



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JAQUELINE CRUZ GERALDIS

ANÁLISE DO PADRÃO DA METILAÇÃO DO DNA GENÔMICO NA EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL MESIAL ASSOCIADA À ESCLEROSE HIPOCAMPAL

CAMPINAS

2020

JAQUELINE CRUZ GERALDIS

ANÁLISE DO PADRÃO DA METILAÇÃO DO DNA GENÔMICO NA EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL MESIAL ASSOCIADA À ESCLEROSE HIPOCAMPAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Mestra em Ciências

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

COORIENTADORA: DRA. DANYELLA BARBOSA DOGINI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
JAQUELINE CRUZ GERALDIS, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES.

CAMPINAS

2020

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

G311a Geraldis, Jaqueline Cruz, 1990-
Análise do padrão da metilação do DNA genômico na epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal / Jaqueline Cruz Geraldis. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Íscia Teresinha Lopes Cendes.
Coorientador: Danyella Barbosa Dogini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Metilação. 2. DNA. 3. Epilepsia. I. Lopes-Cendes, Íscia Teresinha, 1964-. II. Dogini, Danyella Barbosa. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Methylation pattern of genomic DNA in mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis

Palavras-chave em inglês:

Methylation

DNA

Epilepsy

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Íscia Teresinha Lopes Cendes [Orientador]

André Schwambach Vieira

Esper Abrão Cavalheiro

Data de defesa: 08-07-2020

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2188-6624>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3392635479052459>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DO MESTRADO

JAQUELINE CRUZ GERALDIS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

COORIENTADORA: DRA. DANYELLA BARBOSA DOGINI

MEMBROS

1. PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

2. PROF. DR. ANDRÉ SCHWAMBACH VIEIRA

3. PROF. DR. ESPER ABRÃO CAVALHEIRO

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

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

Data de Defesa: 08/07/2020

Dedicatória

Dedico ao senhor, Pai Oxossi, toda a minha carreira acadêmica.

"Canta meu Bem-te-vi,

Canta, canta

Canta meu Sabiá

Canta, Caboclo da mata

Oxossi vai reinar"

Agradecimento

À minha família, em especial minha mãe Erica, meu pai Erik e meu irmão Tomásinho. Muito obrigada por sempre acreditarem no meu potencial e por nunca me deixarem desistir, por mais difícil que possa ter sido! Obrigada à Vó Rosália por sempre ser minha segunda mãe, à Vó Edna e Tia Ellen por sempre estarem presentes nos momentos que em ri e chorei. Obrigada Tia Vi pelos seus conselhos.

Ao Lucas Miguel, por ser esse namorado tão presente e encorajador. Obrigada por compartilhar comigo da mesma profissão – Cientista –, por entender todos os momentos e por sempre me incentivar a aprender cada dia mais.

À Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes por me receber em seu grupo e por sempre proporcionar pensamentos e atitudes que nos incentive a ir cada vez mais longe.

À Dra. Danyella Dogini por me coorientar e por sempre estar disposta a conversar e enriquecer o pensamento.

Ao MSc. Welliton Souza por estar presente em todo o processo de análise de bioinformática e por todas as conversas produtivas.

A todos os meus amigos e, em especial, Jaqueline Berto, Amanda Morato, Amanda Donatti, Alexandre Godoi, Mariana Moysés, Natália Nunes, Nádia Tomita, Gabriela Xavier, Fernanda Talarico, Letícia Spindola, Marcos Santoro, Profa. Dra. Monica Andersen, Adriana Battista, Daliléia Santana, Angélica Almeida, Vanessa Ota. Muito obrigada por enriquecerem meu caminho e por sorrirem comigo.

À toda equipe do Laboratório de Genética Molecular da FCM. Muito obrigada por todo suporte técnico e didático.

Ao Dr. Fabio Rogério por tudo suporte e ensinamentos.

Aos pacientes participantes deste trabalho, bem como seus familiares. Muito obrigada por acreditarem, se voluntariarem e incentivarem a pesquisa brasileira.

À Umbanda Sagrada por sempre estar na minha vida e por me ensinar a prosseguir meu caminho que é de meu merecimento, com os pés bem firmes no chão! Saravados sejam todos os guias de minha coroa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar meu trabalho, desde a iniciação científica. Obrigada por confiarem em mim, na qualidade do meu trabalho e do grupo que faço parte. Obrigada por incentivarem a Ciência brasileira.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): processo número 2017/23954-0 – *Grant 2017/23954-0, São Paulo Research Foundation (FAPESP)*.

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

Resumo

A Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) associada à Esclerose Hipocampal (EH) é um dos tipos mais frequentes e graves de epilepsia. Para estes pacientes, o procedimento cirúrgico pode ser indicado como uma alternativa terapêutica, uma vez que esses apresentam resistência ao tratamento medicamentoso. A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos que atuam no controle da expressão gênica, podendo estar envolvida nos processos moleculares que levam a doenças, incluindo as epilepsias. Atualmente, o *Whole-genome bisulfite sequencing* (WGBS) é considerado o padrão-ouro para análise global de metilação do DNA (metiloma). Isso posto, o objetivo desse estudo foi avaliar se existem regiões diferencialmente metiladas (DMRs) no metiloma de amostras teciduais cirúrgicas de pacientes com ELTM+EH, comparando-as com tecidos de indivíduos controles; verificar se as alterações do metiloma progridem com o tempo de duração da doença; bem como identificar genes candidatos com possível efeito nos mecanismos básicos da ELTM+EH. O DNA foi obtido a partir de tecido cerebral (hipocampo e giro denteado) de 11 amostras de pacientes e quatro de controles provenientes de autópsia. As amostras de pacientes foram distribuídas em dois grupos: i) cinco pacientes com tempo de doença menor que 20 anos; e ii) seis pacientes com tempo de doença maior do que 20 anos. O DNA foi convertido por bissulfito de sódio e as amostras foram preparadas para o WGBS. Após o sequenciamento, os dados foram analisados com ferramentas de bioinformática e estatística. Foram realizadas três comparações: "Grupo 1 versus Controle", "Grupo 2 versus Controle", "Grupo 1 versus Grupo 2". Encontramos 3.772 DMRs, das quais foram selecionadas as 20 DMRs com maior relevância biológica em cada comparação, totalizando 60 regiões. Nas DMRs selecionadas, procuramos por genes candidatos colocalizados a elas, levando em consideração mecanismos relevantes nas epilepsias. Ao final identificamos quatro genes candidatos: *GRIN2D*, *FAM168B*, *GRP88* e *PDCD7*. Com estes genes selecionados, realizamos uma análise de interação gênica *in silico* que levou a identificação de mais três possíveis genes candidatos: *MAP2K7*, *KCND3* e o *RGS11*. Em conclusão **i)** Encontramos uma diferença no padrão do metiloma no tecido cerebral de pacientes com ELTM+EH, quando comparados aos controles; **ii)** Observamos que o padrão de metiloma dos pacientes varia com o tempo de evolução da doença; **iii)** Encontramos um total de 3.772 DMRs, sendo que há um predomínio de hipermetilação nos pacientes, quando

comparados aos controles; **iv)** Identificamos, colocalizados com as DMRs, quatro genes putativamente relacionados com os mecanismos envolvidos em epilepsia. Através de uma análise de interação gênica, identificamos mais três possíveis genes candidatos. De modo complementar, realizamos uma análise inicial de integração multiômica (metiloma e RNA-Seq), identificando correlações que devem ser posteriormente confirmadas pela análise da expressão gênica em transcritos específicos. Desse modo, nosso estudo produziu evidências de que alteração no padrão de metilação do DNA é um mecanismo que está envolvido na fisiopatologia da ELTM+EH e na sua evolução com o tempo. Portanto, estudos futuros com o objetivo do conhecimento sobre os mecanismos básicos envolvidos na ELTM+EH podem ser realizados com base nos dados que produzimos nesse trabalho.

Abstract

Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) with hippocampal sclerosis (HS) is one of the most frequent and severe types of epilepsy. For patients with refractory MTLE, epilepsy surgery may be a useful therapeutic alternative. DNA methylation is one of the several epigenetic mechanisms and may modulate gene expression. Thus, alterations in DNA methylation may be involved in the underlying mechanisms of disease. This work aims to investigate whether there are differences in the whole-genome DNA methylation pattern, also called methylome, in tissue obtained from patients with refractory MTLE who underwent epilepsy surgery. In addition, we want to investigate if the DNA methylation pattern changes with the increased duration of the disease. To achieve these objectives, we performed whole-genome bisulfite sequencing (WGBS), which is currently considered is the gold-standard approach to determine global DNA methylation. We included tissue samples from 11 patients with MTLE+HS, five belonging to patients with less than 20 years of disease duration (Group 1), and six samples from patients with more than 20 years of disease (Group 2). Also, we used four control samples from autopsy material. DNA samples were extracted from the tissue samples (hippocampus and dentate gyrus) using the phenol-chloroform protocol. DNA was converted by sodium bisulfite, and the samples were prepared for whole-genome bisulfite sequencing. Sequencing data were analyzed using bioinformatics and statistics tools. We performed three different comparisons: Group 1 versus Controls, Group 2 versus Controls, and finally, Group 1 versus Group 2. Overall, we found a total of 3,772 differentially methylated regions (DMRs). We selected the 20 DMRs displaying the greatest biological relevance for each comparison and performed further analysis. First, we searched for candidate genes presenting functions that have been previously associated with epilepsy in each of the 60 DMRs selected, and we found four candidate genes: *GRIN2D*, *FAM168B*, *GRP88*, and *PDCD7*. Subsequently, we performed intergenic network analysis and identified three additional candidate genes: *MAP2K7*, *KCND3*, and *RGS11*. In conclusion, **i)** we found significant differences in the genomic methylation pattern of brain tissue from patients with MTLE+HS, compared to controls, **ii)** we also observed that the methylome pattern changed with an increased duration of the disease, suggesting that the tissue injury in patients with MTLE+HS progresses over the time, **iii)** we found a total of 3,772 DMRs and

observed a predominance of hypermethylation in patients as compared to controls, **iv)** we identified four candidate genes which mapped within the DMRs identified, and **v)** *in silico* gene interaction analysis identified three additional candidate genes. Additionally, we performed a preliminary analysis integrating the methylome and RNA Sequencing data and found correlations that need further confirmation by quantitative RT-PCR performed in specific transcripts. Altogether, we have found evidence that differential DNA methylation is a relevant mechanism that should be further explored in future studies aiming to unravel the underlying mechanisms leading to disease as well as the progression of the tissue lesion in MTLE+HS.

Lista de Figuras

Figura 1: Microscopia anatômica do tecido cerebral contendo as estruturas do hipocampo (CA1 - CA4) e do giro denteado (GD). **A:** Microscopia do hipocampo humano provindo de autópsia, corado pela técnica de Luxol Fast Blue - Cresyl-Violeta. As próximas figuras são referentes aos diferentes tipos de esclerose hipocampal (EH). **B:** EH Tipo 1 – grave perda neuronal e gliose predominante em CA1 e CA4. **C:** EH Tipo 2 – predominante perda de células neuronais e gliose em CA1. **D:** EH Tipo 3 – predominante perda de células neuronais e gliose em CA4. **E:** espécime cirúrgico provindo de um paciente com ELT que não apresenta EH, porém encontra-se gliose no tecido (sem-EH). As figuras B – E foram coradas com NeuN, pela técnica de imuno-histoquímica, juntamente com hematoxilina. Legenda: "CA1 – CA4" são os setores dos Cornu Ammonis; "DG" refere-se ao giro denteado (sigla em inglês – dentate gyrus); "Sub" refere-se ao subículo. Barra de escala em A = 1000 µm (aplica-se também para B – E). Figura adaptada de Blümcke, I. et al. 2013 (11)21

Figura 2: Bioquímica da metilação do DNA. A família de enzima DNA-metiltransferases (DNMTs) atuam na adição do grupo metil na S-adenil metionina no carbono 5 de uma citosina, tornando-a uma 5-metilcitosina (5mC). (a) As DNMT3a e DNMT3b catalisam a metilação de novo em uma fita de DNA sem metilação – esferas coradas em vermelho são os grupos metil. (b) A DNMT1 mantém o padrão de metilação da fita-molde durante a replicação do DNA – esferas cinzas são os grupos metil da fita-molde; os vermelhos, grupos das fitas-filhas. (Figura retirada do Moore et al. 2013 (21)).....23

Figura 3: Conversão do DNA por bissulfito de sódio, bem como a subsequente reação de PCR (polymerase chain reaction). (Figura adaptada de McCarthy, M M et al. 2015 ((27))24

Figura 4: Representação gráfica da distribuição da variável "idade" de nossa casuística. No eixo x tem-se os grupos avaliados e no eixo y, a distribuição da idade em anos. Legenda: "CT" refere-se aos controles; "G1" aos pacientes do grupo 1; "G2", aos pacientes do grupo 2.37

Figura 5: Representação gráfica da distribuição da variável "tempo de doença" de nossa casuística. No eixo x tem-se os grupos avaliados e no eixo y, a distribuição do tempo de

doença em anos. Legenda: "G1" refere-se aos pacientes do grupo 1; "G2", aos pacientes do grupo 2.	38
Figura 6: Gel de agarose 1% das amostras da Tabela 3.	38
Figura 7: Representação esquemática da distribuição da quantia de DMRs encontradas em cada comparação. Legenda: "G1" refere-se ao grupo 1 de paciente; "G2", ao grupo 2 de paciente; "CT", aos indivíduos controles.	41
Figura 8: Representação das médias de metilação das 20 principais DMRs, na comparação "Grupo 1 versus Controle". No eixo x, temos as DMRs, numeradas de 1 a 20; eixo y, as médias de metilação de cada DMR, em cada grupo avaliado.....	42
Figura 9: Representação das médias de metilação das 20 principais DMRs, na comparação "Grupo 2 versus Controle". No eixo x temos as DMRs, numeradas de 1 a 20; eixo y, as médias de metilação de cada DMR, em cada grupo avaliado.....	42
Figura 10: Representação das médias de metilação das 20 principais DMRs, na comparação "Grupo 1 versus Grupo 2". No eixo x temos as DMRs, numeradas de 1 a 20; eixo y, as médias de metilação de cada DMR, em cada grupo avaliado.....	43
Figura 11: Diagrama de Venn dos genes provenientes das comparações "Grupo 1 versus Controle", "Grupo 2 versus Controle" e "Grupo 1 versus Grupo 2", bem como a quantia de genes em comuns a ambas.....	43
Figura 12: Representação gráfica da janela genômica a qual nossa DMR de interesse está inserida, mediante análise do gene GRIN2D. Em azul escuro, temos a ilha CpG já catalogada na literatura; em amarelo, o transcrito do gene catalogado no UCSC; em verde, a nossa DMR; abaixo, porcentagens de metilação. Legenda: indivíduos controle (CG) e pacientes do grupo 1 (G1).....	44
Figura 13: Representação gráfica da janela genômica a qual nossa DMR de interesse está inserida, mediante análise do gene FAM168B. Em azul, temos a ilha CpG já catalogada na literatura; em amarelo, o transcrito do gene; em verde, a nossa DMR; abaixo, porcentagens de metilação. Legenda: indivíduos controle (CG), pacientes do grupo 1 (G1) e pacientes do grupo 2 (G2).....	45
Figura 14: Representação gráfica da janela genômica a qual nossa DMR de interesse está inserida, mediante análise do gene GPR88. Em azul, temos a ilha CpG já catalogada na literatura; em amarelo, o transcrito do gene; em verde, a nossa DMR; abaixo,	

porcentagens de metilação. Legenda: pacientes do grupo 1 (G1) e pacientes do grupo 2 (G2).....45

Figura 15: Representação gráfica da janela genômica a qual nossa DMR de interesse está inserida, mediante análise do gene PDCD7. Em azul, temos a ilha CpG já catalogada na literatura; em amarelo, o transcrito do gene; em verde, a nossa DMR; abaixo, porcentagens de metilação. Legenda: pacientes do grupo 1 (G1) e pacientes do grupo 2 (G2).....46

Figura 16: Rede de interação gênica, usando com base o bando de dados HumanBase e o filtro para "tecido hipocampal"47

Lista de tabelas

- Tabela 1:** Caracterização da casuística presente nesse projeto. Nesta tabela estão sumarizadas informações dos pacientes: de idade (em anos); tempo de doença (sigla TdD – em anos); sexo; tipo de esclerose hipocampal (EH) presente na histologia do tecido cerebral; medicamentos usados e suas dosagens (em mg) no período da cirurgia; frequência de crises pré e pós-cirurgia. Em relação ao grupo controle: idade (em anos) e sexo. Legenda: CBZ (carbamazepina); CLB (clobazam); VPA (ácido valpróico); CLN (clonazepam); LTG (lamotrigina); GBP (gabapentina); OXC (oxcarbamazepina); CPS (crises sem alteração da percepção); CPC (crises com perda da percepção).....35
- Tabela 2:** Sumarização dos testes estatísticos aplicados às variáveis "idade", "tempo de doença" e "sexo". Nesta tabela encontram-se os p-values e os valores de χ^2 . Legenda: GL = graus de liberdade.....37
- Tabela 3:** Concentrações dos DNAs genômicos (gDNA), bem como das bibliotecas para sequenciamento. Na última coluna, tem-se o tamanho dos fragmentos (pb) sequenciados. Legenda: "ID" – código de identificação da amostra.....39
- Tabela 4:** Sumarização dos parâmetros de qualidade referentes a análise do WGBS. Legendas: "ID" – código de identificação da amostra; "%CG" – porcentagem do conteúdo GC; "%mCHG" – porcentagem de citosinas metiladas que estão no contexto CHG; "%mCHH" – porcentagem de citosinas metiladas que estão no contexto CHH; "%mCpG" – porcentagem de citosinas metiladas que estão no contexto CpG.....40
- Tabela 5:** Sumarização do total de DMRs encontradas, bem como sua quantia absoluta de regiões "hipermetiladas" e "hipometiladas", em cada comparação realizada.....41
- Tabela 6:** Sumarização das observações a partir da integração inicial, bem como os resultados das diferentes ômicas, separadamente. Legenda: "meanDiff" é a diferença de metilação observada a partir da comparação realizada; "NA" representa que não há valor para célula em questão; "?" significa sugestão de expressão inconclusiva a partir da observação da localização da DMR; "G1" é grupo 1 de pacientes; "G2" é o grupo 2 de pacientes; "Cont" representa o grupo controle.49
- Tabela 7:** Escala de Engel para o acompanhamento da frequência de crises pós-operatória em pacientes com epilepsia refratária (Engel Epilepsy Surgery Outcome Scale) – Tabela adaptada de H. G. Wieser et al. 2001 (46).....71

Tabela 8: Sumarização das 20 principais DMRs de cada grupo, bem como informações sobre porcentagem de metilação de cada DMR, em cada grupo e a diferença de metilação entre os grupos.	72
Tabela 9: Genes relevantes para o mecanismo de epilepsia e que estão co-localizados nas 60 principais DMRs avaliadas.....	75

Lista de abreviações e siglas

ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i> (Liga Internacional Contra a Epilepsia)
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
ELTM	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial
EH	Esclerose Hipocampal
CA1	<i>Cornu Ammonis 1</i>
CA2	<i>Cornu Ammonis 2</i>
CA3	<i>Cornu Ammonis 3</i>
CA4	<i>Cornu Ammonis 4</i>
GD	Giro Denteado
CH₃-	Metil-grupo
5mC	5-metilcitosina
DNMT	DNA Metiltransferase
CpG	Citosina-fosfato-guanina
WGBS	<i>Whole Genome Bisulfite Sequence</i> (Sequenciamento total do genoma convertido por bissulfito de sódio)
DMR	<i>Differentially methylated regions</i> (regiões diferencialmente metiladas)
HC	Hospital de Clínicas
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia de polimerase quantitativa)
GRCh38	<i>Genome Reference Consortium Human Genome</i> – montagem 38
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
HDAC	Histonas deacetilases (<i>Histone deacetylases</i>)
mRNA	RNA mensageiro
GO	<i>Gene Ontology</i>
Non-CpG	Citosina pareada a uma base nitrogenada que não seja a guanina
Zn²⁺	Elemento químico Zinco
GRIN2D	Gene <i>Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D</i>
FAM168B	Gene <i>Gyelin-associated neurite-outgrowth inhibitor</i>
GRP88	Gene <i>G protein-coupled receptor 88</i>
PDCD7	Gene <i>Programmed cell death 7</i>
MAPK7	Gene <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7</i>
KCND3	Gene <i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member</i>
RGS11	Gene <i>Regulator Of G Protein Signaling 11</i>
CBZ	Carbamazepina
CLB	Clobazam
VPA	Ácido Valpróico
CLN	Clonazepam
LTG	Lamotrigina
GBP	Gabapentina
OXC	Oxcarbamazepina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Epilepsia do lobo temporal mesial e a esclerose hipocampal.....	20
1.2 Epigenética: a metilação do DNA.....	22
1.2.1 Sequenciamento de nova geração para análise de metilação global do DNA (metiloma).....	24
1.2.2 A metilação do DNA na epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODO	28
3.1 Definição da casuística.....	28
3.2 Preparo da biblioteca do DNA para sequenciamento de nova geração (<i>Whole- Genome Bisulfite Sequencing</i> - WGBS).....	30
3.3 Análise dos dados obtidos com o WGBS	31
3.4 Análise preliminar integrativa: união de metiloma com o <i>RNA-Seq</i>	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Caracterização das amostras	35
4.2 Quantificação das bibliotecas e os parâmetros de qualidade do sequenciamento	38
4.3 DMRs - Visão Geral	41
4.4 Seleção das DMRs	41
4.4.1 Principais DMRs – Grupo 1 de pacientes <i>versus</i> Controles.....	41
4.4.2 Principais DMRs – Grupo 2 de pacientes <i>versus</i> Controles.....	42
4.4.3 Principais DMRs – Grupo 1 de pacientes <i>versus</i> Grupo 2 de pacientes.....	42
4.5 Seleção de genes candidatos para validação da expressão gênica futura.....	43

4.5.1 Gene <i>GRIN2D</i>	44
4.5.2 Gene <i>FAM168B</i>	44
4.5.3 Gene <i>GPR88</i>	45
4.5.4 Gene <i>PDCD7</i>	46
4.5.5 Análise de interação gênica <i>in silico</i>	46
4.6 Análise da integração entre diferentes ômicas	47
5. DISCUSSÃO	50
5.1 Metilação do DNA no tecido cerebral de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal.....	50
5.1.1 A metilação do DNA na comparação "Pacientes <i>versus</i> Controle"	51
5.1.2 A metilação do DNA frente à variação no tempo de doença.....	52
5.2 Genes candidatos identificados	54
5.2.1 Análise de interação gênica <i>in silico</i>	56
5.3 A complexidade molecular presente na epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal.....	56
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS.....	60
8. ANEXOS	67
Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética	67
Anexo 2 – Tabela 7	71
Anexo 3 – Tabela 8	72
Anexo 4 – Tabela 9	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia do lobo temporal mesial e a esclerose hipocampal

A epilepsia é uma das condições neurológicas mais frequentes no mundo, acometendo cerca de 70 milhões de pessoas (1). Sua prevalência é maior em países em desenvolvimento e se torna mais relevante conforme há um aumento da idade (a partir dos 50 anos) (2). A Liga Internacional Contra a Epilepsia (*International League Against Epilepsy* – ILAE), periodicamente, é responsável por revisar a classificação e a definição dos diferentes tipos de epilepsias (3). Os pacientes com este distúrbio apresentam a capacidade de gerar crises espontaneamente – processo epileptogênico - (4), sendo as epilepsias classificadas como focais e generalizadas, preponderantemente. A etiologia dos diferentes tipos de epilepsias é diversa: genética, estrutural, metabólica, imunológica e desconhecida (1).

As epilepsias focais se iniciam de forma localizada em regiões específicas do córtex cerebral, podendo ocorrer no córtex do sistema límbico ou no neocórtex (5). A epileptogênese caracteriza-se pelo desbalanço entre redes neurais excitatórias e inibitórias, resultando no mal funcionamento entre as sinapses (6). A etiologia das epilepsias focais é estrutural para maior parte dos pacientes, no entanto, os aspectos genéticos e epigenéticos também estão sendo relacionados a caracterização e progressão das epilepsias focais (7,8).

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é um dos tipos de epilepsias focais em adultos. Uma de suas formas é a Epilepsia de Lobo Temporal Mesial (ELTM), sendo essa a mais frequente dentre os tipos de ELT. ELTM acomete regiões mediais, como hipocampo, giro para-hipocampal, giro denteado e amígdala (9). Tais regiões estão relacionadas as funções do sistema límbico, alterando aspectos cognitivos, como memória, aprendizado e linguagem (9). Pacientes com ELTM apresentam, na maioria das vezes, resistência ao tratamento medicamentoso com drogas anticonvulsivantes tradicionais (farmacorresistência), sendo, então, encaminhados ao procedimento cirúrgico, com a ressecção da estrutura candidata ao foco epiléptico (1,9). O achado histopatológico mais frequente nos espécimes cirúrgicos é a Esclerose Hipocampal (EH) (10).

O hipocampo humano é uma das estruturas da formação hipocampal, sendo constituído de quatro porções distintas: *Cornu Ammonis 1* (CA1), *Cornu Ammonis 2* (CA2), *Cornu Ammonis 3* (CA3), *Cornu Ammonis 4* (CA4). O giro denteado (GD) é mais uma região importante dentro da formação hipocampal, estando relacionadas as funções fisiológicas do hipocampo, como a memória (Figura 1A) (11).

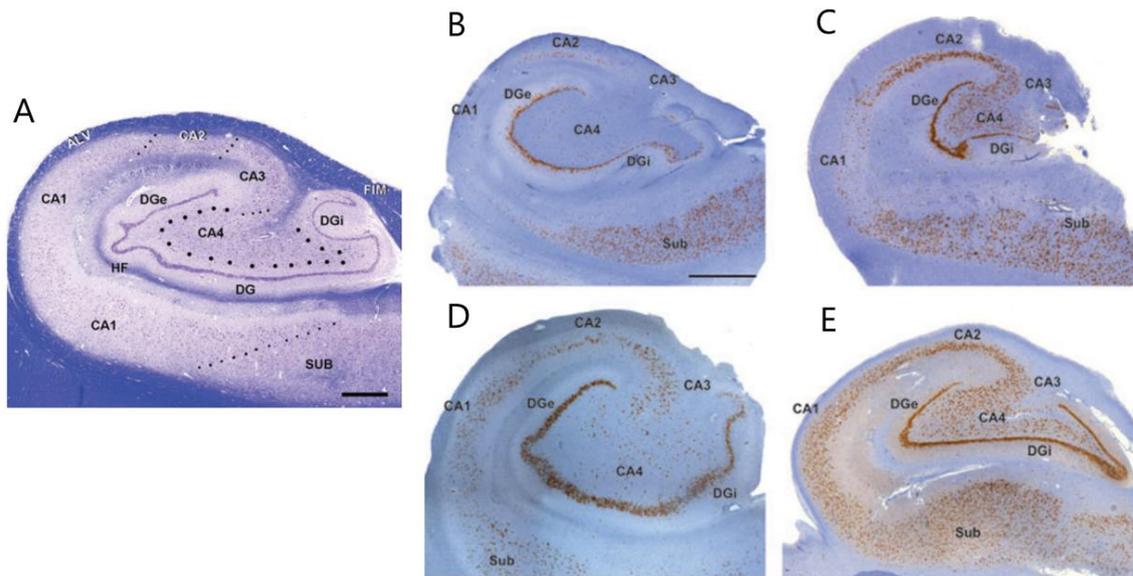


Figura 1: Microscopia anatômica do tecido cerebral contendo as estruturas do hipocampo (CA1 - CA4) e do giro denteado (GD). **A:** Microscopia do hipocampo humano provindo de autópsia, corado pela técnica de Luxol Fast Blue - Cresyl-Violeta. As próximas figuras são referentes aos diferentes tipos de esclerose hipocampal (EH). **B:** EH Tipo 1 – grave perda neuronal e gliose predominante em CA1 e CA4. **C:** EH Tipo 2 – predominante perda de células neuronais e gliose em CA1. **D:** EH Tipo 3 – predominante perda de células neuronais e gliose em CA4. **E:** espécime cirúrgico provindo de um paciente com ELT que não apresenta EH, porém encontra-se gliose no tecido (sem-EH). As figuras B – E foram coradas com NeuN, pela técnica de imuno-histoquímica, juntamente com hematoxilina. Legenda: “CA1 – CA4” são os setores dos Cornu Ammonis; “DG” refere-se ao giro denteado (sigla em inglês – dentate gyrus); “Sub” refere-se ao subículo. Barra de escala em A = 1000 μ m (aplica-se também para B – E). Figura adaptada de Blümcke, I. et al. 2013 (11)

A ELTM associada à EH é caracterizada, no âmbito histológico, pela morte celular de neurônios excitatórios e inibitórios, reinervação axonal, reorganização sináptica, bem como alterações nas funções e estruturas das células gliais (11,12). Além disso, a EH classifica-se em quatro tipos distintos (Figura 1B – 1E) (11), sendo a EH do Tipo 1 a mais frequente (Figura 1B). Mediante a perda celular, observa-se a redução do volume hipocampal (Figura 1B – 1C), sendo ela mensurada por ressonância magnética. Estudos mostram que existe uma diferença no volume hipocampal, comparado indivíduos saudáveis aos pacientes com ELT, acreditando que esse aspecto possa corroborar com a

hipótese dessa região ser o foco epiléptico nos pacientes (13,14). Além disso, a redução do volume ao longo do tempo, bem como a perda das estruturas anatômicas internas do hipocampo, sugerem que a EH possa ser uma lesão cerebral progressiva (15,16).

1.2 Epigenética: a metilação do DNA

O termo “epigenética” foi descrito por Waddington, em 1942, pela primeira vez e foi conceituado como mudanças que ocorrem no fenótipo sem alteração no genótipo (17). Na atualidade, epigenética refere-se às alterações químicas que ocorrem no DNA, não modificando a sequência dos nucleotídeos, porém que remodelam o padrão da expressão gênica (18). Tais mecanismos promovem a compactação e descompactação da cromatina, como as marcações presentes nas caudas das histonas; o aumento ou diminuição da expressão gênica, a exemplo da metilação do DNA e dos microRNAs (19). Os processos epigenéticos já foram associados aos estágios do neurodesenvolvimento, relacionados aos distúrbios neurológicos e apresentam como característica a reversibilidade do processo – uma vez realizada uma reação química epigenética, ela pode ser desfeita. Além disso, sabe-se que os mecanismos epigenéticos sofrem alterações mediante exposição a fatores internos e externos – a exemplo da microbiota, dieta, estilo de vida, estresse, passagem do tempo –, resultando em uma modificação na expressão gênica positiva ou aberrante, sendo que as aberrantes podem ser relacionadas ao desenvolvimento de doenças (20).

A metilação do DNA consiste na adição covalente de um metil-grupo (CH_3 -), provindo de uma S-adenil metionina, a um nucleotídeo. Esta adição ocorre preponderante no carbono 5 de uma citosina, transformando-a em um 5-metilcitosina (5mC), sendo essa reação catalisada por uma família de enzimas, as DNA metiltransferases (DNMT). Existem diferentes tipos de DNMTs, sendo as mais estudadas: DNA metiltransferase 1 (DNMT1) que é responsável pela manutenção do padrão de metilação durante as replicações do DNA; e a DNA metiltransferase 3 (DNMT3), responsável pela metilação *de novo* (21) (Figura 2).

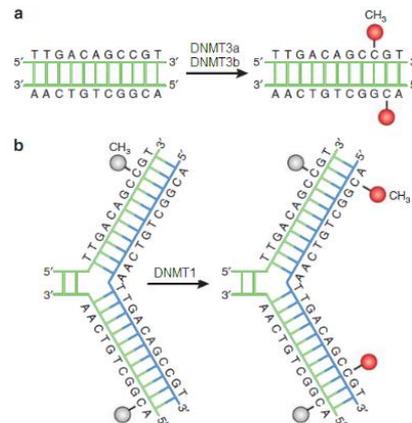


Figura 2: Bioquímica da metilação do DNA. A família de enzima DNA-metiltransferases (DNMTs) atuam na adição do grupo metil na 5-adenil metionina no carbono 5 de uma citosina, tornando-a 5-metilcitosina (5mC). (a) As DNMT3a e DNMT3b catalisam a metilação de novo em uma fita de DNA sem metilação – esferas coradas em vermelho são os grupos metil. (b) A DNMT1 mantém o padrão de metilação da fita-molde durante a replicação do DNA – esferas cinzas são os grupos metil da fita-molde; os vermelhos, grupos das fitas-filhas. (Figura retirada do Moore et al. 2013 (21))

Os mecanismos de desmetilação do DNA apresentam-se de modo ativo ou passivo. O processo passivo ocorre quando a DNMT1 é inibida ou apresenta alguma disfunção, durante o ciclo celular. Ao não exercer sua função, o padrão de metilação não se mantém, de modo a reduzir a assinatura epigenética nessas células-filhas. A desmetilação ativa acontece independente do momento do ciclo celular, no entanto, necessita de uma reação enzimática para a remoção do radical metil (21).

A metilação do DNA é presente, preferencialmente, em citosinas que precedem uma guanina (citosina-fosfato-guanina [CpG]), porém também tem-se estudado a relevância da metilação em citosinas combinadas a outras bases nitrogenadas (non-CpG), sendo eles os contextos CHG e CHH, aonde a letra H equivale as bases adenina, timina e citosina. (22). As CpGs encontram-se em todo o genoma, sendo que a metilação é majoritária nas ilhas CpGs. O conceito de ilha CpG consiste em regiões de 1kpb as quais apresentam uma maior densidade de CpG, quando comparadas as demais porções do genoma (23), concentram-se, em maioria, nas regiões promotoras e são responsáveis pela regulação da condensação da cromatina, bem como da ligação de fatores de transcrição (21).

Este mecanismo epigenético está muito presente na literatura, uma vez que a localização da metilação ao longo do genoma traz uma versatilidade frente à regulação

da expressão gênica. A metilação do DNA quando ocorre na região promotora está associada a redução a expressão gênica (24); nos éxons, ao aumento da expressão gênica (25); e nas regiões intergênicas e intrônicas, acredita-se que haja uma repressão da expressão gênica (21).

1.2.1 Sequenciamento de nova geração para análise de metilação global do DNA (metiloma)

O estudo dos mecanismos epigenéticos ao longo de todo o genoma (epigenoma) é um campo em ascensão, bem como o desenvolvimento de técnicas capazes de mensura-los. Dentro das possibilidade de avaliação da metilação do DNA global (metiloma), podemos partir de duas abordagens: i) investigar regiões já catalogadas em bancos de dados de metilação e ii) investigar regiões que apresentam o padrão de metilação ainda pouco elucidado (26).

Uma das maneiras comerciais de distinguirmos as citosinas metiladas das não metiladas é realizando a conversão do DNA com bissulfito de sódio. Nesta conversão, as citosinas não metiladas são convertidas, quimicamente, em uracilas; as citocinas metiladas permanecem intactas. Essa modificação permite, durante o processo de reação da polimerase em cadeia realizada posteriormente, diferenciar as citosinas não metiladas das metiladas, uma vez que elas serão lidas como timinas pela enzima polimerase (Figura 3) (27).

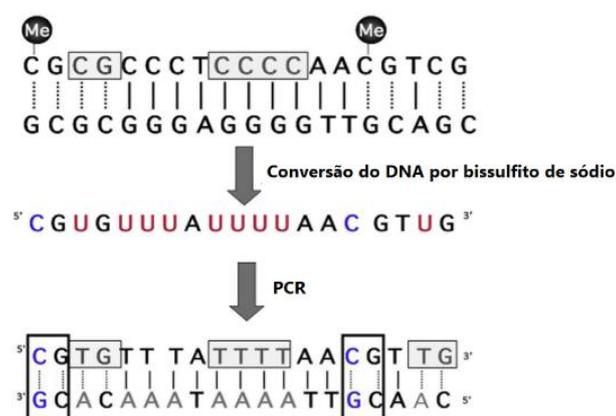


Figura 3: Conversão do DNA por bissulfito de sódio, bem como a subsequente reação de PCR (polymerase chain reaction). (Figura adaptada de McCarthy, M M et al. 2015 ((27))

O *microarray* de metilação é uma das técnicas possíveis para avaliação do metiloma, focando o olhar em CpGs. Utilizado desde 2008, os *microarrays* proporcionam

uma verificação da metilação do DNA convertido por bissulfito de sódio, em nível de nucleotídeo, sendo muito encontrada em estudos de tumores e medicina translacional. No entanto, prioriza-se a escolha desta técnica na verificação de metilação em regiões com baixa densidade de CpGs e regiões já catalogadas em bancos de dados (28).

Neste contexto, o sequenciamento de nova geração, partindo de um DNA genômico convertido por bissulfito de sódio (*whole-genome bisulfite sequence* – WGBS), ascende como técnica padrão-ouro na avaliação do metiloma, uma vez que ele proporciona informações mais sensíveis, com resolução em nível de nucleotídeo, porém sem o viés da observação de nucleotídeos encontrados nas regiões catalogadas (29). Assim, utilizando o WGBS temos acesso a todas as porções do genoma, como as regiões intergênicas, intrônicas, corpo gênico e regiões regulatórias.

Além de acessarmos os níveis de metilação em resolução de base-única, podemos utilizar o WGBS em nível de região diferencialmente metilada (*differentially methylated regions* – DMR). DMRs são regiões, ao longo do genoma, que apresentam estados de metilação diferenciados, quando há uma comparação entre diferentes amostras. Tais estados podem ser de hipermetilação – quando a amostra alvo apresenta um teor de metilação acima da amostra comparada – e hipometilação – contexto contrário ao da hipermetilação. A identificação e quantificação dessas regiões pode compor o conjunto de variáveis capazes de complementar a compreensão de um fenótipo. As DMRs localizam-se nas diversas porções do genoma, como regiões regulatórias e sítios de ligação de fatores de transcrição (30).

1.2.2 A metilação do DNA na epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal

A metilação do DNA é associada à diversas doenças, como tumores e distúrbios neurológicos, relacionando-a tanto ao desenvolvimento e progressão das doenças, quanto ao prognóstico dos pacientes (31). Apesar de sua etiologia estrutural, a literatura mostra que a epigenética pode ser um dos fatores que contribuem para a epileptogênese (20) na ELT, para a resistência ao tratamento medicamentoso (32) e levanta-se o questionamento de como a uma análise com múltiplas variáveis, como a

epigenética, possa agregar na compreensão da possível progressão da EH ao longo do tempo (16).

Apenas um estudo avalia a metilação do DNA em pacientes com ELTM associada à EH, especificamente. Long e colaboradores compararam o metiloma no sangue de pacientes e controles, por meio do *microarray*, observando que os padrões estavam significativamente diferentes, além de se relacionarem com vias de atividade de oxidorredução, ligações de ânions, regulação do crescimento e metabolismo de drogas. Nesse estudo, os autores mostram que entre os pacientes com ELTM painéis de genes diferencialmente metilados estão relacionados com a duração da doença, com a resistência aos anticonvulsivantes e com a presença da EH (33).

Atualmente, não há na literatura estudos sobre o padrão de metilação global do DNA, no tecido cerebral obtido de pacientes com ELTM e comprovação da EH pelo exame histopatológico. A busca pela compreensão dos mecanismos básicos desta desordem neurológica no tecido cerebral candidato à epileptogênese torna-se imprescindível, sendo a epigenética um aspecto promissor frente ao entendimento da complexidade etiológica, farmacológica e genética envolvida com a ELTM associada à EH, uma vez que a metilação do DNA pode alterar o padrão de expressão, bem como a abundância proteica, de elementos chaves na epileptogênese e farmacoresistência.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar o padrão da metilação do DNA ao longo de todo o genoma (metiloma) em tecido cerebral (hipocampo e giro denteado) de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada com esclerose hipocampal.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o metiloma do hipocampo e do giro denteado de pacientes, comparando-os com amostras controle;

- Avaliar e comparar o metiloma do tecido dos pacientes em tempos diferentes de duração da doença;

- Elencar regiões diferencialmente metiladas (DMRs);

- Selecionar genes candidatos que possam estar relacionados a fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal com base nas DMRs identificadas.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Definição da casuística

Os tecidos cerebrais (hipocampo e giro denteado) de pacientes utilizados neste estudo são provenientes da cirurgia de amigdalohipocampectomia realizada para o controle das crises em pacientes com epilepsia refratária, realizada no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela equipe do departamento de Neurocirurgia, que pertence ao departamento de Neurologia chefiado pelo Prof. Dr. Fernando Cendes, colaborador desse trabalho. Todas as cirurgias têm indicação médica após a extensa avaliação clínica (que inclui eletroencefalogramas seriados e exame de ressonância magnética de crânio), seguindo os protocolos internacionais, para a investigação de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento clínico. Os espécimes cirúrgicos estão devidamente armazenados no Biorrepositório de tecidos, vinculado ao projeto *Biorrepositório de Doenças Neuropsiquiátricas*, coordenado pela Profa. Iscia Lopes-Cendes, orientadora do trabalho. Esse trabalho teve a aprovação do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (FCM/UNICAMP), processo CAAE: 12112913.3.0000.5404 (Anexo 1).

Visando uma melhor avaliação temporal das modificações no padrão de metilação global do DNA na ELTM associada à EH, os pacientes foram distribuídos em dois grupos, sendo o Grupo 1 com pacientes que apresentam um tempo de doença de até 20 anos e o Grupo 2, com tempo de doença maior do que 20 anos. Tempo de doença consiste no intervalo (em anos) entre a primeira crise epiléptica do paciente e o dia da cirurgia. Devido à falta de estudos correlacionando uma análise temporal da metilação de pacientes com ELTM ao longo dos anos da doença, optamos por 20 anos de doença pois era uma idade com a qual foi possível estabelecer dois grupos, mediante amostras disponíveis no biobanco do nosso grupo de pesquisa. A casuística apresentou 11 pacientes no total, sendo que o Grupo 1 consistiu em cinco pacientes e o Grupo 2, em seis pacientes (Tabela 1).

Os critérios de inclusão foram:

- a. Apresentar idade igual ou maior do que 18 anos;

- b. Ser refratário ao tratamento com drogas anticonvulsivantes ao longo de seu acompanhamento no Ambulatório de Neurologia do HC da UNICAMP;
- c. Ter como indicação clínica a cirurgia para a remoção da região de onde acredita-se que se originam as crises;
- d. Não apresentar histórico de neurocisticercose ou tumor cerebral;
- e. Não apresentar histórico familiar de doenças neurológicas.

O grupo controle consistiu em quatro indivíduos (Tabela 1), sendo eles provindos de autópsias. O protocolo de coleta seguiu o recomendado e orientado pelo Departamento de Patologia do HC da UNICAMP, sendo que a coleta foi realizada no período de 6h a 20h, a partir do horário do óbito. Os critérios de inclusão foram:

- a. Apresentar idade maior do que 18 anos;
- b. Ser um tecido proveniente de autópsia;
- c. Não apresentar histórico de doença neurológica;
- d. Não apresentar histórico de neurocisticercose ou tumor cerebral.

Todas as amostras de tecidos cerebrais presentes neste estudo foram avaliadas pelo neuropatologista colaborador do trabalho Prof. Dr. Fabio Rogério, antes de iniciarmos os procedimentos experimentais.

As comparações realizadas neste trabalho foram:

I. Pacientes *versus* Controle: visualizar as diferenças de metilação presentes entre todos os pacientes e os indivíduos controles;

II. Pacientes Grupo 1 *versus* Pacientes Grupo 2: observar se a diferença de tempo de doença entre cada grupo de paciente é suficiente para alterar o padrão de metilação entre eles, tendo como base a mesma doença.

Iniciamos a avaliação estatística das variáveis "idade" e "tempo de doença" com o teste de normalidade *Shapiro-Wilk* em ambas. Mediante resultado do *p-value*, seguimos com o *Teste-t de Student* na variável "idade" e o teste de *Wilcoxon*, com correção de *Benjamini-Hochberg*, para "tempo de doença"; para variável "sexo", realizamos o teste de χ^2 de *Pearson* (Tabela 2).

3.2 Preparo da biblioteca do DNA para sequenciamento de nova geração (*Whole-Genome Bisulfite Sequencing* - WGBS)

A fase das reações de preparo do DNA para o WGBS foi dividida em três etapas: corte do tecido (Etapa 1), extração, purificação e quantificação do DNA (Etapa 2), conversão por bissulfito de sódio e construção da biblioteca para sequenciamento (Etapa 3).

a. Etapa 1: corte do tecido

Com o auxílio de um criostato, foram realizados quatro cortes, de 60 µm cada, da região do corpo do hipocampo e giro denteado congelados. Em seguida, colocou-se os cortes em um tubo estéril de 1,5mL. Visando a preservação tecidual, as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até o momento da extração do DNA.

b. Etapa 2: extração, purificação e quantificação do DNA

A extração do DNA foi adaptada com base no protocolo de extração fenol-clorofórmio descrito por Sambrook (34), padronizado pelo laboratório. Esta se inicia com a lise mecânica e química do tecido congelado. Adicionar 700µL do tampão de lise (50mM de Tris, 200mM de NaCl, 200mM de EDTA, SDS 1%, pH 8) e uma *bead* de aço inox de 5mm ao tubo com os cortes de tecido e, com auxílio do *Tissue Lyzer*, promover a fragmentação na velocidade de 20 oscilações/segundo, por 20 minutos. Em seguida, adicionar 30µL de proteinase K (20mg/mL) e incubar por 3h, a 50 °C. Após a incubação, adicionar 10µL de *RNAse A* e incubar, novamente, por 1h, a 37 °C. Após a segunda incubação, utilizar 600µL de uma solução de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1) para retirar possíveis proteínas de nossa amostra. Incubar as amostras, neste momento, a -20 °C, por 20 minutos. Centrifugar a 4 °C, a uma velocidade de 12.000g, separar a fase aquosa em um tubo novo. Repetir as etapas de adição da solução fenol : clorofórmio : álcool isoamílico, incubação a -20 °C, centrifugação e separação da fase aquosa. Adicionar 30µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 600µL de etanol absoluto gelado aos tubos com as fases aquosas. Incubar a -20 °C por 30 minutos. Centrifugar a 12.000g, por 30 minutos, a 4 °C. Descartar o sobrenadante. Adicionar 500µL de etanol 70% e centrifugar, novamente, a 12.000g, por 5 minutos, a 4 °C. Remover, deixar o etanol 70% secar por completo e ressuspender em água ultrapura ou em uma solução de TE.

A quantificação do DNA (Tabela 3) foi realizada com o reagente *Qubit Broad Range* (*Qubit™ dsDNA BR Assay Kit – ThermoFisher*), a verificação da integridade do DNA foi realizada pelo equipamento *EPOCH* (*Epoch Microplate Spectrophotometer – Biotek/Agilent*), ambos seguindo as recomendações dos fabricantes, e pela corrida em gel de agarose 1% (Figura 6).

c. Etapa 3: conversão do DNA por bissulfito de sódio e construção da biblioteca para sequenciamento

Com o objetivo de diferenciar posteriormente citosinas metiladas e não metiladas, foi realizada a conversão do DNA por bissulfito de sódio, com a utilização do kit *EZ DNA Methylation-Gold* (*Zymo Research*), segundo recomendações do fabricante.

Seguiu-se para a construção das bibliotecas para sequenciamento utilizando o kit *Accel-NGS® Methyl-Seq DNA Library* (*Swift Biosciences™*), mediante orientações do fabricante. Fez-se a escolha por esse kit de biblioteca, uma vez que ele apresentou o melhor rendimento, bem como a melhor performance no sequenciamento, quando comparado aos demais kits para a mesma finalidade (35). Verificou-se a concentração das amostras por PCR quantitativa (*polymarese chain reaction* - qPCR) e a validação das bibliotecas foi realizada segundo o protocolo do *Agilent TapeStation System* (*Agilent*). As concentrações das bibliotecas, bem como o tamanho dos fragmentos sequenciados, estão sumarizadas na Tabela 3.

O sequenciamento WGBS foi realizado na plataforma *NovaSeq600*, da *Illumina*, segundo orientações do fabricante.

3.3 Análise dos dados obtidos com o WGBS

A análise dos dados obtidos com o WGBS foi dividida em 4 etapas: identificação e chamada das CpGs (Etapa 1); organização das CpGs e estatística (Etapa 2); identificação das regiões diferencialmente metiladas (DMRs) (Etapa 3); anotação das DMRs, bem como dos genes presentes nessas regiões (Etapa 4).

a. Etapa 1: Identificação e chamadas das CpGs

I. Trimagem: essa etapa consistiu na retirada de adaptadores colocados durante a preparação experimental da biblioteca, ficando somente o nosso inserto de DNA de interesse;

II. Alinhamentos dos dados brutos ao genoma de referência: para este procedimento, utilizou-se o algoritmo *Bismark* (36) que, com o auxílio do alinhador *Bowtie 2*, realizou o alinhamento das *reads* do sequenciamento ao genoma referência. Este algoritmo é específico para análise de metilação por conversão de bissulfito de sódio. O genoma de referência utilizado foi o GRCh38 (*Genome Reference Consortium Human Genome* – montagem 38). Na Tabela 4 encontra-se as porcentagens de alinhamento de cada amostra;

III. Deduplicação: esta etapa promoveu a remoção de *reads* que apresentaram alinhamento ambíguo ou que não se alinharam em nenhuma região. A deduplicação é importante, pois é um filtro para retirar os ruídos provindos da reação de polimerização do sequenciamento, bem com *reads* que foram amplificadas com algum erro e que possam ser interpretadas erroneamente pelo alinhador. Na Tabela 4 encontra-se as porcentagens de *reads* deduplicados de cada amostra.

b. Etapa 2: Organização das CpGs e estatística

Para este estudo, foi realizada a análise do metiloma focando em citosinas em contexto CpG. Na Tabela 4 encontram-se os valores de coberturas médias de alinhamento das CpG para cada amostra.

I. Identificação das nuvens de metilação: a organização das CpGs que foram avaliadas iniciou-se com a identificação das nuvens, ou nuances, de metilação presentes ao longo do genoma. Para isso, utilizou-se o algoritmo *BSSeq* (*Biocondutor*) (37). O *BSSeq* apresenta em seu pipeline o *smooth*, que é o momento da análise aonde foram identificadas as nuvens de metilação. Para considerarmos uma grande porção do genoma uma região potencial que apresente uma nuvem de metilação, ela precisava apresentar no mínimo 70 CpGs, tamanho mínimo de 1kbp e uma distância mínima de 10⁸pb entre uma nuvem e outra;

II. Estatística: em seguida, fez-se o teste-t nas nuvens encontradas na etapa anterior. Os critérios de seleção da nuvem para a estatística foram: cobertura mínima das

CpGs de 5x e o mínimo de 3 réplicas biológicas por grupo (38).

c. Etapa 3: Identificação das regiões diferencialmente metiladas (DMRs)

A identificação das DMRs foi realizada com o algoritmo *dmrFinder*, inserido no pacote do *BSSeq*. Após identificadas as nuvens de metilação, buscamos as regiões diferencialmente metiladas (DMR), propriamente ditas. Para isso, os critérios de seleção foram: mínima quantia de 3 CpGs por DMR, mínima diferença de metilação entre as regiões comparadas de 10% (0,1), $p\text{-value} \leq 0,01$. Os valores de “quantia de CpGs” e “mínima diferença de metilação” foram baseados na sugestão dos elaboradores do pipeline, visando melhor aproveitamento das análises (39). Na Tabela 4 encontra-se as porcentagens de metilação observadas nas citosinas CpGs em cada amostra.

A anotação das DMRs foi realizada pelo *The Gviz (Bioconductor)* (40) e dos genes presentes nas regiões pelo *Biomart (Bioconductor)* (41). Uma vez finalizada as anotações para todas as regiões encontradas, realizamos a seleção das 20 principais regiões oriundas de cada comparação, a priori, totalizando 60 DMRs. Esta seleção se deu pela combinação de critérios:

- a) Número de CpGs presentes na DMR;
- b) Tamanho da DMR (pb);
- c) Estatística-t de cada CpG inserida na DMR.

Essa combinação foi realizada pelo *BSSeq*, que nos devolveu as DMR ordenadas, considerando densidade de CpGs - observado pelo número de CpGs em conjunto como pelo tamanho da DMR -, bem como a soma da significância estatística individual da CpG dentro da região. As informações detalhadas de cada DMR, dentre as 20 principais de cada comparação, estão na Tabela 8, em Anexos.

Uma vez elencadas as principais regiões, seguiu-se para a demonstração gráfica das janelas genômicas, aonde as DMRs de interesse estavam inseridas. Nesta demonstração, trouxemos as informações:

- I. Ilha CpG já catalogada em bandos de dados;
- II. Transcrito já catalogado no *Genome Browser* do *UCSC (University of California Santa Cruz)* (42);
- III. Nossa DMR de interesse, provinda do WBGS;
- IV. Oscilações das porcentagens de metilação presentes naquela região.

Após essa avaliação, fez-se a seleção dos genes com possível efeito fenotípico para validação da expressão, partindo da lista de genes colocalizados neste total de 60 regiões avaliadas (Tabela 9, em Anexos). Esta escolha foi baseada em dois critérios: relação já descrita na literatura com a epilepsia e/ou pela função gênica.

Com intuito de enriquecer a avaliação dos genes selecionados, realizamos uma análise inicial de redes *in silico*, por meio do bando de dados *HumanBase* (43), filtrando para redes gênicas encontradas em tecido hipocampal. Além disso, foi realizado uma verificação das funções dos genes no banco de dados *UniProt* (44), bem como da classificação dos processos biológicos no *Gene Ontology* (45).

3.4 Análise preliminar integrativa: união de metiloma com o RNA-Seq

Visando uma melhor compreensão do reflexo do metiloma no padrão da expressão gênica dos pacientes, realizamos uma análise integrativa inicial, na qual pareamos dois tipos de dados ômicos:

- a. Metilação do DNA ao longo de genoma provinda de hipocampo e giro denteado, por meio da técnica de WGBS, oriundo do trabalho aqui apresentado – análise a nível de transcrito;
- b. Expressão gênica provinda de amostras teciduais de giro denteado microdissecado de pacientes com ELTM associada à EH, por meio da técnica de sequenciamento do RNA mensageiro (mRNA) [RNA-Seq] – análise a nível de gene.

As comparações realizadas e a distribuição dos pacientes em dois tempos de doença foram mantidas em ambas análises, bem como os critérios de inclusão e exclusão na seleção das amostras.

Os dados de RNA-Seq são oriundos do trabalho de doutorado da aluna Amanda Morato do Canto do nosso grupo de pesquisa.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das amostras

Na Tabela 1 encontram-se as informações acerca da casuística avaliada: idade (anos), tempo de doença (anos), sexo, tipo de esclerose hipocampal, medicamentos e doses em uso durante o período da cirurgia, frequências de crises pré e pós-cirúrgicas. Os pacientes presentes na casuística deste trabalho fizeram uso de politerapia durante seu acompanhamento ambulatorial, sendo as drogas usadas no momento da cirurgia carbamazepina (CBZ), clobazam (CLB), ácido valpróico (VPA), clonazepam (CLN), lamotrigina (LTG), gabapentina (GBP) e oxcarbamazepina (OXC). Para classificar a resposta ao controle de crises pós-operatório, utilizou-se Escala Engel (*Engel Epilepsy Surgery Outcome Scale*), sendo ela apropriada para acompanhamento pós-cirúrgico de pacientes com epilepsia refratária (Tabela 7 – em anexo) (46).

A Tabela 2 contém a estatística realizada em nossa casuística, sendo as medianas das idades \pm desvio padrão foram $27 \pm 6,66$; $52,5 \pm 3,56$; $55,5 \pm 1,79$ para o Grupo 1, Grupo 2 e Controles, respectivamente. Em relação ao tempo de doença, as medianas foram $19 \pm 1,79$ e $45,5 \pm 3,67$, para os Grupos 1 e Grupo 2, respectivamente.

Tabela 1: Caracterização da casuística presente nesse projeto. Nesta tabela estão sumarizadas informações dos pacientes: de idade (em anos); tempo de doença (sigla TdD – em anos); sexo; tipo de esclerose hipocampal (EH) presente na histologia do tecido cerebral; medicamentos usados e suas dosagens (em mg) no período da cirurgia; frequência de crises pré e pós-cirurgia. Em relação ao grupo controle: idade (em anos) e sexo. Legenda: CBZ (carbamazepina); CLB (clobazam); VPA (ácido valpróico); CLN (clonazepam); LTG (lamotrigina); GBP (gabapentina); OXC (oxcarbamazepina); CPS (crises sem alteração da percepção); CPC (crises com perda da percepção).

Pacientes							
Grupo 1 (Pacientes com menos 20 anos de doença)							
ID	Idade (anos)	TdD (anos)	Sexo	Tipo de EH	Medicamentos (sigla / dosagem em mg)	Frequência de crises (por mês)	
						Pré-cirúrgica	Pós-cirúrgica
G214	26	19	F	1	CBZ 1000 / CLB 10	3 CPC	Engel IA
G143	27	15	M	1	CBZ 1000 / CLB 10 / VPA 1000 / CLN 3	3 CPC	Engel IA
G162	18	17	M	1	CBZ 1000 / CLB 20	1 CPC	Engel IA

G137	36	19	F	1	LTG 250 / CBZ 1200 / CLN 1	8 CPC	Engel IA
G144	31	19	M	1	CBZ 1200 / LTG 300 / CLB 40	8 CPC	Engel ID
Grupo 2 (Pacientes com mais 20 anos de doença)							
G138	52	45	F	1	CBZ 800 / CLB 40	12 CPS / 2 CPC	Engel IA
G163	53	46	M	Informação não disponível	CBZ 1200 / CLB 40	12 CPC	Engel IA
G244	54	44	M	2	VPA 1000 / CBZ 1000 / CLB 20	12 CPC	Engel IA
G232	60	46	M	1	VPA 750 / GBP 1200 / CLB 30	2 CPC	Engel IA
G190	50	38	F	1	CLB 20 / LTG 300 / VPA 1500	4 CPC	Engel IIA
G185	51	49	M	2	OXC 1800 / CLB 50	1 CPC	Informação não disponível
Grupo controle							
ID	Idade (anos)	TdD (anos)	Sexo	Tipo de EH	Medicamentos (dosagem em mg)	Frequência de crises (por mês)	
G177	55	---	F		---		
G181	66	---	F		---		
G183	54	---	M		---		
G180	56	---	F		---		

A estatística acerca da verificação da distribuição das variáveis "idade" apresentou $p\text{-value} > 0,05$, portanto, seguindo o teste de *Shapiro-Wilk*, elas apresentaram uma distribuição normal; já a variável "tempo de doença" do Grupo 1 apresentou $p\text{-value} < 0,05$, representando uma distribuição não normalizada. Mediante tais verificações, optou-se pelo *Teste-t de Student* para variável "idade" e o *Teste Wilcoxon* (correção *Benjamini-Hochberg*), para "tempo de doença" (Tabela 2).

Ao avaliar a variável "idade", verificamos diferenças significantes ($p < 0,05$) nas comparações "Grupo 1 versus Controle" ($p = 0,000153$) e "Grupo 1 versus Grupo 2" ($p = 0,000267$) (Figura 4). Em relação ao "tempo de doença", também se observou significância na comparação "Grupo 1 versus Grupo 2" ($p = 0,0074$) (Figura 5) (Tabela 2).

Ao mensurar a variável "sexo", em todas as comparações, foi observado que nossas amostras se encontraram homogêneas frente esta variável, uma vez que o *p-value* não foi significativo.

Tabela 2: Sumarização dos testes estatísticos aplicados às variáveis "idade", "tempo de doença" e "sexo". Nesta tabela encontram-se os *p-values* e os valores de χ^2 . Legenda: GL = graus de liberdade.

Teste de Shapiro-Wilk			
Variável "Idade"			
	G1	G2	Controle
<i>p-value</i>	0,9285	0,1713	0,05094
Variável "Tempo de doença"			
<i>p-value</i>	0,0495	0,2961	-----
Teste-t de Student			
Variável "Idade"			
	G1 x Controle	G2 x Controle	G1 x G2
<i>p-value</i>	0,0001533	0,223	0,000267
Teste Wilcoxon – Correção Benjamini- Hochberg			
Variável "Tempo de doença"			
<i>p-value</i>	-----	-----	0,0074
Teste χ^2 de Pearson			
Variável "Sexo"			
	GL	Valor de χ^2	<i>p-value</i>
G1 x Controle	1	1,1025	0,29
G2 x Controle		1,6667	0,19

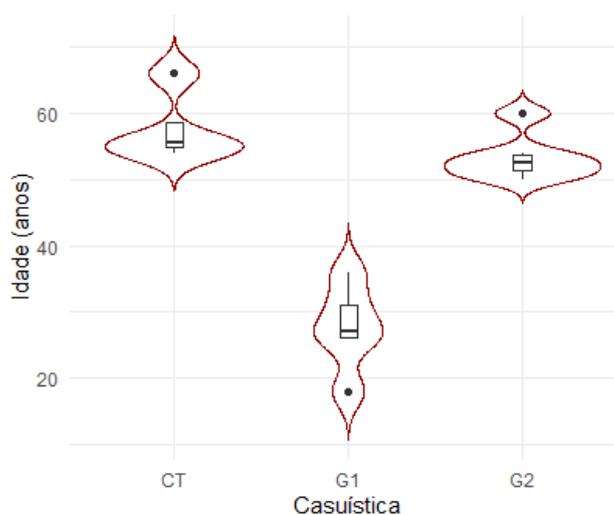


Figura 4: Representação gráfica da distribuição da variável "idade" de nossa casuística. No eixo x tem-se os grupos avaliados e no eixo y, a distribuição da idade em anos. Legenda: "CT" refere-se aos controles; "G1" aos pacientes do grupo 1; "G2", aos pacientes do grupo 2.

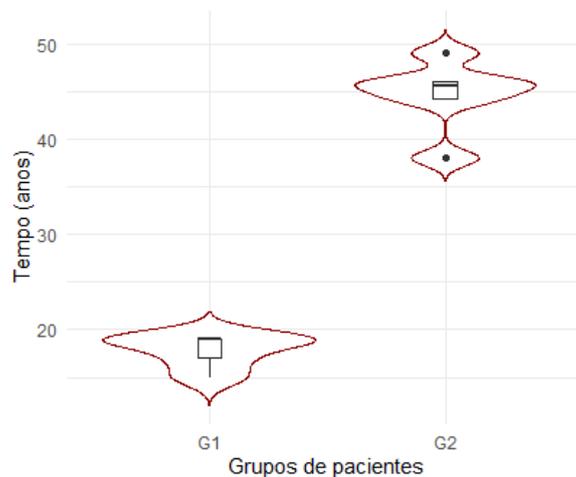


Figura 5: Representação gráfica da distribuição da variável "tempo de doença" de nossa casuística. No eixo x tem-se os grupos avaliados e no eixo y, a distribuição do tempo de doença em anos. Legenda: "G1" refere-se aos pacientes do grupo 1; "G2", aos pacientes do grupo 2.

4.2 Quantificação das bibliotecas e os parâmetros de qualidade do sequenciamento

As amostras de DNA genômico apresentaram a concentração, bem como a pureza, adequadas para a continuidade experimental (Figura 6). As bibliotecas sequenciadas seguiram um cenário semelhante, de modo a apresentar as concentrações necessárias, bem como o tamanho dos fragmentos inseridos no intervalo adequado (Tabela 3).

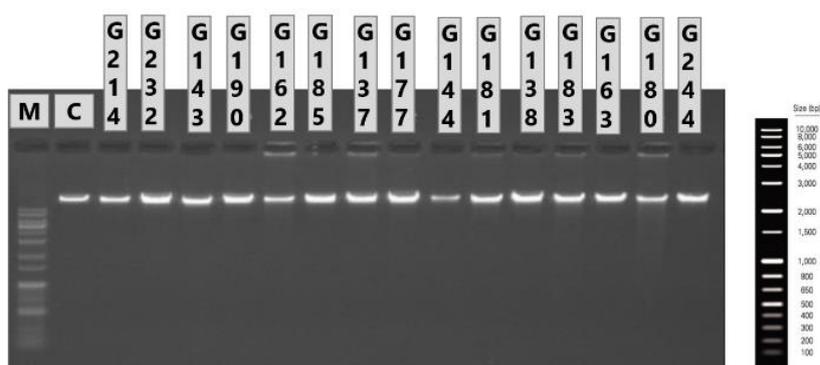


Figura 6: Gel de agarose 1% das amostras da Tabela 3.

Tabela 3: Concentrações dos DNAs genômicos (*gDNA*), bem como das bibliotecas para sequenciamento. Na última coluna, tem-se o tamanho dos fragmentos (*pb*) sequenciados. Legenda: "ID" – código de identificação da amostra.

	ID	Biblioteca			Fragmentos (pb)
		[]gDNA (ng/μL)	[] (ng/μL)	[] (nM)	
Grupo 1	G214	19,7	3,01	10	463
	G143	129	3,89	13	460
	G162	4,49	1,94	6,28	475
	G137	78	2,8	9,3	464
	G144	461	2,09	6,95	462
Grupo 2	G138	108	2,15	7,12	464
	G163	76,8	3,21	11,05	447
	G244	95,3	2,32	8,22	435
	G232	127	2,68	9,09	453
	G190	93,5	3,27	11,02	456
	G185	72	2,84	9,72	450
Controles	G177	123	2,69	9,52	448
	G181	73,4	2,64	9	460
	G183	114	2,62	9,14	441
	G180	47,2	6,46	23,68	420

Os dados do sequenciamento apresentaram taxa média de alinhamento de 77% e de deduplicação de 25,2%. A quantia média de *reads* por amostra sequenciada foi de 490 milhões, bem como a profundidade de cobertura média das CpGs foi de 7x. As portagens médias de conteúdo CG e de citosinas metiladas em CpGs foram 21,2% e 84%, respectivamente. A Tabela 4 sumariza os valores dos parâmetros para cada amostra analisada.

Tabela 4: Sumarização dos parâmetros de qualidade referentes a análise do WGBS. Legenda: "ID" – código de identificação da amostra; "%CG" – porcentagem do conteúdo GC; "%mCHG" – porcentagem de citosinas metiladas que estão no contexto CHG; "%mCHH" – porcentagem de citosinas metiladas que estão no contexto CHH; "%mCpG" porcentagem de citosinas metiladas que estão no contexto CpG.

ID	Alinhamento (%)	Deduplicação (%)	Quantidade de sequências (reads)	Cobertura das CpGs (x)	% GC	%mCHG	%mCHH	%mCpG
G214	77,9	24,9	494.870.063	7,16	21	1,2	1	84,5
G143	77,9	18,3	464.376.862	7,34	21	1,2	1,1	83,7
G162	73,5	33,3	508.092.554	6,44	22	1,6	1,3	84,2
G137	76,5	24,9	482.017.887	6,9	21	1,2	1	84,3
G144	73,2	31,4	453.744.315	5,82	22	1,5	1,3	85,3
G138	78,9	26,5	453.454.874	6,59	21	1,1	1	83,7
G163	76,2	23,1	480.940.561	7,08	22	1,5	1,4	84,7
G244	76,8	29,1	511.840.717	6,73	21	1,2	1,1	85,2
G232	76,2	23,2	504.060.677	7,4	21	1,3	1,3	84,5
G190	77,8	24,1	461.013.277	6,92	21	1,4	1,3	83,1
G185	76,2	29,3	507.345.782	6,77	21	1,1	1,2	84,7
G177	78,8	24,7	543.003.043	8,03	21	1,4	1,5	83,2
G181	80,1	23	546.209.539	8,31	21	1,1	1,2	82,7
G183	77,6	24	442.135.381	6,25	21	1,2	1,2	83,3
G180	77,9	18,5	505.332.671	8,09	21	1,2	1,2	83,4

4.3 DMRs - Visão Geral

Obtivemos um total de 3772 DMRs. Dentro da comparação "Pacientes *versus* Controles" de nossa casuística, encontramos um total de 3028 DMRs, sendo que 2375 (78%) delas apresentaram-se hipermetiladas nos pacientes, quando comparadas aos indivíduos controle. O mesmo cenário foi observado no "Grupo 1 *versus* Grupo 2": 744 DMRs totais, sendo 461 (62%) regiões hipermetiladas (Tabela 5 e Figura 7).

Tabela 5: Sumarização do total de DMRs encontradas, bem como sua quantia absoluta de regiões "hipermetiladas" e "hipometiladas", em cada comparação realizada.

Comparação	Total encontradas	Hipermetiladas	Hipometiladas
Grupo 1 x Controle	1697	1353	344
Grupo 2 x Controle	1331	1022	309
Grupo 1 x Grupo 2	744	461	283

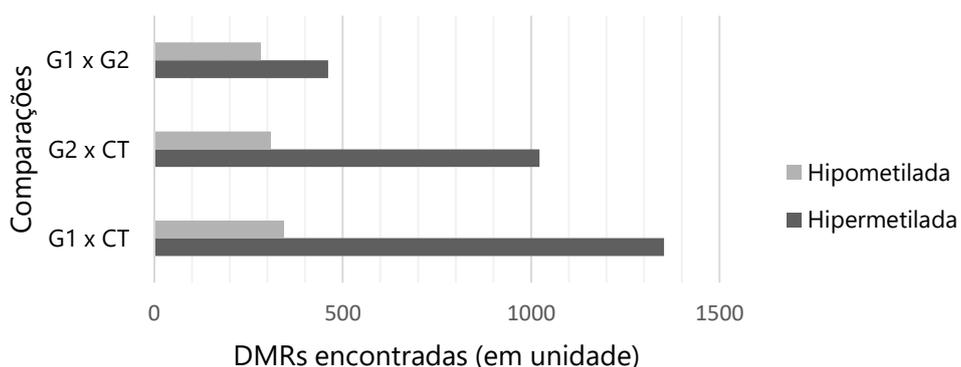


Figura 7: Representação esquemática da distribuição da quantia de DMRs encontradas em cada comparação. Legenda: "G1" refere-se ao grupo 1 de paciente; "G2", ao grupo 2 de paciente; "CT", aos indivíduos controles.

4.4 Seleção das DMRs

4.4.1 Principais DMRs – Grupo 1 de pacientes *versus* Controles

As 20 principais DMRs presentes nesta comparação foram provenientes de diferentes cromossomos (em anexo, na Tabela 8), com média de tamanho de 389pb e média de 43 CpGs por região. Todas as 20 DMRs apresentaram-se hipermetiladas nos pacientes (Figura 8).

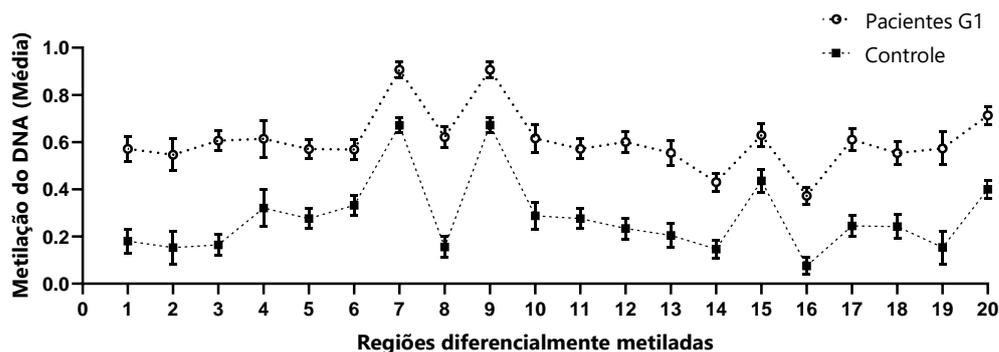


Figura 8: Representação das médias de metilação das 20 principais DMRs, na comparação “Grupo 1 versus Controle”. No eixo x, temos as DMRs, numeradas de 1 a 20; eixo y, as médias de metilação de cada DMR, em cada grupo avaliado.

4.4.2 Principais DMRs – Grupo 2 de pacientes versus Controles

As 20 principais DMRs presentes nesta comparação foram provenientes de diferentes cromossomos (em anexo, na Tabela 8), com média de tamanho de 313pb e média de 40 CpGs por região. De modo semelhante a comparação anterior, todas apresentaram-se hipermetiladas nos pacientes (Figura 9).

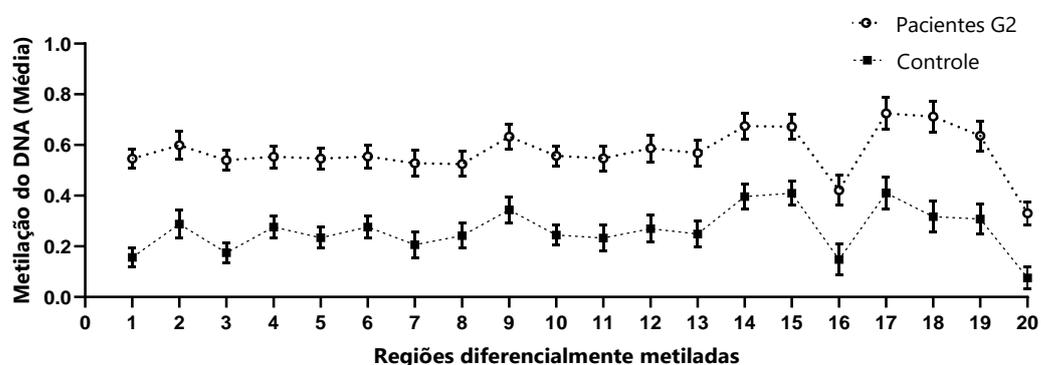


Figura 9: Representação das médias de metilação das 20 principais DMRs, na comparação “Grupo 2 versus Controle”. No eixo x temos as DMRs, numeradas de 1 a 20; eixo y, as médias de metilação de cada DMR, em cada grupo avaliado.

4.4.3 Principais DMRs – Grupo 1 de pacientes versus Grupo 2 de pacientes

As 20 principais DMRs presentes nesta comparação foram provenientes de diferentes cromossomos (em anexo, na Tabela 8), com média de tamanho de 430pb e média de 14 CpGs por região. Diferente das comparações anteriores, encontramos regiões hipermetiladas, bem como hipometiladas, dentre as DMRs selecionadas,

mostrando que a hipometilação pode ser relevante frente ao padrão da expressão gênica, quando avaliado os diferentes tempos de doença (Figura 10).

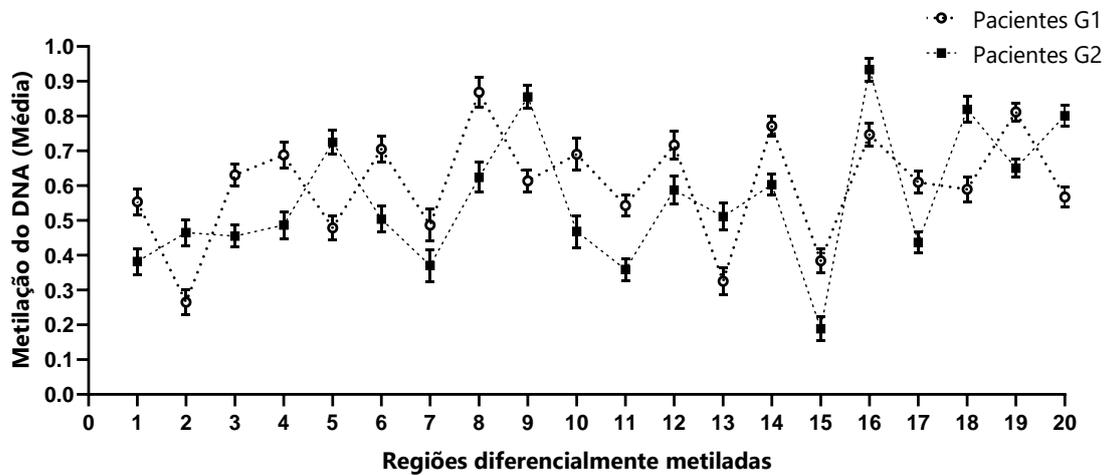


Figura 10: Representação das médias de metilação das 20 principais DMRs, na comparação "Grupo 1 versus Grupo 2". No eixo x temos as DMRs, numeradas de 1 a 20; eixo y, as médias de metilação de cada DMR, em cada grupo avaliado.

4.5 Seleção de genes candidatos para validação da expressão gênica futura

Ao total, foram encontrados 35 genes colocalizados as 60 DMRs avaliadas, dentre todas as comparações (anexo, Tabela 9). Existem genes em comum entre as comparações "Grupo 1 versus Controle" e "Grupo 2 versus Controle" (Figura 11).

Ao avaliarmos genes presentes na comparação "Grupo 1 versus Grupo 2", somente um gene desta lista está em comum com outra comparação, no caso "Grupo 1 versus Controle" (anexo, Tabela 9).

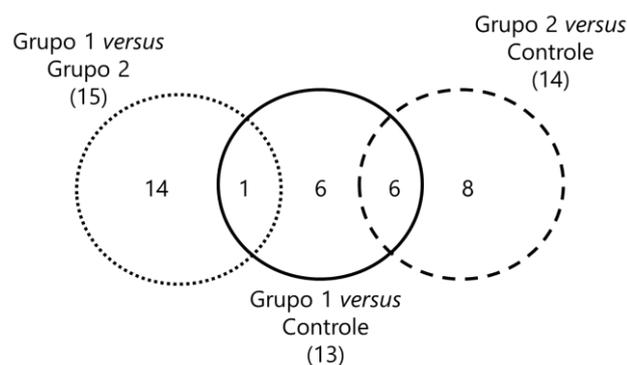


Figura 11: Diagrama de Venn dos genes provenientes das comparações "Grupo 1 versus Controle", "Grupo 2 versus Controle" e "Grupo 1 versus Grupo 2", bem como a quantia de genes em comuns a ambas.

A partir de agora, abordaremos os genes com possíveis associações a fisiopatologia da ELTM associada à EH para validação da expressão gênica posterior.

4.5.1 Gene *GRIN2D*

O gene *GRIN2D* (*glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D*) foi encontrado na comparação “Grupo 1 versus Controle”, na DMR de coordenada chr19: 48394875-48444931, na banda q13.33, com um transcrito catalogado. A Figura 12 é a representação gráfica na janela genômica avaliada. Para esse gene, a DMR está inserida majoritariamente em um exon do transcrito, com uma pequena porção intrônica, e hipermetilada nos pacientes do Grupo 1.

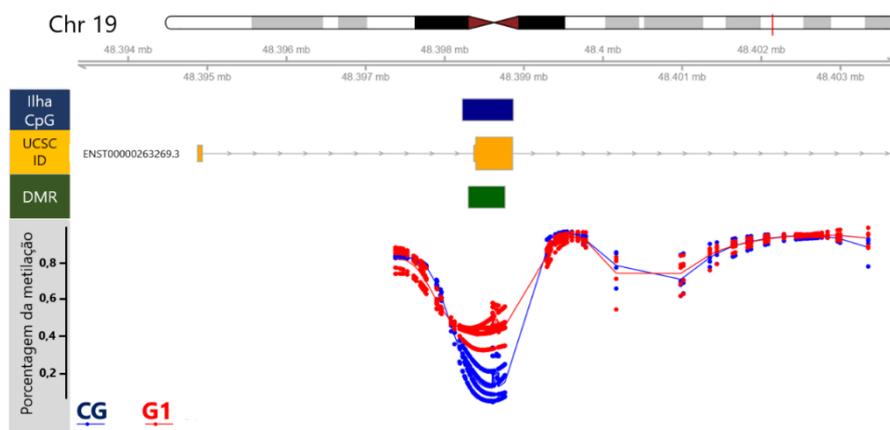


Figura 12: Representação gráfica da janela genômica a qual nossa DMR de interesse está inserida, mediante análise do gene *GRIN2D*. Em azul escuro, temos a ilha CpG já catalogada na literatura; em amarelo, o transcrito do gene catalogado no UCSC; em verde, a nossa DMR; abaixo, porcentagens de metilação. Legenda: indivíduos controle (CG) e pacientes do grupo 1 (G1).

4.5.2 Gene *FAM168B*

O gene *FAM168B* (*myelin-associated neurite-outgrowth inhibitor*) foi encontrado na intersecção “Grupo 1 versus Controle” e “Grupo 2 versus Controle”, na DMR de coordenada chr2: 131092952-131093587, na banda q21.1, com dois transcritos catalogados. Para o *FAM168B*, a DMR está inserida em diferentes regiões nos transcritos (promotor, éxon, intron) (Figura 13). Em ambos os grupos de pacientes, a DMR está hipermetilada, quando comparados aos controles.

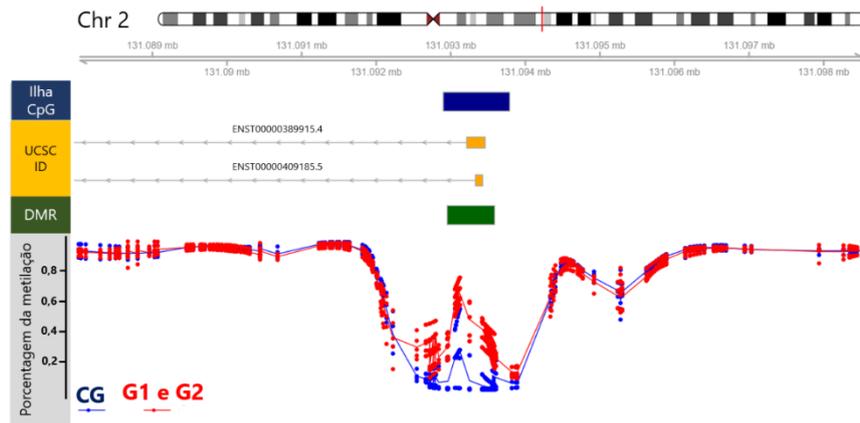


Figura 13: Representação gráfica da janela genômica a qual nossa DMR de interesse está inserida, mediante análise do gene *FAM168B*. Em azul, temos a ilha CpG já catalogada na literatura; em amarelo, o transcrito do gene; em verde, a nossa DMR; abaixo, porcentagens de metilação. Legenda: indivíduos controle (CG), pacientes do grupo 1 (G1) e pacientes do grupo 2 (G2).

4.5.3 Gene *GPR88*

O gene *GPR88* (*G protein-coupled receptor 88*) foi encontrado na comparação “Grupo 1 versus Grupo 2”, na DMR de coordenada chr1: 100539648-100539773, na banda q21.22, com um transcrito. Para esse gene, a DMR está inserida em um éxon do transcrito, apresentando um maior nível de metilação nos pacientes do Grupo 1 (Figura 14).

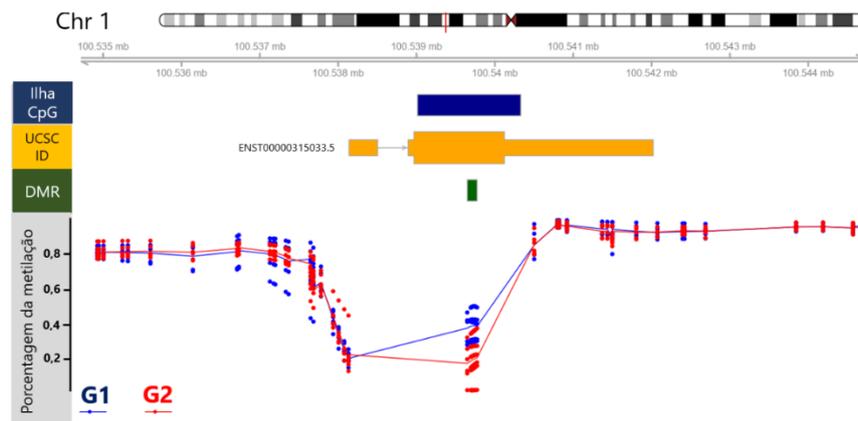


Figura 14: Representação gráfica da janela genômica a qual nossa DMR de interesse está inserida, mediante análise do gene *GPR88*. Em azul, temos a ilha CpG já catalogada na literatura; em amarelo, o transcrito do gene; em verde, a nossa DMR; abaixo, porcentagens de metilação. Legenda: pacientes do grupo 1 (G1) e pacientes do grupo 2 (G2).

4.5.4 Gene *PDCD7*

O *PDCD7* (*programmed cell death 7*) foi encontrado na comparação “Grupo 1 versus Grupo 2”, na DMR de coordenada chr15: 65123357-65133459, na banda q22.31, com dois transcritos. A DMR está inserida em lugares diferentes quando avaliamos os transcritos, separadamente (Figura 15). No transcrito ENST00000204549.9, a DMR está inserida no éxon; no ENST00000560313.2, em sua provável região promotora. Além disso, a DMR está mais metilada nos pacientes do Grupo 1. Este gene foi selecionado para avaliarmos se existe uma taxa de transcrição preferencial presente em cada tempo de doença.

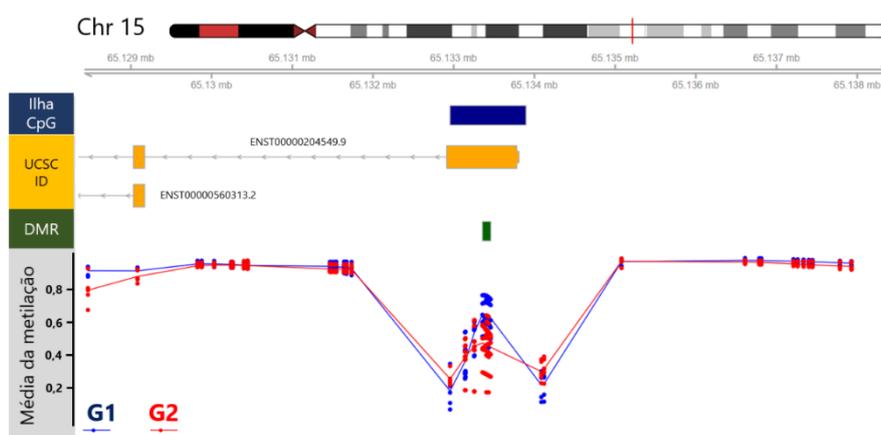


Figura 15: Representação gráfica da janela genômica a qual nossa DMR de interesse está inserida, mediante análise do gene *PDCD7*. Em azul, temos a ilha CpG já catalogada na literatura; em amarelo, o transcrito do gene; em verde, a nossa DMR; abaixo, porcentagens de metilação. Legenda: pacientes do grupo 1 (G1) e pacientes do grupo 2 (G2).

4.5.5 Análise de interação gênica *in silico*

Em nossa análise inicial de interação gênica *in silico*, observamos que, dentre nossos 4 genes selecionados, apenas dois interagem de modo direto – *FAM168B* e o *PDCD7* - por meio da co-expressão (Figura 16).

Notamos que mais genes foram encontrados nessa rede: *MAP2K7* (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7*), *KCND3* (*Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3*) e o *RGS11* (*Regulator Of G Protein Signaling 11*) (Figura 16). Os três genes

adicionais demonstraram considerável interação com nossos 4 genes iniciais, sendo essa interação de co-expressão, bem como atrelada a ação de fatores de transcrição.

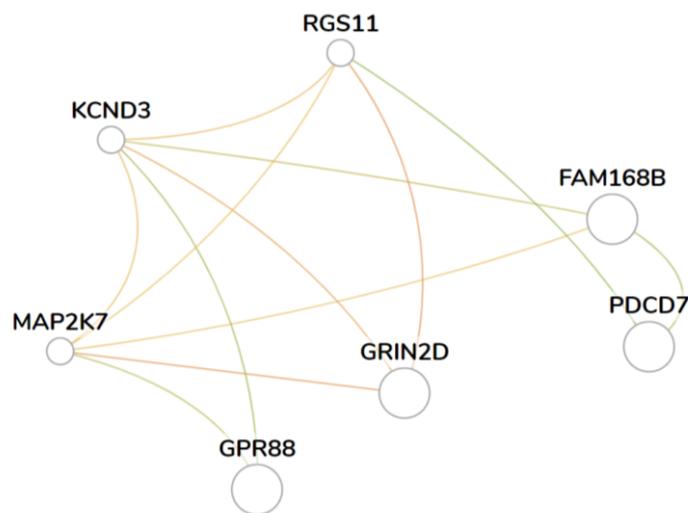


Figura 16: Rede de interação gênica, usando com base o bando de dados HumanBase e o filtro para “tecido hipocampal”.

4.6 Análise da integração entre diferentes ômicas

Em nossa análise inicial de integração ômica, os dados de metiloma foram correlacionados com os transcritos identificados pela técnica de sequenciamento de RNA (RNA-Seq). Os dados da RNA-seq foram analisados a nível de gene. A Tabela 6 sumariza as informações coletadas em ambas as abordagens, para cada gene candidato identificado dentro das DMRs, bem como para os genes oriundo da análise de rede.

O *GRIN2D* apresenta um padrão de expressão compatível com os resultados encontrados no metiloma. No RNA-Seq, observou-se uma redução da expressão no Grupo 1, quando comparado aos controles.

O *FAM168B* mostra-se com mesmo contexto do gene anterior. O RNA-Seq mostrou uma menor expressão em ambos os grupos de pacientes.

Segundo observado no metiloma, o *GPR88* apresentaria uma maior porcentagem de metilação no Grupo 1, quando comparado ao Grupo 2. No entanto, a verificação da expressão por RNA-Seq mostrou-se contrária e registrou uma maior expressão no Grupo 2.

Quanto ao gene *PDCD7*, encontramos no RNA-Seq uma menor expressão no Grupo 2, quando comparado ao Grupo 1, e quando correlacionamos com os dados do metiloma observamos que pode ter uma hiper- ou hipo-expressão, dependendo do transcrito analisado.

Os genes provindos da análise de rede, não foram encontrados na verificação das 60 DMRs realizadas no primeiro momento deste trabalho. No entanto, eles foram encontrados nos dados de RNA-Seq. O *MAPK7* apresentou uma maior expressão nas comparações "Pacientes *versus* Controle" e uma menor expressão no Grupo 2, quando comparado ao Grupo 1, mediante tempo de doença. No *KCND3* verificou-se uma maior expressão no Grupo 1, quando comparado aos Controles; uma redução na expressão no Grupo 2 em duas comparações – contra Controles e contra Grupo 1. O *RGS11* apresentou o padrão de expressão semelhante ao gene *KCND3*.

Tabela 6: Sumarização das observações a partir da integração inicial, bem como os resultados das diferentes ômicas, separadamente. Legenda: "meanDiff" é a diferença de metilação observada a partir da comparação realizada; "NA" representa que não há valor para célula em questão; "?" significa sugestão de expressão inconclusiva a partir da observação da localização da DMR; "G1" é grupo 1 de pacientes; "G2" é o grupo 2 de pacientes; "Cont" representa o grupo controle.

WGBS - hipocampo e giro denteado							RNA-Seq - Microdissecados (giro denteado)			Observado
Média de metilação da DMR				DMR Localização	Sugestão Expressão	log2FoldChange	p-value	Comparação		
Grupo 1	Grupo 2	Controle	meanDiff							
GRIN2D	0,43035264	NA	0,14662656	0,28372607	mais de 1	?	-0,3	0,93	G1 x Cont	Menor expressão em G1
FAM168B	0,37264517	NA	0,07567522	0,29696995	mais de 1	?	-1,31	0,21	G1 x Cont	Menor expressão nos pacientes
	NA	0,33077183	0,07567522	0,25509661			-1,17	0,27	G2 x Cont	
GPR88	0,38406178	0,18898548	NA	0,1950763	Exon	Maior em G1	0,734	0,84	G2 x G1	Maior expressão no G2
PDCD7	0,63099958	0,45536314	NA	0,17563645	Exon	Maior em G1	-0,908	0,61	G2 x G1	Menor expressão no G2
					Regulatória	?				
Genes encontrados na rede de interação gênica										
MAPK7							-0,066	0,94	G2 x G1	Menor expressão em G2
							0,65	0,84	G1 x Cont	Maior expressão nos pacientes
							0,59	0,85	G2 x Cont	
KCND3							-3,55	0,00759	G2 x G1	Menor expressão em G2
							2,19	0,0859	G1 x Cont	Maior expressão em G1
							-1,35	0,308	G2 x Cont	Menor expressão em G2
RGS11							-0,68	0,8	G2 x G1	Menor expressão em G2
							0,55	0,83	G1 x Cont	Maior expressão em G1
							-0,13	0,96	G2 x Cont	Menor expressão em G2

5. DISCUSSÃO

O eixo principal deste trabalho foi a investigação do padrão de metilação do DNA global em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal, os quais apresentam resistência ao tratamento medicamentoso, sendo encaminhados para cirurgia. O material biológico foi o DNA provindo do tecido cerebral candidato ao foco epiléptico. Esse espécime cirúrgico é uma rica fonte frente às possíveis modificações moleculares que podem estar relacionadas à fisiopatologia da ELTM associada à EH.

A epilepsia é um distúrbio multifatorial, sendo a metilação do DNA um dos possíveis fatores que pode contribuir frente aos mecanismos básicos, bem como na sugestão de possíveis novos alvos terapêuticos.

5.1 Metilação do DNA no tecido cerebral de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal

Nossa casuística é composta por dois grupos de pacientes com ELTM associada à EH e um grupo de tecidos controles provindos de autópsia. Existe uma extensa discussão a respeito de qual tecido se encaixaria como “controle” quando se avalia um aspecto genético que sofrer modificação mediante diversos fatores, como a epigenética. Neste contexto, optamos pela escolha dos tecidos oriundos de autópsias, uma vez que na literatura sabe-se que o padrão de metilação do DNA se mantém estável por até 72h após o óbito (47). A limitação encontrada frente a casuística se dá na diferença de idade entre o grupo de pacientes mais jovens e os controles (Tabela 1, Tabela 2 e Figura 4). No entanto, acreditamos que nossa análise é robusta, uma vez que priorizamos a qualidade do DNA, a profundidade do sequenciamento realizado (Tabela 4), os filtros e *p-values* aplicados na análise de bioinformática.

Ao buscar relacionar a metilação do DNA às epilepsias focais, tem-se a ELT como alvo de investigação (48). Em nossa casuística de ELTM associada à EH, encontramos 3772 DMRs (Tabela 5) pela técnica de WBGs, sendo que 75% está hipermetilada (Figura 7). Estudos que buscaram avaliar o metiloma em ELT, utilizando a técnica de *microarray* de metilação, também observaram um cenário semelhante, encontrando o enriquecimento da hipermetilação global em regiões promotoras (46, 47). O aumento da

metilação ao longo do genoma e de regiões promotoras já foi associado com aspectos histopatológicos, como a dispersão celular (51), presente no hipocampo e giro denteado com esclerose hipocampal. Genes da cascata de organização laminar das células granulares do giro denteado são responsáveis pelo crescimento de dentritos, bem como pelo desenvolvimento e maturação das sinapses. O maior nível da metilação do DNA nesta cascata leva a redução da expressão dos genes deste processo biológico, resultando na desorganização anatômica dos neurônios, bem como contribuindo para o aumento das crises e o desenvolvimento da ELT (16, 49).

Xiao e colaboradores, por meio de avaliação, validação da metilação em CpGs unitárias e algoritmos de aprendizado de máquina (*machine learning*), estabeleceram um modelo no qual, por meio de amostras de sangue periférico de pacientes com ELT resistentes e responsivos ao tratamento medicamentoso, buscou a correlação entre o estado de metilação e a predisposição à farmacoresistência. Os autores ressaltaram que o modelo ainda necessita de validações, porém sugeriram que a metilação do DNA tenha um papel importante nos mecanismos que possam resultar na resistência aos medicamentos, corroborando com a hipótese de Kobow e colaboradores (28, 50). Destacaram, ainda, que a metilação do DNA possa agregar a triagem clínica, uma vez que poderia ser adotada em medicina de precisão (32).

5.1.1 A metilação do DNA na comparação “Pacientes *versus* Controle”

Poucos estudos remetem a análise da metilação global em pacientes com ELTM, especificamente. Long e colaboradores, ao analisarem o metiloma no sangue periférico de pacientes com ELTM pela técnica *microarray*, encontraram 216 sítios CpGs com metilação diferencial, sendo que 164 deles estavam hipermetilados e 52, hipometilados. Dentre as CpGs com aumento da metilação, 39% foi observada em corpo gênico; já as CpGs hipometiladas, 68% foram localizadas em regiões promotoras. Além disso, ao realizarem a análise de vias e alterações na expressão gênica, eles sugeriram que as diferenças no padrão de metilação encontradas parecem estar relacionadas com a duração da doença, resistência as drogas anticonvulsivantes, bem como com as alterações de esclerose hipocampal observadas na ressonância magnética (33).

Dentro da comparação “Pacientes *versus* Controles” de nossa casuística, também foi encontrado a predominância da hipermetilação, corroborando com o observado na literatura. Em um primeiro momento, fez-se a avaliação mais detalhada das 40 principais DMRs, sendo 20 provindas do “Grupo 1 *versus* Controle” e outras 20, do “Grupo 2 *versus* Controle”. Em todas as 40 DMRs, observamos um hipermetilação nos pacientes (Figura 8 e Figura 9).

O diferencial de nossos resultados está na abrangência de CpGs e localizações avaliadas, uma vez que utilizamos o sequenciamento total do genoma (WBGs). Com isso, esperamos encontrar mais DMRs interessantes frente a regulação da expressão, como *enhancers* e sítios de fatores de transcrição, bem como continuar a busca pela melhor compreensão da resposta biológica da metilação do DNA em posições intergênicas e intrônicas.

5.1.2 A metilação do DNA frente à variação no tempo de doença

Não se tem registro na literatura a respeito da avaliação da metilação do DNA ao longo da progressão da ELTM associada à EH, mediante a variável “tempo de doença”. Ao separar os pacientes em dois grupos, temos como característica histopatológica a possível diferença na intensidade frente a reorganização neuronal, bem como frente a perda celular observada no espécime cirúrgico. Além disso, com os dois grupos de pacientes, acreditamos na possibilidade da observação de uma diferença no padrão do metiloma relacionado a possível progressão da lesão cerebral – a EH (16). Portanto, sugerimos que haja evolução agravante nas características histopatológicas em pacientes com maior tempo de doença, uma vez que eles ficaram expostos a maior recorrência de crises, bem como as mudanças frente a administração medicamentosa.

O estudo de Miller-Delaney e colaboradores não realizou uma divisão frente ao tempo de doença ou as idades dos pacientes, porém avaliou a metilação do DNA em duas complexidades diferentes, mediante a esclerose hipocampal. Neste trabalho, os autores buscaram diferenças na metilação do DNA em dois tipos de esclerose hipocampal na ELT: uma menos intensa (sem morte celular ou com um teor de gliose de 10%) e outra mais grave (com gliose e uma porcentagem de morte celular acima de 50% em segmentos do CA1 e CA3/CA4, espalhando para CA2). Foi observada uma mudança

no padrão de metilação do DNA quando comparado os tipos de esclerose, bem como nas vias biológicas encontradas. Na esclerose mais leve, notou-se uma metilação diferencial em genes de vias atreladas a adaptação anatômica, de modo a sugerir uma possível modelagem frente aos efeitos das crises. Já na forma mais grave, observou-se o aumento da metilação em genes relacionados ao processo de morte celular, genes esses não observados na esclerose mais leve. De modo adicional, constataram, além da prevalência da hipermetilação global, genes e regiões com hipometilação (49).

Em nosso trabalho, em contraste com a avaliação "Pacientes *versus* Controle", dentre as 20 primeiras regiões avaliadas mediante o tempo de doença, também foram encontradas regiões com redução no teor de metilação (Figura 7, Figura 10).

Com nossos resultados, notamos que é possível existir uma sugestão a respeito da modificação da metilação ao longo do tempo, podendo estar relacionada a diversos fatores, tais como a progressão da lesão ou ao efeito do uso crônico de drogas anticonvulsivantes. Pohlmann-Eden e colaboradores, em 2004, por meio de um estudo de caso, avaliaram a progressão da desorganização do hipocampo de um paciente com ELT ao longo de 16 semanas. Neste relato de caso, observou-se uma gradual redução no volume hipocampal por meio da verificação com ressonância magnética, além de confirmar os achados histopatológicos característicos da EH no hipocampo do mesmo paciente. Com isso, o estudo sugere a hipótese de que haja uma progressão da EH mediante prolongada atividade epiléptica (54). Caboclo e colaboradores, em 2012, reafirmaram essa hipótese por meio da verificação histopatológica do tecido cerebral *pós-mortem* de pacientes com ELT, bem como correlacionando com a evolução clínica dos pacientes. De modo adicional, neste estudo, os autores concluem que a reorganização sináptica presente no giro dentado pode ser um processo persistente nos pacientes (55).

Ácido valpróico é um dos medicamentos usados para controle da crise e que é sabidamente mediador de mecanismos epigenéticos, sendo conhecido por inibir enzimas responsáveis pelas modificações das histonas (histonas deacetilases - HDAC), bem como por promover a desmetilação do DNA (51). Assim, torna-se ainda mais interessante a avaliação da metilação do DNA, uma vez que ela, assim como Xio e colaboradores sugeriram, pode ser uma peça-chave no tratamento individualizado dos

pacientes com ELT, possivelmente, extrapolando também para os com ELTM associada à EH, quando nos referimos a farmacoresistência característica da doença.

5.2 Genes candidatos identificados

A partir da avaliação das 60 DMRs selecionadas, buscamos por genes presentes nestas regiões que possam contribuir na compreensão molecular dos processos biológicos presentes na ELTM associada à EH. Como representado no diagrama de Venn (Figura 11) e na Tabela 9, em anexo, existem genes que estão presentes nas comparações em isolado, bem como na intersecção.

O gene *GRIN2D* (*glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D*) tem sua função associada ao desenvolvimento neuronal, bem como aprendizado e memória. Ele já foi relacionado com a epilepsia da infância e variantes nesse gene foram vistas em pacientes com epilepsia, que apresentam resistência ao tratamento medicamentoso (56). A DMR de interesse foi observada majoritariamente em um exon, com pequena parte em região intrônica, e o maior nível de metilação encontrado em pacientes do com menos de 20 anos de doença, quando comparados aos controles (Figura 12). Suas funções estão relacionadas à regulação da plasticidade sináptica (GO:0048167), modulação da transmissão sináptica química (GO: 0050804), potencial excitatório pós-sináptico (GO:0060079) e transmissão sináptica química excitatória (GO:0098976).

O gene *FAM168B* (*myelin-associated neurite-outgrowth inhibitor*) tem sua função associada à morfologia celular, bem como a função neuronal. Acredita-se que ele possa estar relacionado com as epilepsias, mediante um estudo de associação (57). Estudos em modelos animais revelam que sua função está atrelada às fibras axonais (GO:0030424), exercendo uma ação inibitória do seu crescimento. Além disso, sua expressão se dá, preferencialmente, em corpo neuronal e fibras axonais (58). Nossa DMR de interesse localiza-se no éxon de dois transcritos deste gene, bem como em regiões regulatórias (Figura 13). O *FAM168B* é um gene comum aos dois grupos de pacientes frente a comparação com os controles, encontrando-se com maior porcentagem de metilação nos pacientes.

O *GPR88* (*G protein-coupled receptor 88*) tem sua função associada à conectividade neuronal do hipocampo e da amígdala. Genes da família GPR foram

relacionados à homeostase do Zn^{2+} , que é um importante modulador da neurogênese hipocampal pós-crise em modelos animais (59). Além disso, os genes *GRP37* e *GPR39* foram encontrados alterados em modelos animais de epilepsia (59,60). Ele ainda não foi observado em estudos de ELTM associada à EH em pacientes. O *GPR88* tem relação com a transdução de sinal (GO:0007165) e com o potencial de ação neuronal (GO:0019228). Nossa DMR de interesse localiza-se no exon do transcrito e foi observada na comparação mediante o “tempo de doença”. O maior nível de metilação foi encontrado em pacientes com menor tempo de doença (Figura 14).

O *PDCD7* (*programmed cell death 7*) ainda não foi relacionado as epilepsias, porém sua função apresenta relevância frente ao fenótipo da ELTM associada à EH. Suas ações estão relacionadas ao processo de apoptose (GO:0006915) e *splicing* alternativo de RNA mensageiro (mRNA), via *spliciossomos* (GO:0000398). A DMR foi encontrada em dois locais, mediante a presença de dois transcritos: éxon e possível região regulatória (Figura 15). Este gene apresentou um aumento da metilação em pacientes com menos tempo de doença e foi observado na comparação mediante “tempo de doença”. A verificação da expressão deste gene é importante pois suas ações podem estar relacionadas ao aumento da morte neuronal, presente na EH, bem como relacionada às cascatas de regulação e maturação dos mRNAs.

A alteração no padrão de metilação nos pacientes apresentou uma prevalente hipermetilação, no entanto, quando realizamos a avaliação dos genes candidatos individualmente, bem como o contexto genômico em que eles se encontraram, não bastou apenas observar o aumento ou a redução da metilação do DNA, mas também qual seria possível resposta biológica relacionada a estes eventos (Tabela 6).

Notamos que, é possível esperar o aumento da expressão do gene *GPR88* nos pacientes do Grupo 1, uma vez que a DMR foi encontrada no corpo gênico e mostrou-se superior, quando comparada aos pacientes do Grupo 2. Já quando avaliamos o *PDCD7*, a sugestão de expressão diferencial não está tão evidente, pois foi observado um aumento no teor de metilação em pacientes com tempo de doença menor do que 20 anos, em comparação aos pacientes com tempo de doença superior. Além disso, para o *PDCD7*, encontramos mais de uma região na janela genômica avaliada. Se observarmos uma redução da expressão, poderemos sugerir que o transcrito mais abundante será o

que apresentou a DMR inserida em uma região regulatória; caso encontrarmos o contrário, a DMR prevalente será a localizada no corpo gênico. O *FAM168B* e o *GRIN2D* também apresentam uma sugestão de expressão diferencial inconclusiva e semelhante ao *PDCD7*, a partir da verificação da localização da DMR, uma vez que ela se encontra em mais de um local, em ambos os genes nas comparações “Pacientes versus Controle”.

Os quatro genes listados e descritos acima foram selecionados para etapa de validação da expressão gênica futura, uma vez que apresentam funções diretamente relacionadas ao processo epiléptico na ELTM associada à EH.

5.2.1 Análise de interação gênica *in silico*

Além dos quatro genes descritos acima, outros três apresentaram relevante interação (Figura 16), de modo a enriquecer a busca pelos genes que possam estar relacionados ao fenótipo: O *MAP2K7* (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7*) codifica uma proteína quinase relacionada a atividade catalítica atrelada aos processos energéticos (GO:0005524), bem como aos apoptóticos (GO:0006915); *KCND3* (*Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3*) codifica para uma subunidade de um canal de cálcio voltagem-dependente; o *RGS11* (*Regulator Of G Protein Signaling 11*) tem sua função relacionada a inibição da transdução de sinal (GO:0009968), mediante o aumento da atividade GTPase de uma proteína G (GO:0005096). Ao prosseguirmos com a anotação demais DMRs, acreditamos que o *MAP2K7*, *KCND3* e *RGS11* podem ser encontrados em nossa análise, entrando, portanto, em nossa lista de genes para a validação da expressão futura.

5.3 A complexidade molecular presente na epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal

Com este trabalho, pudemos observar a complexidade da avaliação da metilação do DNA, uma vez que localização genômica, bem como intensidade de metilação, podem ser fatores importantes na modulação da expressão gênica. Mesmo que de modo inicial, tivemos a oportunidade de enriquecer trabalho com a integração entre diferentes ômicas (Tabela 6) provindas de uma casuística com mesma desordem neurológica, mesmos critérios de inclusão e exclusão, e mesmas comparações realizadas.

Neste cenário, sugerimos que a metilação no DNA presente nas regiões intrônicas e regulatórias mostrou-se com uma maior significância biológica nos genes *GRIN2D*, *FAM168B*, *PCDC7* uma vez que se observou uma menor expressão gênica. A posição das DMRs de tais genes podem estar atreladas a elementos da regulação em *cis*, como sítios de ligação de fatores de transcrição e silenciadores. É sabido que determinados fatores de transcrição apresentam repulsa à sítios de ligação que apresentam uma metilação aberrante (61), e tal constatação pode ter íntima conexão com a menor expressão observado nesses genes. O gene *GPR88* apresentou resultados conflitantes mediante a integração da metilação do DNA e RNA-Seq.

Esta integração apresenta algumas limitações como i) as porções dos tecidos avaliados são diferentes, uma vez o metiloma partiu do hipocampo total e do giro denteado e o RNA-Seq é proveniente somente do giro denteado microdissecado, ii) o *p-value* do RNA-Seq mostra-se significativo somente em uma comparação do gene *KNCD7*, e iii) avaliamos a metilação do DNA a nível de transcrito e o RNA-Seq a nível de gene. No entanto, acreditamos que com as futuras validações de expressão gênica e das DMRs, bem como com o possível aumento da casuística, poderemos sanar algumas limitações, trazendo robustez e aprimorando a integração proposta.

De modo adicional, a análise de redes de interação gênica mostrou-se valorosa frente ao esclarecimento da possível relação entre os genes, bem como dos processos biológicos apresentados.

O metiloma humano se tornou uma relevante ferramenta frente ao desenvolvimento e caracterização molecular de doenças. O uso da tecnologia de sequenciamento de nova geração apresentou-se importante na descrição dos mecanismos regulatórios capazes de elucidar a genética da epileptogênese, bem como da resistência ao tratamento medicamentos, tão marcantes no fenótipo do paciente com ELTM associada à EH, além de reforçar a hipótese de que a EH pode ser um processo que apresente uma evolução - do ponto de vista molecular - com o passar o tempo de doença, podendo ser considerado um fator relevante ao prognóstico do paciente.

A maior dificuldade enfrentada durante o desenvolvimento deste trabalho foi acerca da padronização experimental do protocolo do WGBS. Iniciou-se com a abordagem de microdissecção do giro denteado, porém os kits comerciais específicos para *low imput* de DNA não apresentaram uma performance de modo esperado. Com

isso, optamos por trazer uma abordagem mais abrangente, do ponto de vista tecidual (hipocampo e giro denteado), possibilitando a realização de um WBSG segundo os padrões de qualidade exigidos. Ambas as abordagens escolhidas são de grande relevância, uma vez que o material biológico em questão é o tecido cerebral humano com potencial foco epilético, material este rico, do ponto de vista molecular, e de difícil obtenção, uma vez que, necessita-se de um centro médico especializado e de uma equipe capacitada.

6. CONCLUSÕES

Com este trabalho, avaliamos o padrão de metilação ao longo do genoma de tecido cerebral (hipocampo e giro denteado) de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal:

I. Encontramos uma diferença no padrão de metilação genômica (metiloma) nos pacientes com ELTM associada à EH, quando comparados aos controles;

II. Observamos também uma diferença no padrão de metilação do DNA dos pacientes, quando avaliamos diferentes tempos de doença;

III. Encontramos um total de 3.772 DMRs, de modo que observamos uma preponderante hipermetilação nos pacientes, quando comparados aos indivíduos controle; porém, na comparação levando em consideração a duração da doença (Grupo 1 *versus* Grupo 2) o padrão de metilação diferencial foi mais heterogêneo;

IV. Identificamos os genes *GRIN2D*, *GPR88*, *FAM168B* e *PDCD7* que apresentam função relacionada a fisiopatologia das epilepsias e que se localizam dentro das DMRs identificadas. Além desses, uma análise de interação gênica nos levou a identificar mais três genes candidatos *MAP2K7*, *KCND3* e *RGS11*.

7. REFERÊNCIAS

1. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet*. 2019 Feb 16;393(10172):689–701.
2. World Health Organization. Epilepsy [Internet]. [cited 2020 Mar 16]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
3. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE Classification of the Epilepsies Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology HHS Public Access. *Epilepsia*. 2017;58(4):512–21.
4. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475–82.
5. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017 Apr 1;58(4):522–30.
6. Fisher RS, Van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Vol. 46, *Epilepsia*. *Epilepsia*; 2005. p. 470–2.
7. Bergerid TC, Vigeland MD, Hjorthaug HS, Etholm L, Nome CG, Taubøll E, et al. Neuronal and glial DNA methylation and gene expression changes in early epileptogenesis. 2019 [cited 2020 Mar 17]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226575>
8. Hauser RM, Henshall DC, Lubin FD. The Epigenetics of Epilepsy and Its Progression. *Neuroscientist*. 2018 Apr 1;24(2):186–200.
9. Allone C, Lo Buono V, Corallo F, Pisani LR, Pollicino P, Bramanti P, et al. Neuroimaging and cognitive functions in temporal lobe epilepsy: A review of the literature. Vol. 381, *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier B.V.; 2017. p. 7–15.

10. Cendes F, Sakamoto AC, Spreafico R, Bingaman W, Becker AJ. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jan 9];3:21–37. Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00401-014-1292-0.pdf>
11. Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2013;54(7):1315–29.
12. Vivash L, Tostevin A, Liu DSH, Dalic L, Dedeurwaerdere S, Hicks RJ, et al. Changes in hippocampal GABAA/cBZR density during limbic epileptogenesis: Relationship to cell loss and mossy fibre sprouting. *Neurobiol Dis*. 2011 Feb;41(2):227–36.
13. Christopher D Whelan et al. Structural Brain Abnormalities in the Common Epilepsies Assessed in a Worldwide ENIGMA Study - PubMed. *Brain*. 2018;141((2)):391–408.
14. Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, Antel SB, Andermann F, Arnold DL. Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: A volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. *Brain*. 2003 Feb 1;126(2):462–9.
15. Cendes F, Leproux F, Melanson D, Ethier R, Evans A, Peters T, et al. Mri of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *J Comput Assist Tomogr* [Internet]. 1993 [cited 2020 Aug 8];17(2):206–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8454746/>
16. Coan AC, Cendes F. Epilepsy as progressive disorders: What is the evidence that can guide our clinical decisions and how can neuroimaging help? [Internet]. Vol. 26, *Epilepsy and Behavior*. *Epilepsy Behav*; 2013 [cited 2020 Aug 8]. p. 313–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23127969/>
17. Waddington CH. The Epigenotype. 1942 [Internet]. *Int J Epidemiol*. 2012 [cited 2020 Mar 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22186258/>
18. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. Vol. 17,

- Nature Reviews Genetics. Nature Publishing Group; 2016. p. 487–500.
19. Younus I, Reddy DS. Epigenetic interventions for epileptogenesis: A new frontier for curing epilepsy. Vol. 177, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc.; 2017. p. 108–22.
 20. Kobow K, Blümcke I. Epigenetics in epilepsy. Vol. 667, *Neuroscience Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. 40–6.
 21. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2013 [cited 2020 Feb 11]; Available from: www.neuropsychopharmacology.org
 22. Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. Vol. 8, *Genes*. MDPI AG; 2017. p. 2–20.
 23. Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*. 1985;40(1):91–9.
 24. Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, et al. Lineage-Specific Polycomb Targets and De Novo DNA Methylation Define Restriction and Potential of Neuronal Progenitors. *Mol Cell*. 2008 Jun 20;30(6):755–66.
 25. Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, et al. DNA Methylation of the First Exon Is Tightly Linked to Transcriptional Silencing. Papavasiliou N, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan 18 [cited 2020 Mar 18];6(1):e14524. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0014524>
 26. Kurdyukov S, Bullock M. DNA methylation analysis: Choosing the right method. Vol. 5, *Biology*. MDPI AG; 2016.
 27. Mccarthy MM, Rissman EF. Epigenetics of Reproduction. 2015 [cited 2020 Feb 11]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00052-1>
 28. Soto J, Rodriguez-Antolin C, Vallespín E, De Castro Carpeño J, Ibanez De Caceres I. The impact of next-generation sequencing on the DNA methylation-based translational cancer research [Internet]. Vol. 169, *Translational Research*. Mosby

- Inc.; 2016 [cited 2020 Mar 19]. p. 1-18.e1. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524415004077>
29. Zhang Y, Jeltsch A. The application of next generation sequencing in DNA methylation analysis [Internet]. Vol. 1, Genes. 2010 [cited 2020 Mar 19]. p. 85–101. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4425/1/1/85>
 30. Neidhart M. DNA Methylation – Introduction. In: DNA Methylation and Complex Human Disease. Elsevier; 2016. p. 1–8.
 31. Argentieri MA, Nagarajan S, Seddighzadeh B, Baccarelli AA, Shields AE. Systematic Review Epigenetic Pathways in Human Disease: The Impact of DNA Methylation on Stress-Related Pathogenesis and Current Challenges in Biomarker Development. 2017 [cited 2020 Mar 18]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.044>
 32. Xiao W, Liu C, Zhong K, Ning S, Hou R, Deng N, et al. CpG Methylation Signature Define Human Temporal Lobe Epilepsy and Predict Drug-Resistant. 2019.
 33. Long HY, Feng L, Kang J, Luo ZH, Xiao WB, Long LL, et al. Blood DNA methylation pattern is altered in mesial temporal lobe epilepsy. Sci Rep [Internet]. 2017;7:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep43810>
 34. Mamiatis T, Fritsch EF, Sambrook J, Engel J. Molecular cloning - A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982, 545p. Acta Biotechnol [Internet]. 1985 Jan 1 [cited 2019 Jan 16];5(1):104–104. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/abio.370050118>
 35. Zhou L, Ng HK, Drautz-Moses DI, Schuster SC, Beck S, Kim C, et al. Systematic evaluation of library preparation methods and sequencing platforms for high-throughput whole genome bisulfite sequencing. [cited 2020 Feb 11]; Available from: www.nature.com/scientificreports
 36. Krueger F, Andrews SR. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. Bioinforma Appl NOTE [Internet]. 2011 [cited 2020 Feb 11];27(11):1571–2. Available from: www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/bismark/.

37. Hansen KD, Langmead B, Irizarry RA. BSmooth: from whole genome bisulfite sequencing reads to differentially methylated regions [Internet]. 2012 [cited 2020 Feb 11]. Available from: <http://rafalab.jhsph.edu/bsmooth>.
38. Ziller MJ, Hansen KD, Meissner A, Aryee MJ. Coverage recommendations for methylation analysis by whole-genome bisulfite sequencing. 2015 [cited 2020 Feb 11];12(3). Available from: <http://www>.
39. Daniel Hansen K. Analyzing WGBS with the bsseq package [Internet]. [cited 2020 Feb 11]. Available from: www.rafalab.org/bsmooth
40. Hahne F, Ivanek R. Visualizing genomic data using Gviz and bioconductor. In: Methods in Molecular Biology [Internet]. Humana Press Inc.; 2016 [cited 2020 Feb 11]. p. 335–51. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3578-9_16
41. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping Identifiers for the Integration of Genomic Datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. [cited 2020 Feb 11]; Available from: <http://www.r-project.org>
42. UCSC Genome Browser Gateway [Internet]. [cited 2020 Mar 19]. Available from: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>
43. HumanBase: data-driven predictions of gene function and interactions [Internet]. [cited 2020 Mar 21]. Available from: <https://hb.flatironinstitute.org/>
44. UniProt [Internet]. [cited 2020 Mar 25]. Available from: <https://www.uniprot.org/>
45. Gene Ontology Resource [Internet]. [cited 2020 Mar 25]. Available from: <http://geneontology.org/>
46. Wieser HG, Blume WT, Fish D, Goldensohn E, Hufnagel A, King D, et al. ILAE Commission Report Proposal for a New Classification of Outcome with Respect to Epileptic Seizures Following Epilepsy Surgery Commission on Neurosurgery of the International League Against Epilepsy (ILAE) 1997-2001.
47. Jarmasz JS, Stirton H, Davie JR, Del Bigio MR. DNA methylation and histone post-translational modification stability in post-mortem brain tissue. Clin Epigenetics.

- 2019 Jan 11;11(1).
48. Alexander Grote, Susanne Schoch AJB. Temporal Lobe Epilepsy: A Unique Window Into Living Human Brain Epigenetic Gene Regulation [Internet]. *Brain*. 2015 [cited 2020 Mar 23]. p. 138; 507–516. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25713401/>
 49. Miller-Delaney SFC, Bryan K, Das S, McKiernan RC, Bray IM, Reynolds JP, et al. Differential DNA methylation profiles of coding and non-coding genes define hippocampal sclerosis in human temporal lobe epilepsy. *Brain* [Internet]. 2015 Mar [cited 2020 Mar 23];138(Pt 3):616–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25552301>
 50. Xiao W, Cao Y, Long H, Luo Z, Li S, Deng N, et al. Genome-Wide DNA Methylation Patterns Analysis of Noncoding RNAs in Temporal Lobe Epilepsy Patients. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2017 Jan 5 [cited 2020 Mar 23];55(1):1–11. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-016-0353-x>
 51. Kobow K, Jeske I, Hildebrandt M, Hauke J, Hahnen E, Buslei R, et al. Increased reelin promoter methylation is associated with granule cell dispersion in human temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009 Apr;68(4):356–64.
 52. Kobow K, Blümcke I. The methylation hypothesis: Do epigenetic chromatin modifications play a role in epileptogenesis? *Epilepsia*. 2011 Jul;52(SUPPL. 4):15–9.
 53. Kobow K, El-Osta A, Blümcke I. The methylation hypothesis of pharmaco-resistance in epilepsy. *Epilepsia*. 2013 May;54:41–7.
 54. Pohlmann-Eden B, Gass A, Peters NA, Wennberg R. Evolution of MRI changes and development of bilateral hippocampal sclerosis during long lasting generalised status epilepticus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2004 [cited 2020 Apr 14];75:898–900. Available from: www.jnnp.com
 55. Caboclo LOSF, Neves RS, Jardim AP, Hamad APA, Centeno RS, Lancellotti CLP, et al. Surgical and postmortem pathology studies: contribution for the investigation of temporal lobe epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012 Dec;70(12):945–52.

56. Camp CR, Yuan H. GRIN2D/GluN2D NMDA receptor: Unique features and its contribution to pediatric developmental and epileptic encephalopathy. 2019 [cited 2020 Feb 11]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2019.12.007>
57. Dharmadhikari A V, Kang S-HL, Szafranski P, Person RE, Sampath S, Prakash SK, et al. Small rare recurrent deletions and reciprocal duplications in 2q21.1, including brain-specific ARHGEF4 and GPR148. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2012 [cited 2020 Feb 11];21(15):3345–55. Available from: <http://decipher.sanger.ac.uk>
58. Mishra M, Lee S, Lin MK, Yamashita T, Heese K. Characterizing the neurite outgrowth inhibitory effect of Mani. *FEBS Lett*. 2012 Sep 21;586(19):3018–23.
59. Alavi MS, Shamsizadeh A, Azhdari-Zarmehri H, Roohbakhsh A. Orphan G protein-coupled receptors: The role in CNS disorders. Vol. 98, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2018. p. 222–32.
60. Khan MZ, He L. Neuro-psychopharmacological perspective of Orphan receptors of Rhodopsin (class A) family of G protein-coupled receptors [Internet]. Vol. 234, *Psychopharmacology*. Springer Verlag; 2017 [cited 2020 Feb 11]. p. 1181–207. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-017-4586-9>
61. Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, et al. The Human Transcription Factors. Vol. 172, *Cell*. Cell Press; 2018. p. 650–65.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: BIORREPOSITÓRIO ESTUDOS DE GENÉTICA MOLECULAR EM DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS - FASE I.

Pesquisador: Iscia Teresinha Lopes Cendes

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 20

CAAE: 12112913.3.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.141.975

Apresentação do Projeto:

Solicitação de emenda ao projeto original.

Justificativa da Emenda:

Inclusão de novos membros na equipe de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Inalterado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inalterado

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Inclusão, na Plataforma Brasil (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1277595_E10.pdf 21/12/2018) de responsáveis por centros coparticipantes e novos alunos na equipe de pesquisa.

Responsáveis por centros coparticipantes:

- Profa. Dra. Katia Lin e Prof. Dr. Roger Walz do HU-UFSC, e
- Prof. Dr. Luiz Eduardo Betting da HCFMB-UNESP

Novos alunos :

- Amanda Morato do Canto,

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



Continuação do Parecer: 3.141.975

- Danielle do Carmo Ferreira da Silva,
- Danyella Barbosa Dogini,
- Estela Maria Bruxel,
- Fabiana dos Santos Oliveira,
- Jaqueline Cruz Geraldis,
- Maria Carolina Pedro Athié,
- Mariana Martin,
- Marina Coelho Gonsales,
- Murilo Guimarães Borges,
- Pedro Henrique Mello Magalhães,
- Vanessa Simão de Almeida,
- Welliton de Souza,
- Alexandre Barcia de Godoi e
- Douglas Cescon da Rosa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- carta_emenda_10.pdf 21/12/2018 : apresenta os nomes do novos incluído na Plataforma Brasil.
- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1277595_E10.pdf 21/12/2018 : justificativa da emenda.

Recomendações:

Solicitamos encaminhar, como NOTIFICAÇÃO, em formulário do CEP, relatório de acompanhamento do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o CEP –PRP – UNICAMP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o

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



Continuação do Parecer: 3.141.975

pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

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

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.

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

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

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

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_127759_5_E10.pdf	21/12/2018 16:28:16		Aceito
Outros	carta_emenda_10.pdf	21/12/2018 16:26:47	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Outros	carta_anuencia_HCFMB_UNESP.pdf	09/11/2018 10:24:07	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_HCFMB_UNESP.pdf	09/11/2018 10:23:25	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito

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



Continuação do Parecer: 3.141.975

Justificativa de Ausência	TCLE_HCFMB_UNESP.pdf	09/11/2018 10:23:25	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_biorrepositorio.pdf	09/11/2018 10:22:54	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_biorrepositorio_menores18.pdf	09/11/2018 10:22:36	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_biorrepositorio_maiores18.pdf	09/11/2018 10:22:20	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE711_8.pdf	09/10/2018 13:10:43	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE1217_8.pdf	09/10/2018 13:10:23	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_UFSC.pdf	09/10/2018 13:09:25	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Outros	regulamento_biorrepositorio.pdf	13/08/2018 15:49:58	Iscia Teresinha Lopes Cendes	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	21/02/2013 11:21:13		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 11 de Fevereiro de 2019

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

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

Anexo 2 – Tabela 7

Tabela 7: Escala de Engel para o acompanhamento da frequência de crises pós-operatória em pacientes com epilepsia refratária (Engel Epilepsy Surgery Outcome Scale) – Tabela adaptada de H. G. Wieser et al. 2001 (46).

Engel Epilepsy Surgery Outcome Scale	
Classe I: Livre de convulsões incapacitantes	
IA	Totalmente livre de convulsões desde a cirurgia
IB	Crises parciais simples não incapacitantes apenas a partir da cirurgia
IC	Algumas convulsões incapacitantes após a cirurgia, mas livres de convulsões incapacitantes por pelo menos 2 anos
ID	Convulsões generalizadas apenas com retirada da droga anticonvulsivante
Classe II: Convulsões raras e incapacitantes ("quase livre de convulsões")	
IIA	Inicialmente livre de convulsões incapacitantes, mas apresenta convulsões raras no período em que o paciente está sendo avaliado
IIB	Convulsões raras e incapacitantes desde a cirurgia
IIC	Mais do que raras convulsões incapacitantes após a cirurgia, porém raras convulsões por pelo menos 2 anos
IID	Convulsões noturnas apenas
Classe III: Melhoria relevantes	
IIIA	Redução considerável de convulsões
IIIB	Intervalos livres de crises prolongados totalizando mais da metade do período de acompanhamento, porém não menos que 2 anos
Classe IV: nenhuma melhoria relevante	
IVA	Redução significativa de convulsões
IVB	Nenhuma mudança significativa
IVC	Piora do quadro de crises

Anexo 3 – Tabela 8

Tabela 8: Sumarização das 20 principais DMRs de cada grupo, bem como informações sobre porcentagem de metilação de cada DMR, em cada grupo e a diferença de metilação entre os grupos.

	Coordenada genômica			DMR		Metilação			Estado
	Cromossomo	Início	Fim	Quantia de CpGs	Tamanho (pb)	Grupo 1 (%)	Controle (%)	Diferença (%)	
Grupo 1 versus Controle									
DMR1	4	184825405	184825891	57	487	0,571067562	0,180377939	0,390689623	Hiper
DMR2	1	16693258	16693780	62	523	0,545978844	0,152825514	0,39315333	Hiper
DMR3	7	140062599	140063084	21	486	0,606483226	0,164694383	0,441788843	Hiper
DMR4	2	127701691	127702170	77	480	0,614339052	0,320838432	0,29350062	Hiper
DMR5	6	143536878	143537150	41	273	0,570714665	0,276390761	0,294323904	Hiper
DMR6	7	157010153	157010447	47	295	0,568617499	0,332722014	0,235895485	Hiper
DMR7	5	178165431	178165960	41	530	0,906501742	0,670990872	0,23551087	Hiper
DMR8	7	140062636	140062898	39	263	0,621236859	0,156008221	0,465228638	Hiper
DMR9	5	178165656	178165985	39	330	0,906516111	0,67203758	0,234478532	Hiper
DMR10	7	140176972	140177170	39	199	0,615607049	0,28768996	0,327917088	Hiper
DMR11	6	143536886	143537094	40	209	0,571544957	0,276315772	0,295229185	Hiper
DMR12	4	56049037	56049254	38	218	0,60038106	0,233808028	0,366573032	Hiper
DMR13	15	25862814	25863224	52	411	0,554735209	0,204681877	0,350053333	Hiper
DMR14	19	48398297	48398761	66	465	0,430352639	0,146626564	0,283726074	Hiper
DMR15	22	46262779	46263240	38	462	0,629630539	0,435504475	0,194126064	Hiper
DMR16	2	131092952	131093587	39	636	0,372645172	0,075675221	0,296969951	Hiper
DMR17	4	56049038	56049232	23	195	0,61061305	0,244553564	0,366059487	Hiper
DMR18	1	38803866	38804294	33	429	0,553814574	0,242080423	0,311734151	Hiper
DMR19	1	16693375	16693645	38	271	0,573202237	0,153675425	0,419526812	Hiper
DMR20	19	52451238	52451854	36	617	0,713481953	0,399676949	0,313805004	Hiper

Cromossomo	Início	Fim	Quantia de CpGs	Tamanho (pb)	Grupo 2 (%)	Controle (%)	Diferença (%)	Estado	
Grupo 2 versus Controle									
DMR1	7	140062636	140062898	39	263	0,546394973	0,156008221	0,390386752	Hiper
DMR2	7	140176972	140177170	39	199	0,598443025	0,28768996	0,310753065	Hiper
DMR3	7	140062578	140062869	23	292	0,539249413	0,174937347	0,364312066	Hiper
DMR4	6	143536878	143537150	41	273	0,553557429	0,276390761	0,277166669	Hiper
DMR5	4	56049037	56049254	38	218	0,546436647	0,233808028	0,312628619	Hiper
DMR6	6	143536886	143537094	40	209	0,554522794	0,276315772	0,278207022	Hiper
DMR7	15	25862856	25863224	48	369	0,528152123	0,206488192	0,321663931	Hiper
DMR8	1	38803866	38804294	33	429	0,52444605	0,242080423	0,282365628	Hiper
DMR9	2	176130079	176130342	44	264	0,63277202	0,343463381	0,289308639	Hiper
DMR10	4	56049038	56049232	23	195	0,557498512	0,244553564	0,312944948	Hiper
DMR11	9	38424164	38424562	25	399	0,547255392	0,232668308	0,314587084	Hiper
DMR12	12	121466619	121466921	50	303	0,587366124	0,269899705	0,317466419	Hiper
DMR13	9	38424115	38424466	45	352	0,567870965	0,248924246	0,31894672	Hiper
DMR14	16	56425305	56425781	68	477	0,674416284	0,396141815	0,278274469	Hiper
DMR15	1	108560010	108560338	34	329	0,672042053	0,409441366	0,262600687	Hiper
DMR16	1	16693465	16693736	41	272	0,421548136	0,147967584	0,273580551	Hiper
DMR17	1	26994045	26994369	48	325	0,724196561	0,410070806	0,314125755	Hiper
DMR18	19	14073422	14073672	49	251	0,712096576	0,317085608	0,395010967	Hiper
DMR19	7	149497557	149497779	33	223	0,636149673	0,308286519	0,327863153	Hiper
DMR20	2	131092952	131093587	39	636	0,330771832	0,075675221	0,25509661	Hiper
Cromossomo	Início	Fim	Quantia de CpGs	Tamanho (pb)	Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)	Diferença (%)	Estado	
Grupo 1 versus Grupo 2									
DMR1	3	129003920	129004118	20	199	0,553471187	0,382050116	0,171421071	Hiper
DMR2	1	228212564	228212666	14	103	0,26521149	0,46546749	-0,200256	Hipo

DMR3	15	65133357	65133459	17	103	0,630999583	0,455363138	0,175636445	Hiper
DMR4	12	132710851	132710956	10	106	0,687883619	0,486875428	0,201008192	Hiper
DMR5	6	42704295	42704647	16	353	0,478860543	0,724496869	-0,24563633	Hipo
DMR6	8	19757134	19757317	21	184	0,705057727	0,503711345	0,201346382	Hiper
DMR7	9	76571498	76572241	3	744	0,48702592	0,370321537	0,116704383	Hiper
DMR8	16	54931062	54931188	21	127	0,868393587	0,623957686	0,244435901	Hiper
DMR9	2	129936134	129937103	11	970	0,613939159	0,855290704	-0,24135155	Hipo
DMR10	11	19712747	19712868	19	122	0,690025911	0,468332002	0,221693909	Hiper
DMR11	1	11926034	11926123	16	90	0,542665751	0,359195857	0,183469894	Hiper
DMR12	19	52451504	52451665	11	162	0,716874092	0,587232364	0,129641727	Hiper
DMR13	6	27213805	27213992	12	188	0,325041274	0,511274897	-0,18623362	Hipo
DMR14	9	10011964	10013295	7	1332	0,771546246	0,60307636	0,168469887	Hiper
DMR15	1	100539648	100539773	16	126	0,384061782	0,188985478	0,195076304	Hiper
DMR16	13	39509142	39510395	10	1254	0,746838552	0,933409645	-0,18657109	Hipo
DMR17	19	17448325	17448407	15	83	0,60986613	0,436542726	0,173323404	Hiper
DMR18	6	3029809	3030631	15	823	0,58983616	0,819217431	-0,22938127	Hipo
DMR19	16	11638942	11639955	12	1014	0,811495447	0,650243132	0,161252315	Hiper
DMR20	14	102972461	102972987	10	527	0,567372877	0,80125887	-0,23388599	Hipo

Anexo 4 – Tabela 9

Tabela 9: Genes relevantes para o mecanismo de epilepsia e que estão co-localizados nas 60 principais DMRs avaliadas.

Sigla	Nome do gene
Comum às comparações "Grupo 1 versus Controle" e "Grupo 2 versus Controle"	
PARP12	Poly(ADP-ribose) polymerase family member 12
CRACD	Capping Protein Inhibiting Regulator Of Actin Dynamics
ATP10A	ATPase phospholipid transporting 10A (putative)
FAM168B	Family with sequence similarity 168 member B
KDM7A	Lysine demethylase 7A
PHACTR2	Phosphatase and actin regulator 2
Comum às comparações "Grupo 1 versus Controle" e "Grupo 1 versus Grupo 2"	
ZNF534	Zinc finger protein 534
"Grupo 1 versus Controle"	
ACSL1	Acyl-CoA synthetase long chain family member 1
GRIN2D	Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D
PKDREJ	Polycystin family receptor for egg jelly
MNX1	Motor neuron and pancreas homeobox 1
WDR33	WD repeat domain 33
SFT2D3	SFT2 domain containing 3
"Grupo 2 versus Controle"	
HOXD8	Homeobox D8
IGFBPL1	Insulin like growth factor binding protein like 1
KDM2B	Lysine demethylase 2B
AMFR	Autocrine motility factor receptor
FAM102B	Family with sequence similarity 102 member B
TRNP1	TMF1-regulated nuclear protein 1
MISP3	MISP family member 3
ZNF746	Zinc finger protein 746
"Grupo 1 versus Grupo 2"	
EFCC1	EF-hand and coiled-coil domain containing 1
OBSCN	Obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF
PDCD7	Programmed cell death 7
PGAM5	PGAM family member 5, mitochondrial serine/threonine protein phosphatase
PRPH2	Peripherin 2
CSGALNACT1	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1
GCNT1	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2
IRX5	Iroquois homeobox 5

NAV2	Neuron navigator 2
PTPRD	Protein tyrosine phosphatase, receptor type D
GPR88	G protein-coupled receptor 88
LHFPL6	LHFPL tetraspan subfamily member 6
TMEM221	Transmembrane protein 221
CDC42BPB	CDC42 binding protein kinase beta
