Cicchetti D, Handley E. Methylation of the glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) in maltreated and nonmaltreated children: associations with behavioral undercontrol, emotional lability/negativity, and externalizing and internalizing symptoms. *Dev. Psychopathol.* 29(5), 1795–1806 (2017).
- 14. Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics* 3(2), 97–106 (2008).
- 15. Braithwaite EC, Kundakovic M, Ramchandani PG, Murphy SE, Champagne FA. Maternal prenatal depressive symptoms predict infant *NR3C1* 1F and *BDNF* IV DNA methylation. *Epigenetics* 10(5), 408–417 (2015).
- 16. Hompes T, Izzi B, Gellens E et al. Investigating the influence of maternal cortisol and emotional state during pregnancy on the DNA methylation status of the glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) promoter region in cord blood. *J. Psychiatr. Res.* 47(7), 880–891 (2013).

- ▶ 17. Non AL, Binder AM, Kubzansky LD, Michels KB. Genome-wide DNA methylation in neonates exposed to maternal depression, anxiety, or SSRI medication during pregnancy. *Epigenetics* 9(7), 964–972 (2014).
- ▶ 18. Mulligan CJ, D'Errico NC, Stees J, Hughes DA. Methylation changes at *NR3C1* in newborns associate with maternal prenatal stress exposure and newborn birth weight. *Epigenetics* 7(8), 853–857 (2012).
- ▶ 19. Conradt E, Lester BM, Appleton AA, Armstrong DA, Marsit CJ. The roles of DNA methylation of *NR3C1* and *11β-HSD2* and exposure to maternal mood disorder in utero on newborn neurobehavior. *Epigenetics* 8(12), 1321–1329 (2013).
- ▶ 20. Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA *et al.* Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 7(8), 847–854 (2004).
- ▶ 21. Glass HC, Costarino AT, Stayer SA *et al.* Outcomes for extremely premature infants. *Anesth. Analg.* 120(6), 1337–1351 (2015).
- ▶ 22. Wadhwa PD, Entringer S, Buss C, Lu MC. The contribution of maternal stress to preterm birth: issues and considerations. *Clin. Perinatol.* 38(3), 351–384 (2011).
- ▶ 23. Provenzi L, Fumagalli M, Sirgiovanni I *et al.* Pain-related stress during the neonatal intensive care unit stay and *SLC6A4* methylation in very preterm infants. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 99 (2015).
- ▶ 24. Provenzi L, Montiroso R. 'Epigenetics' in the neonatal intensive care unit: conveying complexity in health care for preterm children. *JAMA Pediatr.* 169(7), 617–618 (2015).
- ▶ 25. Montiroso R, Provenzi L. Implications of epigenetics and stress regulation on research and developmental care of preterm infants. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.* 44(2), 174–182 (2015).
- ▶ 26. Ng PC. Effect of stress on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the fetus and newborn. *J. Pediatr.* 158(Suppl. 2), 41–43 (2011).
 - Focuses on cortisol levels in sick and healthy term and preterm infants in the neonatal period.
- ▶ 27. Fernandez E, Montman R, Watterberg K, Fernandez EF. ACTH and cortisol response to critical illness in term and late preterm newborns. *J. Perinatol.* 28(12), 797–802 (2008).
- ▶ 28. Ng PC. Is there a 'normal' range of serum cortisol concentration for preterm infants? *Pediatrics* 122(4), 873–875 (2008).
 - Focuses on cortisol levels in sick and healthy term and preterm infants in the neonatal period.
- ▶ 29. Tantivit P, Subramanian N, Garg M, Ramanathan R, DeLemos RA. Low serum cortisol in term newborns with refractory hypotension. *J. Perinatol.* 19(5), 352–357 (1999).
- ▶ 30. Fernandez EF, Watterberg KL. Relative adrenal insufficiency in the preterm and term infant. *J. Perinatol.* 29(S2), S44–S49 (2009).
- ▶ 31. Kantake M, Yoshitake H, Ishikawa H, Araki Y, Shimizu T. Postnatal epigenetic modification of glucocorticoid receptor gene in preterm infants: a prospective cohort study. *BMJ Open* 4(7), e005318 (2014).
 - Focuses on *NR3C1* gene methylation in preterm infants admitted to the neonatal intensive care unit.
- ▶ 32. Kantake M, Ohkawa N, Iwasaki T *et al.* Postnatal relative adrenal insufficiency results in methylation of the glucocorticoid receptor gene in preterm infants: a retrospective cohort study. *Clin. Epigenetics* 10(1), 66 (2018).
 - Focuses on *NR3C1* gene methylation in preterm infants admitted to the neonatal intensive care unit.
- ▶ 33. Giarraputo J, DeLoach J, Padbury J *et al.* Medical morbidities and DNA methylation of *NR3C1* in preterm infants. *Pediatr. Res.* 81(1), 68–74 (2017).
 - Focuses on *NR3C1* gene methylation in preterm infants admitted to the neonatal intensive care unit.
- ▶ 34. Villar J, Giuliani F, Fenton TR *et al.* INTERGROWTH-21st very preterm size at birth reference charts. *Lancet* 387, 844–845 (2016).
- ▶ 35. Villar J, Ismail LC, Victora CG *et al.* International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet* 384(9946), 857–868 (2014).
- ▶ 36. International Neonatal Network. The CRIB (clinical risk index for babies) score: a tool for assessing initial neonatal risk and comparing performance of neonatal intensive care units. *Lancet* 324(8865), 193–198 (1993).
- ▶ 37. Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK. SNAP-II and SNAPPE-II: simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J. Pediatr.* 138(1), 92–100 (2001).
- ▶ 38. Gray JE, Richardson DK, McCormick MC, Workman-Daniels K, Goldmann DA. Neonatal Therapeutic Intervention Scoring System: a therapy-based severity-of-illness index. *Pediatrics* 90(4), 561–567 (1992).
- ▶ 39. Panford-Walsh R, Doukhanine E, Bouevitch A. Comparison of DNA from samples collected using ORACollect®•DNA (OCR-100) vs. buccal swabs (2012). Available at: www.dnagenotek.com/ROW/pdf/PD-WP-00021.pdf (Accessed 28 November 2022).
- ▶ 40. Chalfun G, Reis M, de Oliveira M *et al.* Perinatal stress and methylation of the *NR3C1* gene in newborns: systematic review. *Epigenetics* 17(9), 1003–1019 (2022).
 - Focuses on the association between adversities in the perinatal period and DNA methylation in the *l_F* region of *NR3C1* in newborns.
- ▶ 41. Cruickshank MN, Oshlack A, Theda C *et al.* Analysis of epigenetic changes in survivors of preterm birth reveals the effect of gestational age and evidence for a long term legacy. *Genome Med.* 5(10), 96 (2013).
- ▶ 42. Provenzi L, Carli P De, Fumagalli M *et al.* Very preterm birth is associated with *PLAGL1* gene hypomethylation at birth and discharge. *Epigenomics* 10(8), 1121–1130 (2018).

- 43. Piyasena C, Cartier J, Provençal N et al. Dynamic changes in DNA methylation occur during the first year of life in preterm infants. *Front. Endocrinol.* 7, 158 (2016).
- 44. Casavant SG, Cong X, Moore J, Starkweather A. Associations between preterm infant stress, epigenetic alteration, telomere length and neurodevelopmental outcomes: a systematic review. *Early Hum. Dev.* 131, 63–74 (2019).
- 45. Daskalakis NP, Yehuda R. Site-specific methylation changes in the glucocorticoid receptor exon 1F promoter in relation to life adversity: systematic review of contributing factors. *Front. Neurosci.* 8, 369 (2014).
- 46. Palma-Gudiel H, Leza JC, Córdoba-Palomera A, Leza JC, Fafianás L. Glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: a critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 55, 520–535 (2015).
- 47. Turecki G, Meaney MJ. Effects of the social environment and stress on glucocorticoid receptor gene methylation: a systematic review. *Biol. Psychiatry* 79(2), 87–96 (2016).
- 48. Fumagalli M, Dessimone F, Sirgiovanni I et al. From early stress to 12-month development in very preterm infants: preliminary findings on epigenetic mechanisms and brain growth. *PLOS ONE* 13(1), e0190602 (2018).
- 49. Almgren M. Benefits of skin-to-skin contact during the neonatal period: governed by epigenetic mechanisms? *Genes Dis.* 5(1), 24–26 (2018).
- 50. Moore SR, McEwen LM, Quirt J et al. Epigenetic correlates of neonatal contact in humans. *Dev. Psychopathol.* 29(5), 1517–1538 (2017).
- 51. Hockdenbruch-Rother E, Vohlen C, Mehdiani N et al. Delivery room skin-to-skin contact in preterm infants affects long-term expression of stress response genes. *Psychoneuroendocrinology* 122, 104883 (2020).
- 52. Folger AT, Ding L, Ji H et al. Neonatal *NR3C1* methylation and social-emotional development at 6 and 18 months of age. *Front. Behav. Neurosci.* 13, 14 (2019).
- 53. Lester BM, Marsit CJ, Giarraputo J, Hawes K, Lagasse LL, Padbury JF. Neurobehavior related to epigenetic differences in preterm infants. *Epigenomics* 7(7), 1123–1136 (2015).
- 54. Gudsnuk K, Champagne FA. Epigenetic influence of stress and the social environment. *ILAR J.* 53(3–4), 279–288 (2012).
- 55. Meaney MJ, Szyf M. Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity. *Trends Neurosci.* 28(9), 456–463 (2005).
- 56. Turner JD, Alt SR, Cao L et al. Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochem. Pharmacol.* 80(12), 1860–1868 (2010).
- 57. Rocco ML, Soligo M, Manni L, Aloz L. Nerve growth factor: early studies and recent clinical trials. *Curr. Neuropharmacol.* 16, 1455–1465 (2018).
- 58. Tyrka AR, Price LH, Marsit C, Walters OC, Carpenter LL. Childhood adversity and epigenetic modulation of the leukocyte glucocorticoid receptor: preliminary findings in healthy adults. *PLOS ONE* 7(1), e30148 (2012).
- 59. Raffetti E, Mela PA, Landgren AJ et al. DNA methylation of the glucocorticoid receptor gene predicts substance use in adolescence: longitudinal data from over 1000 young individuals. *Transl. Psychiatry* 11(1), 477 (2021).
- 60. Grunau RE, Holsti I, Haley DW et al. Neonatal procedural pain exposure predicts lower cortisol and behavioral reactivity in preterm infants in the NICU. *Pain* 113(3), 292–300 (2005).
 - **Focuses on cortisol levels in sick and healthy term and preterm infants in the neonatal period.**
- 61. Strüber N, Strüber D, Roth G. Impact of early adversity on glucocorticoid regulation and later mental disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 38(1), 17–37 (2014).
- 62. Leenen FAD, Muller CP, Turner JD. DNA methylation: conducting the orchestra from exposure to phenotype? *Clin. Epigenetics* 8(1), 92 (2016).
- 63. Armstrong DA, Lesser C, Conradt E, Lester BM, Marsit CJ. Global and gene-specific DNA methylation across multiple tissues in early infancy: implications for children's health research. *FASEB J.* 28(5), 2088–2097 (2014).
- 64. Lin X, Teh AL, Chen L et al. Choice of surrogate tissue influences neonatal EWAS findings. *BMC Med.* 15(1), 211 (2017).
- 65. Braun PRPR, Han S, Hing B et al. Genome-wide DNA methylation comparison between live human brain and peripheral tissues within individuals. *Transl. Psychiatry* 9(1), 47 (2019).
- 66. Byun H-M, Siegmund KD, Pan F et al. Epigenetic profiling of somatic tissues from human autopsy specimens identifies tissue-and individual-specific DNA methylation patterns. *Hum. Mol. Genet.* 18(24), 4808–4817 (2009).
- 67. Nemoda Z, Massart R, Suderman M et al. Maternal depression is associated with DNA methylation changes in cord blood T lymphocytes and adult hippocampi. *Transl. Psychiatry* 5(4), e545 (2015).
- 68. Tylee DS, Kawaguchi DM, Glatt SJ. On the outside, looking in: a review and evaluation of the comparability of blood and brain '-omes'. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 162(7), 595–603 (2013).
- 69. Edgar RD, Jones MJ, Meaney MJ, Turecki G, Kobor MS. BECon: a tool for interpreting DNA methylation findings from blood in the context of brain. *Transl. Psychiatry* 7(8), e1187 (2017).
- 70. Lowe R, Gemma C, Beyan H et al. Buccals are likely to be a more informative surrogate tissue than blood for epigenome-wide association studies. *Epigenetics* 8(4), 445–454 (2013).

NR3C1 gene methylation & cortisol levels in preterm & healthy full-term infants in the first 3 months of life Research Article

- 71. Smith AK, Kilaru V, Klengel T *et al.* DNA extracted from saliva for methylation studies of psychiatric traits: evidence for tissue specificity and relatedness to brain. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 168B(1), 36–44 (2015).
- 72. Serón-Ferré M, Torres-Farfán C, Forcelledo ML, Valenzuela GJ. The development of circadian rhythms in the fetus and neonate. *Semin. Perinatol.* 25(6), 363–370 (2001).
- 73. Moreira AC, Antonini SR, De Castro M. A sense of time of the glucocorticoid circadian clock: from the ontogeny to the diagnosis of Cushing's syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 179(1), R1–R18 (2018).
- 74. Vermees I, Dohanić J, Toth G, Pongrácz J. Maturation of the circadian rhythm of the adrenocortical functions in human neonates and infants. *Horm. Res.* 12(5), 237–244 (1980).
- 75. Masser DR, Hadad N, Porter H *et al.* Analysis of DNA modifications in aging research. *Geroscience* 40, 11–29 (2018).
- 76. Marzese DM, Hoon DSB. Emerging technologies for studying DNA methylation for the molecular diagnosis of cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15(5), 647 (2015).

Anexo 2 Artigo aceito (20/08/2024) – Revista Qualis A2 – Fator de Impacto (2022) = 3,8

Epigenomics

ScholarOne Manuscripts <https://mc04.manuscriptcentral.com/fm-epi>

Home

Author

Review

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to

Epigenomics

Manuscript ID

EPI-2024-0172

Title

Impact of Prematurity on LINE-1 Promoter Methylation.

Authors

dos Santos, Paulo Victor

Brasil, Aline

Milone, Leo

Chalfun, Georgia

Saide, Stephanie

Salú, Margarida

de Oliveira, Mariana

Robaina, Jaqueline

Lima-Setta, Fernanda

Rodrigues-Santos, Gustavo

de Magalhães-Barbosa, Maria Clara

da Cunha, Antonio José

Prata-Barbosa, Arnaldo

Date Submitted

16-Jun-2024

© Clarivate | © ScholarOne, Inc., 2024. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655

1 **Impact of Prematurity on LINE-1 Promoter Methylation**

2

3 **ABSTRACT**

4 **Background:** Promoter methylation of LINE-1 may be affected by prematurity, but there is
5 little evidence in the literature.

6 **Materials & Methods:** Blood from premature and full-term neonates on days 0, 5, 30, and 90
7 was analyzed for DNA methylation percentage in a promoter region of the LINE-1, after
8 bisulfite conversion and pyrosequencing.

9 **Results:** Premature infants, as a whole, showed significantly lower methylation percentage at
10 birth, but this difference diminished over time. However, the subgroup of extremely premature
11 (<28 weeks gestational age) had higher methylation percentages, similar to full-term newborns.

12 **Conclusion:** This research underscores the critical role of prematurity on the methylation
13 pattern of LINE-1. These findings underline the complexity of epigenetic regulation in
14 prematurity and emphasize the need for further studies.

15

16

17 **PLAIN LANGUAGE SUMMARY**

18 Premature birth can have significant effects on a baby's development and long-term
19 health. This study investigates how being born prematurely affects a process called DNA
20 methylation, which can influence how genes are turned on or off. Specifically, we examined
21 the LINE-1 promoter, a frequently occurring region of DNA known for its role in regulating
22 gene activity.

23 We collected blood samples from both premature and full-term newborns at birth and
24 at several points in the early months of life. Our findings showed that premature babies have
25 lower levels of LINE-1 promoter methylation at birth compared to full-term babies. These
26 differences in methylation could possibly affect the babies' development and health as they
27 grow.

28 Our research highlights the need for continued study in this area to explore how these
29 epigenetic changes impact long-term health and to develop strategies to mitigate these effects.

30

31 **TWEETABLE ABSTRACT**

32 Premature neonates show lower LINE-1 methylation at birth, which increases to full-
33 term newborn levels over the first days of life. Our study highlights the impact of prematurity
34 on initial epigenetic configuration. #Prematurity #Epigenetics #DNAmethylation

35

36 **KEYWORDS**

37 LINE-1, Retroelements, DNA methylation, epigenetics, prematurity, newborn.

38

39 **INTRODUCTION**

40 Globally, one in every ten neonates is born prematurely (before 37 weeks of gestation)
41 [1]. This situation is alarming, with about 1 million premature infants dying annually due to
42 complications from early birth, making prematurity the leading cause of death among children
43 under five years old in the world [2]. Prematurity is categorized into three levels, depending on
44 gestational age: extremely premature (< 28 weeks of gestation), very premature (≥ 28 to < 32
45 weeks of gestation), and moderately premature (≥ 32 to < 37 weeks of gestation) [3,4].

46 Recent research has explored the connection between prematurity and epigenetics,
47 highlighting how epigenetic modifications can influence susceptibility to prematurity and
48 associated health outcomes [5,6]. The growing interest in epigenetic variations has led to
49 significant discoveries about their association with a wide range of diseases, including
50 autoimmunity, cancer, intellectual disabilities, endocrine, and neuropsychiatric disorders
51 [5,7,8]. These findings highlight the critical role of epigenetics in understanding the molecular
52 basis of various health conditions [9]. Concurrently, transposable elements (TEs), DNA
53 sequences capable of moving within the genome, have been the subject of intense research.
54 LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Elements) make up about 18% of the genomic DNA and
55 are autonomous retrotransposons [10,11], and consist of a promoter sequence, two ORFs, and
56 a poly-A tail [12,13]. This element plays a vital role in generating genetic material mosaicism
57 in neuronal cells and is associated with genomic instability and brain development [14].
58 Although most LINE-1 elements in the human genome are inactive, a small number are still
59 mobile and can cause significant genomic variations [12,14,15].

60 During embryonic development, active LINE-1 elements can be expressed in stem cells
61 and influence gene regulation and cellular diversity, playing a significant role in embryogenesis
62 [16]. They contribute to genetic diversification and adapt to the specific demands of different
63 developmental stages [17]. However, excessive or deregulated activity of LINE-1 can be
64 harmful, leading to mutations, disruptions in gene expression, and cellular dysfunction,
65 resulting in abnormalities in embryonic development and congenital disorders [14,18,19]. The

66 LINE-1 promoter is often used to assess the global methylation status of the genome [20,21].
67 Changes in the methylation of these repetitive elements can influence genomic stability and
68 gene expression, offering valuable insights into epigenetic alterations that affect the genome in
69 different contexts, such as embryonic development, aging, and diseases [22,23]. Intragenic
70 LINE-1 methylation plays an essential role in controlling gene expression during development
71 [16,17]. Although LINE-1 elements are abundant in the genome, the majority are 5' truncated
72 and do not contain a functional promoter region [24,25]. This study aims to specifically measure
73 the methylation in the promoter region of LINE-1, which actually represents only a fraction of
74 the LINE-1 loci in the genome.

75 Prematurity has been linked to various adverse health outcomes later in life, including
76 respiratory problems, neurodevelopmental disorders, and metabolic diseases [26]. Epigenetic
77 modifications, such as changes in DNA methylation, play a significant role in mediating these
78 long-term effects [5]. Investigating the methylation profile of the LINE-1 element in premature
79 infants is important for understanding the impact of epigenetic modifications on neonatal health
80 and development. Analyzing LINE-1 methylation aids in comprehending how exposure to
81 adverse conditions in premature birth influences infant epigenetics, potentially leading to
82 unfavorable health outcomes [11,27]. Factors such as maternal stress, inflammation, and
83 inadequate nutrition during pregnancy can affect fetal DNA methylation, with LINE-1, a
84 common repetitive element in the genome, being particularly sensitive to these epigenetic
85 changes [28]. Maternal nutrient deficiencies, particularly in methyl donors such as folic acid,
86 have been shown to significantly influence the epigenetic landscape of the developing fetus
87 [29]. Adequate levels of folic acid during pregnancy are crucial for proper DNA methylation
88 processes, including those involving LINE-1 elements [30]. Deficiency in these nutrients can
89 lead to hypomethylation, which is associated with various adverse developmental outcomes,
90 including increased susceptibility to prematurity and its related complications [31,32].

91 The primary aim of this study is to describe the methylation percentage pattern of the
92 LINE-1 promoter in full-term and preterm neonates at different time points following birth.
93

94 MATERIALS & METHODS

95

96 Study design, study population and ethics

97 This is an observational, longitudinal, and prospective study involving 46 preterm (less
98 than 32 weeks gestational age, $\leq 1,500$ g, and appropriate for gestation age) and 49 full-term
99 newborns from a cohort born between April 2018 and May 2019, previously described [33].

100 The group of premature infants was subdivided into two subgroups, according to the World
101 Health Organization classification (<https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/preterm-birth>): (1) very preterm (28 to less than 32 weeks gestational age) and (2)
102 extremely preterm (less than 28 weeks). Gestational age was primarily determined by first-
103 trimester ultrasound or, in cases where this was unavailable, by the estimate provided by the
104 last menstrual period and by the Capurro or Ballard clinical assessment methods [34,35].
105 Newborns with major congenital malformations, clinical suspicion or laboratory confirmation
106 of genetic syndromes were excluded. Data from patients who died were considered up to the
107 point of their participation. The study was approved by the Research Ethics Committees of the
108 institutions involved, and all parents or legal guardians consented to their children's
109 participation through the signature of written informed consent. All data have been anonymized.
110

111

112 **Biospecimen Collection**

113 Blood samples, totaling 1 to 2 ml from the umbilical cord at birth or 0.5 ml from
114 peripheral veins on the fifth day post-birth, at one month of age, and upon hospital discharge,
115 were collected in tubes containing potassium EDTA as an anticoagulant. After collection, the
116 material was stored in refrigerators at 4-8°C for up to 48 hours. Then, the tubes were transported
117 in thermal boxes, maintaining a temperature range of 2-8°C, to the epigenetic laboratory, where
118 blood from each tube was divided into 0.5 ml aliquots, promptly identified, and stored in an
119 ultra-freezer at -80°C until further processing stages.

120

121 **Global (LINE-1) DNA methylation analysis**

122 The DNA was extracted from blood mononuclear cells employing the *DNeasy Blood &*
123 *Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Germany). Subsequently, the quantity and purity of the DNA were
124 assessed using a *NanoDrop™ spectrophotometer 2000c* (ThermoFisher Scientific, MA, USA).
125 Following this, 1000 ng of DNA underwent bisulfite conversion utilizing the *EZ-96 DNA*
126 *Methylation Kit* (Zymo Research, CA, USA). Per the manufacturer's protocol, the converted
127 DNA was eluted with 24 µl of the M-elution buffer. Next, 2 µl of bisulfite-converted DNA was
128 amplified via PCR using the *PyroMark PCR kit* (Qiagen) in a total volume of 50 µl, including
129 0.2 µM of primers and PyroMark PCR Master Mix. Confirmation of DNA amplification was
130 achieved through 3% agarose gel electrophoresis. Biotinylated PCR products in a total volume
131 of 10 µl were immobilized on 3 µl of magnetic streptavidin-coated Sepharose beads (PyroMark
132 Q48 Magnetic Beads). Subsequently, pyrosequencing was performed using PyroMark Q48
133 Advanced CpG reagents on the PyroMark Q48 Autoprep system (both from Qiagen). The

134 methylation percentage of each CpG site was automatically generated utilizing the PyroMark
135 Q48 Autoprep Software (v. 2.4.2) with standard quality control settings. The design of PCR
136 and pyrosequencing primers was carried out using PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen).

137

138 Selection of the Target Region

139 The four CpG sites examined (CpGs 21, 22, 23, and 24) were investigated using the
140 revised genomic consensus for the CpG island region in the LINE-1 promoter in humans (L1-
141 HS) [36]. The primers design was performed to ensure that the amplified region would be
142 compatible with the parameters of the PyroMark Q48 Autoprep from Qiagen (Hilden,
143 Germany), spanning from nucleotide 222 to 360, corresponding to the accession code X58075.1
144 in the NCBI GenBank (Table 1).

145

146 Statistical Analysis

147 The data related to the studied samples were cataloged and organized in .csv format, and
148 all statistical procedures were conducted using the Python 3.7 programming language (Python
149 Software Foundation, Wilmington, Delaware, USA) in a Jupyter Notebook environment. The
150 primary libraries utilized included Pandas, Numpy, Scipy, and Seaborn. In the descriptive
151 analysis of the epidemiological and clinical characteristics of the pregnant women and the term
152 and preterm newborns, the Mann-Whitney U test was applied for numerical variables and the
153 chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables. For the descriptive analysis of
154 methylation percentage, continuous variables were presented as median and interquartile ranges
155 of 25% and 75% or mean and standard deviation, depending on the data distribution. Median
156 comparisons between groups were conducted using the Mann-Whitney test. The results of
157 global methylation were visualized in box plot and violin plot graphs. The temporal evolution
158 of methylation at each CpG site was determined by the average methylation for each group,
159 with the data plotted in point graphs and a trend line obtained through linear regression,
160 including R², slope, and P-value estimates. A significance level of 0.05 was established for all
161 analyses.

162

163 RESULTS

164

165 Epidemiological and clinical characteristics of the study population

166 The main epidemiological and clinical characteristics of the study population are
167 presented in Table 2. The families of premature newborns had lower family income (p= 0.023),

168 but the other socio-economic and demographic variables were similar between preterm and
169 term groups. Regarding gestational health, except for the number of prenatal consultations,
170 which was proportionally greater the higher the gestational age, the other variables were similar
171 between the groups. Regarding birth-related and anthropometric variables, the significant
172 differences found are explained by gestational age, and the distribution by sex had a similar
173 proportion between the two groups.

174

175 **Methylation percentage at different time points**

176 The methylation levels are presented in Table 3, where the medians of methylation at
177 each site (site-specific methylation) and the global methylation at the four sites studied (CpG 1
178 to 4) are observed. At birth (D0), significantly higher percentages of methylation were observed
179 in the group of full-term newborns, both site-specific and global. On the fifth day of life (D5),
180 the differences in the percentage of methylation between the groups decrease, remaining
181 significantly higher in the full-term newborn group only at sites 2 and 4. The difference in
182 global methylation did not reach statistical significance but resulted in a marginal p-value of
183 0.053. Figure 1 graphically illustrates the distribution of the global percentage of LINE-1
184 methylation in the full-term and preterm neonates group at birth (D0) and on the fifth day of
185 life (D5), using violin plot box diagrams. Table 4 provides a detailed overview of LINE-1
186 methylation levels in full-term newborns (only D0 and D5) and in preterm neonates, stratified
187 into the two studied groups according to gestational age: extremely preterm (less than 28 weeks)
188 and very preterm (28 to less than 32 weeks). Statistically significant differences observed on
189 D0 and D5 between the full-term and very preterm groups are represented in Figure 2 and
190 described more comprehensively in the following paragraphs. In Figure 2 (panels A and B),
191 comparisons are shown between the percentage of global LINE-1 methylation at D0 and D5
192 among full-term and preterm infants, now stratified according to gestational age into very
193 preterm and extremely preterm. In panel A, a significant difference in LINE-1 methylation is
194 observed between full-term neonates (70.92%) and very preterm ones (67.21%), indicating a
195 strong association between prematurity and a lower methylation percentage. However,
196 comparing very preterm and extremely preterm infants showed no statistically significant
197 difference. Extremely preterm infants had a median of 70.58% methylation, closer to full-term
198 newborns than to very preterm ones, although this difference to full-term neonates was not
199 statistically significant ($p=0.376$). In panel B, it is observed that on D5, the difference in global
200 methylation percentage between full-term infants and very preterm infants is still statistically
201 significant ($p=0.021$), a significance not found when full-term infants were compared to the

202 whole group of preterm infants ($p=0.053$, Table 3 and Figure 1). However, the difference
203 between very preterm infants and extremely preterm infants was not significant ($p=0.112$), as
204 well as between full-term infants and extremely preterm infants ($p=0.81$). In panels C and D
205 (Figure 2), comparisons are shown only between the strata of very preterm and extremely
206 preterm infants, at D30 and D90, respectively. There were no statistically significant differences
207 in the global methylation percentage between these groups ($p=0.164$ on D30 and $p=0.052$ on
208 D90), although the p-value on D90 approached statistical significance.

209

210 **Temporal evolution of DNA methylation in preterm neonates**

211 The temporal evolution of methylation in preterm infants at the four specific CpG sites
212 of the LINE-1 element (CpG1, CpG2, CpG3, and CpG4), from birth (D0) to the ninetieth day
213 of life (D90), is shown in Figure 3. Although a positive slope ($r = 0.50$ to 0.75) is observed at
214 all four sites, this increasing trend was not statistically significant. Similarly, Figure 4 displays
215 the temporal evolution of global LINE-1 methylation at the four CpG sites from birth to 90 days
216 of life. A positive slope is observed, but the upward trend is not statistically significant
217 (stationary).

218

219 **DISCUSSION**

220

221 This study revealed significantly reduced LINE-1 methylation levels in preterm
222 neonates at birth compared to full-term newborns and that this pattern persists, at least at CpG
223 sites 2 and 4, on the fifth day of life. We further demonstrated that this difference also occurs
224 when comparing the overall methylation percentage between full-term newborns and the
225 subgroup of very preterm neonates across the four studied sites. However, there appears to be
226 a trend toward stabilization of LINE-1 methylation levels in the group of preterm newborns
227 over the first 90 days of life, reaching values similar to those found in full-term newborns at
228 birth, since the fifth day onwards.

229 Although the aim of this study was not to describe the risk factors for prematurity, these
230 factors may be associated with epigenetic alterations, including those of the LINE-1 element.
231 We found lower family income in the preterm group, which is related to various conditions that
232 can negatively influence LINE-1 methylation, such as exposure to air pollution, metals
233 poisoning, inadequate diet, obesity, chronic stress, and smoking [37–40]. Conversely, a diet
234 rich in vegetables and isoflavones, zinc supplementation, and physical exercise can positively
235 influence this methylation [30,41–43]. Folic acid, especially when supplemented during

236 pregnancy, not only prevents the invasive behavior of the trophoblast and the risk of pre-
237 eclampsia but also has a positive effect on LINE-1 methylation [44].

238 Essentially, this study suggests a direct influence of prematurity on the initial epigenetic
239 configuration by revealing variations in the methylation of specific CpG sites of LINE-1,
240 particularly lower in preterm infants at birth. However, the observed differences seem to
241 attenuate in the first days of life, indicating a process of normalization in the epigenetic profile
242 of preterm infants after birth, which may have implications for understanding neonatal
243 development in this group of patients. Furthermore, although there is a positive inclination in
244 the percentage of LINE-1 methylation over time, this progression has not proven to be a
245 statistically significant trend (stationary), which stabilized at proportions comparable to the
246 values found in the full-term neonate group from birth to the fifth day of life. This pattern
247 suggests ongoing adaptive or recovery processes and a possible progressive refinement of the
248 epigenome (maturation) in the first months of life, regardless of prematurity. The higher the
249 global levels of methylation (LINE-1), the greater the capacity to maintain the structure and
250 sequence of the genetic material over time without undesirable changes or significant mutations
251 (genomic integrity) [45]. Therefore, the dynamic nature of this methylation could reflect
252 postnatal adaptations and development for both term and preterm newborns, with possible
253 implications for both genomic stability and gene expression. The analysis of these data opens a
254 field for discussion, regarding its biological implications and the intersections between birth
255 conditions, socioeconomic context, and neonatal health.

256 An intriguing finding of our study was the high percentage of methylation in the
257 subgroup of extremely premature newborns. Considering the greater prematurity, the expected
258 result would be the opposite: a lower proportion of methylation in this group and a greater
259 difference, especially concerning full-term newborns, but also regarding premature neonates of
260 greater gestational age. However, what was observed was a percentage of methylation close to
261 that of full-term newborns and higher than that observed in the group of very premature infants.
262 Recent studies have highlighted that LINE-1 activation after fertilization is crucial for global
263 chromatin accessibility in the early embryo, particularly at the 8-cell stage. Inadequate LINE-1
264 activation can result in preimplantation development defects and spontaneous abortion
265 [16,19,46]. Thus, a high percentage of methylation in the LINE-1 promoter (indicating lower
266 activity) may have contributed to extremely premature birth. In addition, some stressful factors
267 associated with extremely premature birth may have influenced the LINE-1 methylation status,
268 including epigenetic interactions with other genes, or simply the small number of patients in

269 this subgroup may have affected the statistical results. In any case, future studies will be able
270 to investigate this aspect better.

271 Prematurity's complexity and impact on neonatal development are vital topics in
272 neonatal and pediatric research. A recent study conducted by Fontana et al. (2021) sheds light
273 on the intersection between prematurity, DNA methylation in the LINE-1 element, and the
274 neurocognitive development of neonates [47]. The authors found that the LINE-1 promoter was
275 hypomethylated in preterm neonates at birth, but this methylation was restored due to early
276 special maternal care, which may demonstrate the neonatal epigenome's sensitivity to
277 environmental factors, especially in premature infants. Furthermore, the group randomized to
278 enhanced maternal care showed higher developmental scores at 12 and 36 months of life than
279 the standard care group. This suggests not only that early special maternal care may restore
280 LINE-1 methylation levels in preterm infants but also that this is associated with better
281 outcomes in children's neurocognitive development. Although we studied different subtypes of
282 LINE-1 and the premature infant group received only standard care, we observed restoration of
283 LINE-1 methylation (values similar to those of full-term newborns at birth) as early as the fifth
284 day of life, which remained stable (stationary trend) until 90 days. Not disregarding the possible
285 benefit of special care for the newborn and its positive influence on neurodevelopment, our
286 findings make it possible to wonder whether the restoration of the LINE-1 methylation pattern
287 would occur as a natural adaptation process in premature newborns.

288 In our opinion, some points can be highlighted in our findings: (i) methylation was
289 investigated at several time intervals (D0, D5, D30, and D90), which allows a more
290 comprehensive view of the evolution of LINE-1 methylation status in the neonatal period and
291 first months of life in premature infants; (ii) the sample size is larger than previously studied;
292 and (iii) the pyrosequencing technique used (Pyromark Q48 Autoprep) is more modern than the
293 Sanger method, providing greater precision and sensitivity. Unfortunately, due to differences
294 in the techniques used and the CpGs analyzed (originating from different consortia: X58075.1
295 and L19092.1), the methylation values identified by our study cannot be directly compared to
296 those in the study of Fontana et al. However, both studies converge to highlight prematurity as
297 a significant factor that affects (reduces) DNA methylation in the LINE-1 element, which may
298 have implications for the neurocognitive development of these patients.

299 The relationship between LINE-1 methylation and neurological and psychiatric
300 outcomes is an emerging topic in neuroscience and psychiatric research. The findings of this
301 research regarding low global methylation (LINE-1) in preterm neonates, at least at birth and
302 in the early days of life, gain greater significance when considering recent studies that associate

303 alterations in LINE-1 methylation with psychiatric diseases, including autism spectrum disorder
304 (ASD), post-traumatic stress disorder, and panic disorders [48,49]. These associations
305 underscore the importance of studying the methylation state of LINE-1 as a potential biomarker
306 and influencing factor in the development of psychiatric conditions, especially in the preterm
307 newborn population. Furthermore, some studies suggest that methylation status of repetitive
308 elements like Alu and LINE-1 in humans is considered a surrogate for global DNA methylation
309 [20]. Applying these findings to the context of child neurodevelopment raises concerns that low
310 LINE-1 methylation in preterm newborns, by implicating global methylation, may also affect
311 the expression of genes essential for neurodevelopment.

312 This study presents some strengths and limitations. The main strength lies in the
313 originality of investigating global methylation (LINE-1) using an advanced genetic sequencing
314 technique in human samples of term and, notably, preterm newborns. Among the limitations,
315 we highlight i) the convenience sample and the small sample size, determined by logistical and
316 budgetary issues. Assessing the exact statistical power became unfeasible due to the lack of
317 preliminary studies that could support an accurate calculation of the sample size; ii) the absence
318 of data on the percentage of methylation for full-term newborns at D30 and D90, as these
319 samples were fully used in a previous study conducted with the same cohort [33], which made
320 comparative analysis at these time points impossible; iii) the lack of evaluation of potential
321 transgenerational inheritance in LINE-1 methylation; and iv) LINE-1 methylation serves only
322 as a marker of global DNA methylation. Consequently, establishing its relationship with
323 specific gene expression is challenging. Thus, further research in this area may show that
324 changes in LINE-1 methylation can reflect broader shifts in the epigenetic landscape, which
325 may influence gene expression, neurological development, and other areas of human health.
326 Therefore, studying LINE-1 methylation in preterm neonates and following these cohorts can
327 provide valuable insights into brain development risks, mental health, and overall health later
328 in life.

329

330 CONCLUSIONS

331

332 This study demonstrated that preterm newborns exhibit lower methylation percentages
333 in the promoter region of the transposable element LINE-1 compared to full-term newborns at
334 birth and in the first days of life, reflecting the influence of prematurity on the initial epigenetic
335 configuration. However, there appears to be a trend toward stabilizing this percentage over the
336 first 90 days of life in the preterm group, suggesting a possible dynamic process of epigenetic

337 maturation that could be related to adaptations to the postnatal environment. These findings
338 underline the complexity of epigenetic regulation in response to prematurity and emphasize the
339 need for further studies that can link the epigenome to child development.

340

341 ARTICLE HIGHLIGHTS

- 342 • Premature infants exhibit significantly lower levels of LINE-1 promoter methylation at
343 birth compared to full-term infants.
- 344 • The subgroup of extremely premature newborns showed higher percentages of LINE-1
345 methylation than expected, greater than the very premature subgroup and not
346 significantly different from full-term newborns.
- 347 • These epigenetic differences suggest that prematurity affects the initial epigenetic
348 configuration of newborns.
- 349 • The study analyzed blood samples from both premature and full-term newborns
350 collected at birth and at various time points in early life (D5, D30, and D90).
- 351 • DNA methylation patterns were assessed using sodium bisulfite conversion and
352 pyrosequencing techniques.
- 353 • The study contributes to the growing body of knowledge on the epigenetic mechanisms
354 underlying neonatal health challenges.

355

356 FIGURE CAPTIONS

357 **Figure 1.** Distribution of global methylation percentage in full-term and preterm newborns. At
358 birth (A), significantly higher methylation percentages were observed in the full-term newborn
359 group. This percentage was still higher on the fifth day of life (B), but the difference between
360 the groups did not show statistical significance, although with a marginal p-value.

361 **Figure 2.** Distribution of global methylation percentage in term newborns, very preterm (28 to
362 less than 32 weeks gestational age), and extremely preterm infants (less than 28 weeks
363 gestational age) at birth (A), on the fifth day of life (B), on the thirtieth day of life (C), and the
364 ninetieth day of life (D). In panel A, a significant difference in methylation is observed between
365 full-term and very preterm neonates, which is not observed between very preterm and extremely
366 preterm. Extremely preterm infants had a methylation percentage closer to full-term newborns
367 than to very preterm ones (not statistically significant). In panel B, the difference in global
368 methylation between full-term and very preterm infants is still statistically significant, although
369 not significant between very preterm and extremely preterm infants, as well as between full-
370 term infants and extremely preterm infants. In panels C and D, there were no differences in the

371 global methylation percentage between the subgroups of preterm infants, although the p-value
 372 on D90 (D) approached statistical significance.

373

374 **Figure 3.** Temporal evolution of site-specific methylation in preterm newborns at CpG sites 1
 375 (A), CpG 2 (B), CpG 3 (C), and CpG 4 (D) of the transposable element LINE-1 at time points
 376 D0, D5, D30, and D90, showing positive slopes but not significant trends.

377 **Figure 4.** Temporal evolution of global methylation in LINE-1 CpG sites in preterm newborns
 378 at D0, D5, D30, and D90 shows a positive slope but not a significant trend.

379

380 TABLE CAPTIONS

381 **Table 1.** Primers design covering nucleotides 222 to 360, corresponding to the accession code
 382 X58075.1 in the NCBI GenBank. CpG sites of interest numbered and highlighted in bold.

383 **Table 2.** Epidemiological and clinical characteristics of pregnant women, preterm, and term
 384 newborns.

385 **Table 3.** Comparison of median methylation percentages between term and preterm infants at
 386 different time points.

387 **Table 4.** Comparison of global LINE-1 methylation percentage among full-term, very preterm^a,
 388 and extremely preterm infants^b.

389

390 REFERENCES

- 391 [1] Ohuma E, Moller A-B, Bradley E. National, regional, and worldwide estimates of
 392 preterm birth in 2020, with trends from 2010: a systematic analysis. Lancet. 2023;In Press.
- 393 [2] United Nations Inter-Agency Group for Child Mortality Estimation (UN IGME).
 394 Levels & trends in child mortality: Report 2022. 2023;
- 395 [3] Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, et al. National, regional, and worldwide
 396 estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected
 397 countries: a systematic analysis and implications. The Lancet. 2012;379:2162–2172.
- 398 [4] Departamento Científico de Neonatología. SOCIEDADE BRASILEIRA DE
 399 PEDIATRIA [Internet]. 2019 [cited 2024 Mar 27]. Available from:
 400 [https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/DocCient-Neonatol-
 401 SBP_Prematuridade_18112019_1_.pdf](https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/DocCient-Neonatol-SBP_Prematuridade_18112019_1_.pdf).
- 402 [5] Jain VG, Monangi N, Zhang G, et al. Genetics, epigenetics, and transcriptomics of
 403 preterm birth. Am J Reprod Immunol. 2022;88:e13600.
- 404 [6] Morley R, Saffery R, Hacking DF, et al. Epigenetics and Neonatology. Neoreviews.
 405 2009;10:e387–e395.
- 406 [7] Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for
 407 epigenetic therapy. Nature. 2004;429:457–463.
- 408 [8] Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime
 409 of monozygotic twins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:10604–10609.

- 410 [9] Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, et al. Changes in the pattern of DNA
411 methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res.*
412 2010;20:170–179.
- 413 [10] Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, et al. A unified classification system for eukaryotic
414 transposable elements. *Nat Rev Genet.* 2007;8:973–982.
- 415 [11] Kines KJ, Belancio VP. Expressing genes do not forget their LINEs: transposable
416 elements and gene expression. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17:1329–1344.
- 417 [12] Martin SL. Nucleic acid chaperone properties of ORF1p from the non-LTR
418 retrotransposon, LINE-1. *RNA Biol.* 2010;7:706–711.
- 419 [13] Stenz L. The L1-dependant and Pol III transcribed Alu retrotransposon, from its
420 discovery to innate immunity. *Mol Biol Rep.* 2021;48:2775–2789.
- 421 [14] Misiak B, Ricceri L, Sąsiadek MM. Transposable Elements and Their Epigenetic
422 Regulation in Mental Disorders: Current Evidence in the Field. *Front Genet.* 2019;10:580.
- 423 [15] Gilbert N, Doucet AJ, Bucheton A. [Genomic instability associated with human LINE-
424 1 rétrotransposition]. *J Soc Biol.* 2004;198:419–424.
- 425 [16] Kohlrausch FB, Berteli TS, Wang F, et al. Control of LINE-1 Expression Maintains
426 Genome Integrity in Germline and Early Embryo Development. *Reprod Sci.* 2022;29:328–
427 340.
- 428 [17] Ramos KS, Bojang P, Bowers E. Role of long interspersed nuclear element-1 in the
429 regulation of chromatin landscapes and genome dynamics. *Exp Biol Med (Maywood).*
430 2021;246:2082–2097.
- 431 [18] Hancks DC, Kazazian HH. Roles for retrotransposon insertions in human disease.
432 *Mob DNA.* 2016;7:9.
- 433 [19] Lou C, Goodier JL, Qiang R. A potential new mechanism for pregnancy loss:
434 considering the role of LINE-1 retrotransposons in early spontaneous miscarriage.
435 *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2020;18:6.
- 436 [20] Yang AS, Estécio MRH, Doshi K, et al. A simple method for estimating global DNA
437 methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.*
438 2004;32:e38.
- 439 [21] Li S, Tollefson TO. DNA methylation methods: Global DNA methylation and
440 methylomic analyses. *Methods.* 2021;187:28–43.
- 441 [22] Bogdanović O, Gómez-Skarmeta JL. Embryonic DNA methylation: insights from the
442 genomics era. *Brief Funct Genomics.* 2014;13:121–130.
- 443 [23] Jiang S, Guo Y. Epigenetic Clock: DNA Methylation in Aging. *Stem Cells Int.*
444 2020;2020:1047896.
- 445 [24] Ostertag EM, Kazazian HH. Twin priming: a proposed mechanism for the creation of
446 inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res.* 2001;11:2059–2065.
- 447 [25] Kazazian HH. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science.*
448 2004;303:1626–1632.
- 449 [26] Pravia CI, Benny M. Long-term consequences of prematurity. *Cleve Clin J Med.*
450 2020;87:759–767.
- 451 [27] Martin SL. LINEs. *Curr Opin Genet Dev.* 1991;1:505–508.
- 452 [28] Hübel C, Marzi SJ, Breen G, et al. Epigenetics in eating disorders: a systematic
453 review. *Mol Psychiatry.* 2019;24:901–915.
- 454 [29] Misan N, Paczkowska K, Szmyt M, et al. Nutritional behavior in pregnancy. *Ginekol
455 Pol.* 2019;90:527–533.
- 456 [30] Zhang X, Zhang R, Yu J. New Understanding of the Relevant Role of LINE-1
457 Retrotransposition in Human Disease and Immune Modulation. *Front Cell Dev Biol.*
458 2020;8:657.

- 459 [31] Mahmoud AM, Ali MM. Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation
460 and Cancer Outcome. *Nutrients*. 2019;11.
- 461 [32] Maugeri A, Barchitta M. How Dietary Factors Affect DNA Methylation: Lesson from
462 Epidemiological Studies. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56.
- 463 [33] Chalfun G, Araújo Brasil A de, Paravidino VB, et al. NR3C1 gene methylation and
464 cortisol levels in preterm and healthy full-term infants in the first 3 months of life.
465 *Epigenomics*. 2022;14:1545–1561.
- 466 [34] Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, et al. New Ballard Score, expanded to include
467 extremely premature infants. *J Pediatr*. 1991;119:417–423.
- 468 [35] Capurro H, Konichezky S, Fonseca D, et al. A simplified method for diagnosis of
469 gestational age in the newborn infant. *J Pediatr*. 1978;93:120–122.
- 470 [36] Crowther PJ, Doherty JP, Linsenmeyer ME, et al. Revised genomic consensus for the
471 hypermethylated CpG island region of the human L1 transposon and integration sites of full
472 length L1 elements from recombinant clones made using methylation-tolerant host strains.
473 *Nucleic Acids Res [Internet]*. 1991;19:2395–2401. Available from:
474 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710354>.
- 475 [37] Bandyopadhyay AK, Paul S, Adak S, et al. Reduced LINE-1 methylation is associated
476 with arsenic-induced genotoxic stress in children. *BioMetals*. 2016;29:731–741.
- 477 [38] Ding R, Jin Y, Liu X, et al. Characteristics of DNA methylation changes induced by
478 traffic-related air pollution. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016;796:46–53.
- 479
- 480 [39] Khan MFJ, Little J, Mossey PA, et al. MTHFR promoter methylation might mitigate
481 the effect of smoking at the level of LINE-1 in cleft lip tissues: A preliminary study. *Birth*
482 *Defects Res*. 2021;113:1463–1469.
- 483 [40] Maugeri A. The Effects of Dietary Interventions on DNA Methylation: Implications
484 for Obesity Management. *Int J Mol Sci*. 2020;21:8670.
- 485 [41] Azimi Z, Isa MR, Khan J, et al. Association of zinc level with DNA methylation and
486 its consequences: A systematic review. *Heliyon*. 2022;8:e10815.
- 487 [42] Barchitta M, Maugeri A, Magnano San Lio R, et al. Dietary Patterns are Associated
488 with Leukocyte LINE-1 Methylation in Women: A Cross-Sectional Study in Southern Italy.
489 *Nutrients*. 2019;11:1843.
- 490 [43] Świątowy WJ, Drzewiecka H, Kliber M, et al. Physical Activity and DNA
491 Methylation in Humans. *Int J Mol Sci*. 2021;22.
- 492 [44] Rahat B, Hamid A, Bagga R, et al. Folic Acid Levels During Pregnancy Regulate
493 Trophoblast Invasive Behavior and the Possible Development of Preeclampsia. *Front Nutr*.
494 2022;9:847136.
- 495 [45] Jönsson ME, Ludvik Brattås P, Gustafsson C, et al. Activation of neuronal genes via
496 LINE-1 elements upon global DNA demethylation in human neural progenitors. *Nat*
497 *Commun*. 2019;10:3182.
- 498 [46] Jachowicz JW, Bing X, Pontabry J, et al. LINE-1 activation after fertilization regulates
499 global chromatin accessibility in the early mouse embryo. *Nat Genet*. 2017;49:1502–1510.
- 500 [47] Fontana C, Marasca F, Provitera L, et al. Early maternal care restores LINE-1
501 methylation and enhances neurodevelopment in preterm infants. *BMC Med*. 2021;19:42.
- 502 [48] Alves VRG, Micali D, Ota VK, et al. A Systematic Review of LINE-1 Methylation
503 Profile in Psychiatric Disorders. *Complex Psychiatry*. 2023;9:119–129.
- 504 [49] Saeliw T, Permpoon T, Iadsee N, et al. LINE-1 and Alu methylation signatures in
505 autism spectrum disorder and their associations with the expression of autism-related genes.
506 *Sci Rep*. 2022;12:13970.
- 507

508 REFERENCES ANNOTATIONS

509 ** Ref 47 (Fontana, C.; Marasca, F.; Provitera, L.; Mancinelli, S.; Pesenti, N.; Sinha, S.;
 510 Passera, S.; Abrignani, S.; Mosca, F.; Lodato, S.; et al. Early Maternal Care Restores LINE-1
 511 Methylation and Enhances Neurodevelopment in Preterm Infants. *BMC Med*, **2021**, *19* (1), 42.
 512 <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01896-0>)

513 Reason: This study demonstrates the impact of early maternal care on restoring LINE-
 514 1 methylation and enhancing neurodevelopment in preterm infants, aligning closely with the
 515 main focus of your research on LINE-1 methylation and prematurity.

516 ** Ref 7 (Egger, G.; Liang, G.; Aparicio, A.; Jones, P. A. Epigenetics in Human Disease and
 517 Prospects for Epigenetic Therapy. *Nature*, 2004, *429* (6990), 457–463.
 518 <https://doi.org/10.1038/nature02625>)

519 Reason: This landmark paper provides foundational insights into epigenetics and human
 520 disease, which is essential for understanding the broader implications of your findings.

521 ** Ref 8 (Fraga, M. F.; Ballestar, E.; Paz, M. F.; Ropero, S.; Setien, F.; Ballestar, M. L.; Heine-
 522 Suñer, D.; Cigudosa, J. C.; Urioste, M.; Benitez, J.; et al. Epigenetic Differences Arise during
 523 the Lifetime of Monozygotic Twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, *102* (30), 10604–10609.
 524 <https://doi.org/10.1073/pnas.0500398102>.)

525 Reason: This study on epigenetic differences in monozygotic twins underscores the
 526 variability and significance of epigenetic changes, which is essential for contextualizing our
 527 results.

528 ** Ref 20 (Yang, A. S.; Estécio, M. R.; Doshi, K.; Kondo, Y.; Tajara, E. H.; Issa, J. P. A Simple
 529 Method for Estimating Global DNA Methylation Using Bisulfite PCR of Repetitive DNA
 530 Elements. *Nucleic Acids Res*, 2004, *32* (3), e38. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh032>.)

531 Reason: This paper offers a simple method for estimating global DNA methylation
 532 using bisulfite PCR of repetitive DNA elements, which is directly relevant to our
 533 methodological approach.

534 * Ref 5 (Jain, V. G.; Monangi, N.; Zhang, G.; Muglia, L. J. Genetics, Epigenetics, and
 535 Transcriptomics of Preterm Birth. *Am J Reprod Immunol*, 2022, *88* (4), e13600.
 536 <https://doi.org/10.1111/aji.13600>.)

537 Reason: This paper discusses the genetics, epigenetics, and transcriptomics of preterm
 538 birth, providing a broader context for this study.

539 * Ref 10 (Wicker, T.; Sabot, F.; Hua-Van, A.; Bennetzen, J. L.; Capy, P.; Chalhoub, B.; Flavell,
 540 A.; Leroy, P.; Morgante, M.; Panaud, O.; et al. A Unified Classification System for Eukaryotic
 541 Transposable Elements. *Nat Rev Genet*, 2007, *8* (12), 973–982.
 542 <https://doi.org/10.1038/nrg2165>.)

543 Reason: The classification system for eukaryotic transposable elements outlined here is
 544 foundational for understanding the genomic context of LINE-1 elements.

545 * Ref 22 (Bogdanović, O.; Gómez-Skarmeta, J. L. Embryonic DNA Methylation: Insights from
 546 the Genomics Era. *Brief Funct Genomics*, 2014, *13* (2), 121–130.
 547 <https://doi.org/10.1093/bfgp/elt039>.)

548 Reason: Insights from this study on embryonic DNA methylation are essential for
 549 understanding the developmental implications of your findings.

550 * Ref 33 (Chalfun, G.; Araújo Brasil, A. de; Paravidino, V. B.; França, T.; Pinho, A. M.; Silva,
 551 T.; Santos, M.; Barbosa, R.; Reis, T.; Rabello, F.; et al. NR3C1 Gene Methylation and Cortisol
 552 Levels in Preterm and Healthy Full-Term Infants in the First 3 Months of Life. *Epigenomics*,
 553 2022, *14* (24), 1545–1561. <https://doi.org/10.2217/epi-2022-0032>.)

554 Reason: This study on NR3C1 gene methylation and cortisol levels in preterm infants
 555 provides relevant insights into the epigenetic mechanisms and their potential impact on neonatal
 556 health.

Table 1. Target region used for primers design covering nucleotides 222 to 360, corresponding to the accession code X58075.1 in the NCBI GenBank. CpG sites of interest numbered and highlighted in bold.

Nucleotide No.	Nucleotide sequence
222	GTTCCCTTT CCGAGTCAAA GAAAGGGGTG ACGGACGCAC CTGGAAAATC
271	GGGTCACTCC CACCCGAATA TTGCGCTTT CAGACC ¹ GGCT TAAGAAC ² GG
321	C³GCACCAC⁴GA GACTATATCC CACACCTGGC TCAGAGGGTC

Table 2. Epidemiological and clinical characteristics of pregnant women, preterm, and term newborns.

Characteristics	Preterm (n = 46)	Full-term (n = 49)	P-value
Maternal Age (years): median (IQR)	31 (25.2-34)	28 (24 – 34)	0.197 ^a
Maternal Education (years): n (%)			0.474 ^b
1 - 4	1 (2.2)	0 (0)	
5 - 8	7 (15.2)	9 (18.4)	
9 - 11	8 (17.4)	13 (26.5)	
>12	30 (65.2)	27 (55.1)	
Family Income (BRL Minimum wage): n (%)			0.023 ^b
< 1	13 (28.3)	4 (8.2)	
1-2	17 (37)	28 (57.1)	
> 2	16 (34.8)	15 (30.6)	
Ethnicity: n(%)			0.114 ^b
White	18 (39.1)	22 (44.9)	
Black	13 (28.3)	5 (10.2)	
Mixed races	15 (32.6)	22 (44.9)	
Health Conditions			
Smoking: n (%)			>0.999 ^c
No	44 (95.7)	46 (93.9)	
Yes	2 (4.3)	3 (6.1)	
Alcohol Consumption: n (%)			0.323 ^c
No	42 (91.3)	48 (98)	
Yes	4 (8.7)	1 (2)	
Perinatal Consultations: median (IQR)	5 (4 - 7)	9 (7 - 10)	< 0.001 ^a
Gestational Age (weeks): median (IQR)	28.5 (27 - 30)	39 (38 - 40)	< 0.001 ^a
Apgar Score (1min): median (IQR)	7 (4.25 - 8)	8 (8 - 9)	< 0.001 ^a
Apgar Score (5min): median (IQR)	8.5 (8 - 9)	9 (9 - 9)	< 0.001 ^a
Sex: n (%)			0.634 ^b
Male	25 (54.3)	29 (59.2)	
Female	21 (45.7)	20 (40.8)	
Birth Weight (g)			< 0.001 ^a
Mean (SD)	1074.5 (290)	3393 (385.0)	
Median (IQR)	1075 (860 - 1345)	3320 (3150 - 3575)	
Length (cm)			< 0.001 ^a
Mean (SD)	35.9 (1.8)	48.9 (3.4)	
Median (IQR)	36.4 (34 - 37.5)	49 (47.5 - 49.6)	
Head Circumference (cm)			< 0.001 ^a
Mean (SD)	26 (2.4)	34.4 (1.5)	
Median (IQR)	26 (24.6 - 28)	34 (33.5 - 35)	

IQR: Interquartile range. SD: Standard deviation. BRL: Brazil

^aMann-Whitney U test. ^bChi-square test. ^cFisher's exact test

Table 3. Comparison of median methylation percentages between term and preterm infants at different time points.

		Full-term (%) (IQR)	Preterm (%)	p-value ^a
D0 Full-term (n=49) Preterm (n=45) ^b	CpG1	69.5 (68.2 - 70.7)	68.0 (66.45 - 70.4)	0.038
	CpG2	65.7 (64.4 - 67.3)	63.6 (64.47 - 67.3)	<0.001
	CpG3	69.7 (64.4 - 67.3)	68.3 (64.47 - 67.3)	0.012
	CpG4	78.0 (64.4 - 67.3)	75.2 (64.47 - 67.3)	<0.001
	CpG 1-4	70.9 (69.5 - 71.8)	68.1 (66.3 - 71.5)	0.002
D5 Full-term (n=40) Preterm (n=40) ^c	CpG1	70.4 (69.3 - 71.5)	69.8 (68.6 - 71.1)	0.112
	CpG2	66.5 (65.7 - 67.4)	65.9 (64.4 - 66.8)	0.020
	CpG3	70.4 (69.5 - 71.2)	70.4 (69.5 - 71.5)	0.931
	CpG4	79.5 (78.4 - 80.3)	78.6 (77.3 - 79.4)	0.010
	CpG 1-4	71.8 (71.1 - 72.4)	71.1 (70.0 - 72.1)	0.053
D30 Full-term (n=0) Preterm (n=36) ^c	CpG1	N/A	70.7 (70.0 - 71.7)	
	CpG2	N/A	66.0 (65.3 - 67.3)	
	CpG3	N/A	71.2 (70.4 - 72.1)	
	CpG4	N/A	79.5 (78.5 - 80.2)	
	CpG 1-4	N/A	71.6 (71.1 - 72.8)	
D90 Full-term (n=0) Preterm (n=34) ^c	CpG1	N/A	70.4 (69.8 - 71.1)	
	CpG2	N/A	66.4 (65.6 - 67.2)	
	CpG3	N/A	70.3 (69.6 - 71.5)	
	CpG4	N/A	78.3 (77.9 - 79.1)	
	CpG 1-4	N/A	71.3 (71.0 - 72.3)	

Interquartile range, D0: day of birth, D5: fifth day of life, D30: thirtieth day of life, D90: ninetieth day of life,
N/A: not available.

^aMann-Whitney U test, ^bone D0 sample could not be processed in the premature newborn group, ^cthe difference to the initial "n" represents samples lost to follow-up.

Table 4. Comparison of global LINE-1 methylation percentage among full-term, very preterm^a, and extremely preterm infants^b.

Time	n	Group	% of global methylation in LINE-1 (IQR)	Comparison with full-terms (P-value)	Comparison with very preterm (P-value)
D0	49	Full-term	70.92 (69.55 - 71.88)	< 0.001	0.082
	31	Very preterm	67.21 (64.72 - 71.14)		
	14	Extremely preterm	70.58 (67.70 - 71.52)		
D5	40	Full-term	71.80 (71.05 - 72.40)	0.021	0.112
	29	Very preterm	71.06 (69.32 - 71.77)		
	11	Extremely preterm	71.66 (71.06 - 72.28)		
D30	25	Very preterm	71.54 (71.05 - 72.50)	0.164	0.052
	11	Extremely preterm	72.50 (72.04 - 72.84)		
D90	24	Very preterm	71.19 (70.64 - 71.53)		
	10	Extremely preterm	71.94 (71.21 - 72.55)		

n: number of samples in each group, IQR: Interquartile range, D0: day of birth, D5: fifth day of life, D30: thirtieth day of life, D90: ninetieth day of life.

^aVery preterm: 28 to less than 32 weeks gestational age, ^bExtremely preterm: less than 28 weeks gestational age.

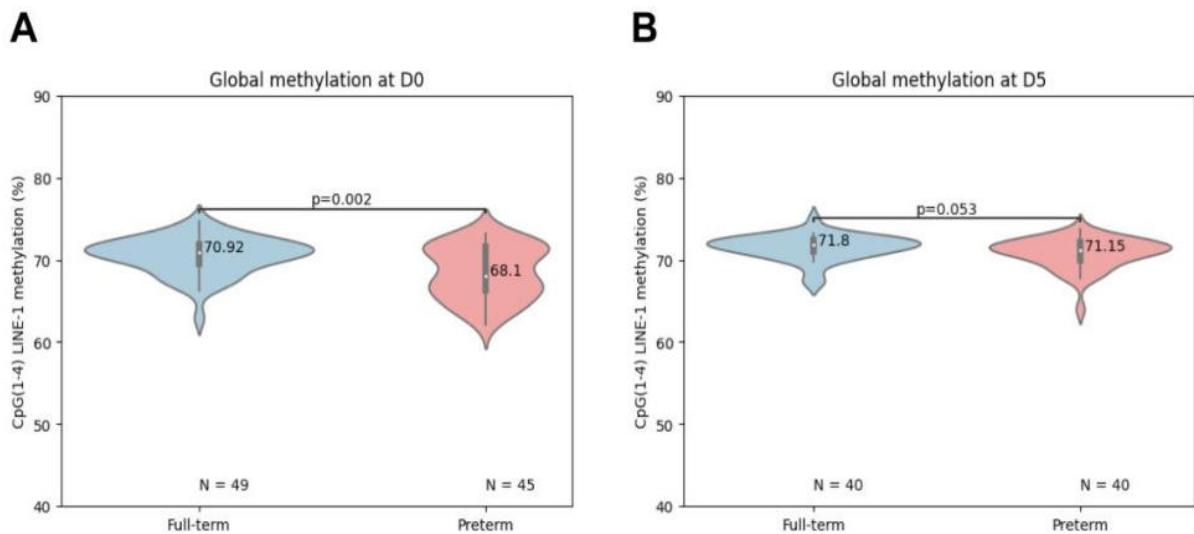


Figure 1. Distribution of global methylation percentage in full-term and preterm newborns. At birth (A), significantly higher methylation percentages were observed in the full-term newborn group. This percentage was still higher on the fifth day of life (B), but the difference between the groups did not show statistical significance, although with a marginal p-value.

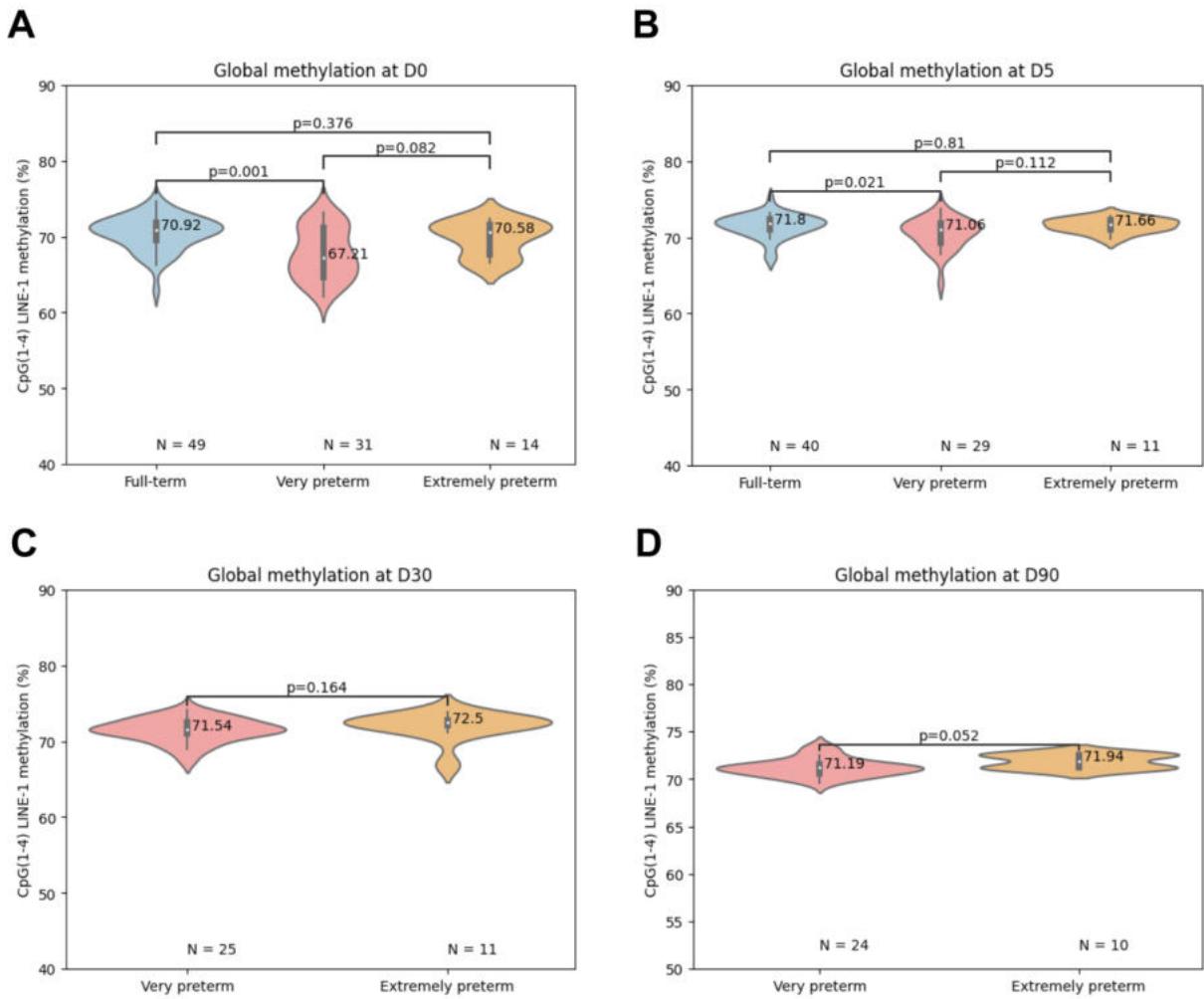


Figure 2. Distribution of global methylation percentage in term newborns, very preterm (28 to less than 32 weeks gestational age), and extremely preterm infants (less than 28 weeks gestational age) at birth (A), on the fifth day of life (B), on the thirtieth day of life (C), and the ninetieth day of life (D). In panel A, a significant difference in methylation is observed between full-term and very preterm neonates, which is not observed between very preterm and extremely preterm. Extremely preterm infants had a methylation percentage closer to full-term newborns than to very preterm ones (not statistically significant). In panel B, the difference in global methylation between full-term and very preterm infants is still statistically significant, although not significant between very preterm and extremely preterm infants, as well as between full-term infants and extremely preterm infants. In panels C and D, there were no differences in the global methylation percentage between the subgroups of preterm infants, although the p-value on D90 (D) approached statistical significance.

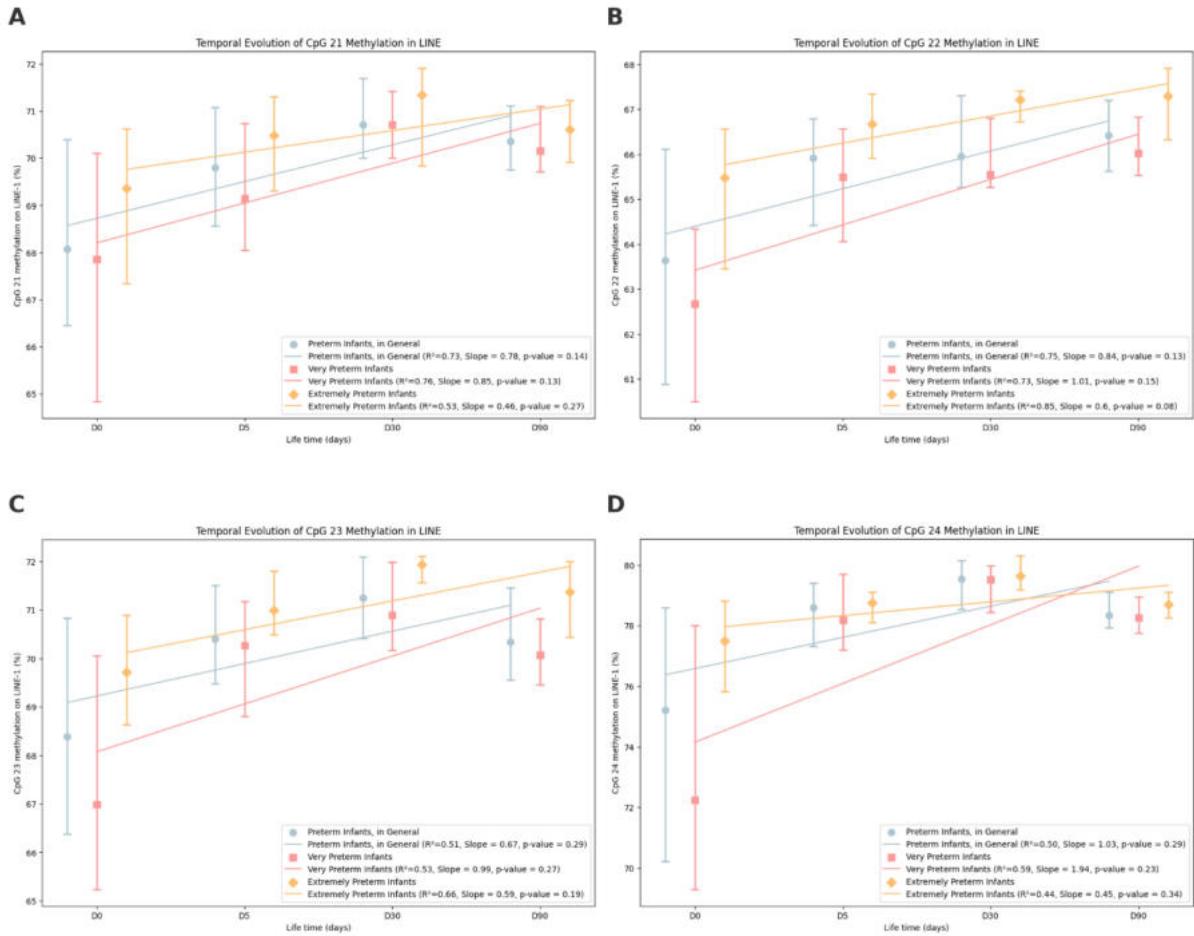


Figure 3. Temporal evolution of site-specific methylation in preterm newborns at CpG sites 1 (A), CpG 2 (B), CpG 3 (C), and CpG 4 (D) of the transposable element LINE-1 at time points D0, D5, D30, and D90, showing positive slopes but not significant trends.

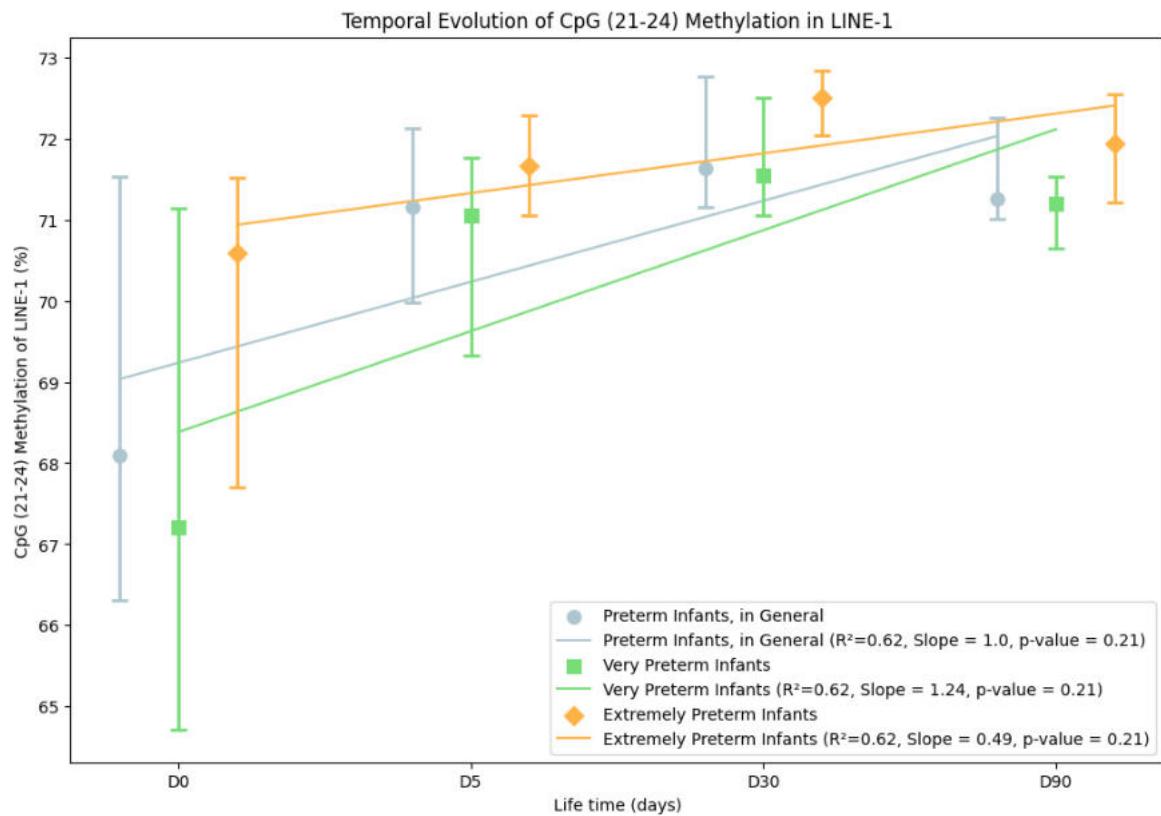


Figure 4. Temporal evolution of global methylation in LINE-1 CpG sites in preterm newborns at D0, D5, D30, and D90 shows a positive slope but not a significant trend.