

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Isabel Cristina Bandeira da Silva

Análise do perfil de metilação da região promotora dos genes *BDNF* e *SLC6A4* em
pacientes com epilepsia do lobo temporal

Porto Alegre, 16 de Setembro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Análise do perfil de metilação da região promotora dos genes *BDNF* e *SLC6A4* em
pacientes com epilepsia do lobo temporal

Isabel Cristina Bandeira da Silva

Orientador: Marino Muxfeldt Bianchin
Co-orientadora: Sandra Leistner-Segal

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de doutor

Porto Alegre, 16 de Setembro de 2015

Ficha catalográfica

Bandeira da Silva, Isabel Cristina

Análise do perfil de metilação da região promotora dos genes BDNF e SLC6A4 em pacientes com epilepsia do lobo temporal / Isabel Cristina Bandeira da Silva. -- 2015.

123 f.

Orientadora: Marino Muxfeldt Bianchin.

Coorientadora: Sandra Leistner Segal.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. BDNF. 2. SLC6A4. 3. Epilepsia. 4. Epigenética. 5. Metilação. I. Muxfeldt Bianchin, Marino, orient. II. Leistner Segal, Sandra, coorient. III. Título.

Banca Examinadora

Prof^a Dra Ida Vanessa Doederlein Scharz

Prof^a Dra Úrsula Silveira Matte

Prof^a Dra Maria Paz Loayza Hidalgo

Prof^o Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder

Dedicatória

Esta tese é dedicada à minha irmã Cristiane Bandeira da Silva, pelo apoio incondicional e por acreditar (mais do que eu) que sou capaz de alcançar meus objetivos.

Agradecimentos

Aos meus pais, Irma e Alflides, pelo apoio nessa difícil jornada e pelo crédito que depositaram na minha busca pelo sonho de fazer ciência, pelos ensinamentos e educação que me deram!

Aos meus irmãos, em especial a minha irmã Cristiane, por todo o suporte a mim designado desde sempre. À minha cunhada Sheila, por estar sempre disposta a ajudar (mesmo sem entender pra que tanta tabela!!).

À minha madrinha Zilda e minha tia Marlene, por seu carinho, apoio e dedicação, sem elas esse sonho não seria possível. Ao meu avô Odir Bandeira, que contribuiu imensamente na minha educação e me ensinou a ser honesta e leal sempre.

À minha co-orientadora Sandra Leistner Segal, agradeço pela confiança de todos esses anos, pela parceria e por contribuir tanto para o meu crescimento profissional.

Ao meu orientador Marino Muxfeldt Bianchin pelo suporte, paciência, apoio e toda a ajuda de sempre.

À minha grande amiga Raquel Santos de Almeida, por seu apoio, conselhos e por toda a força que me deu enquanto esteve ao meu lado, sua partida deixou um vazio irreparável, mas nosso sentimento de amizade ficará para sempre!

Aos meus amigos queridos Gabriel de Souza Macedo, Samuel Maynard Bernini, Elenice Rieger (e família), Giovano Welter e Daniela Pinheiro pela amizade e apoio de tantos anos.

Aos amigos do Centro de Pesquisas experimental, em especial a Everaldo Almeida e Roget Mendes, pelo trabalho impecável frente à secretaria do CPE, pelo carinho, apoio e amizade.

Aos meus queridos ICs, Ágata Mantese de Carvalho e Lucas Giombelli, pela grande ajuda durante toda a execução do projeto, foram “literalmente” meu braço direito, colaborando plenamente em todas as etapas do projeto! Obrigada pelo carinho e amizade!!

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial a minha grande amiga Aline Bochernitsan, pela amizade, carinho e grande ajuda.

Ao povo do nosso querido Laboratório BRAIN, em especial às minhas amigas Andressa Bortoluzzi e Soraia Poloni pela amizade incondicional, grandes parceiras de todas as horas.

As queridas amigas Isabel Werlang e Monique Hahn, que chegaram no final do caminho do doutorado, mas a ajuda e incentivo foram mais que fundamentais.

Ao pessoal do Laboratório de Medicina Genômica por toda ajuda, pela disponibilidade, pela grande força que me deram permitindo a realização dos meus experimentos de HRM. Agradeço especialmente a prof^a Dra Patrícia Ashton Prolla e à Mariana Fitarelli Kiehl, cuja ajuda permitiu o sucesso alcançado nos experimentos.

Um agradecimento especial à Tomoko Sekya, por todo apoio técnico referente a implementação da técnica de High Resolution Melting.

Ao Serviço de Neurologia do HCPA, em especial ao Prof. Luiz Nelson Teixeira Fernandes, que me permitiu “fazer parte” desse querido grupo, sempre me tratando com carinho e respeito. Sua amizade é um dos melhores acontecimentos desse período.

Ainda em relação ao Serviço de Neurologia, agradeço a Dra Carolina Torres e ao Dr José Augusto Bragatti por todo o suporte e ajuda, pela paciência em ensinar o que necessitava saber sobre Epilepsia. Aos doutores (e amigos) Renata Gomes Londero, Roberto Rossatto, Alessandro Finkelsztejn e Vitor Felix Torres por todo o apoio nos momentos difíceis dessa trajetória.

Um agradecimento especial ao setor de Neurofisiologia, em especial aos amigos Ana Louzada e Pablo Brea Winckler, que compartilharam comigo um pequeno (grande) espaço, que tornou muitos dias de trabalho consideravelmente mais leves e agradáveis! Muito obrigada pela amizade e apoio.

Aos queridos amigos (ainda da neuro) Thiago, Ana Paula (Musa), Raquel, Angélica, Julia e Carine por todo o consolo, apoio e risadas desse período!! As amigas Juliana Varela, Bianca Madeira, Kelin Martin e Ana Cláudia, pela parceria e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, em especial à Vera Suzana Vargas por toda a ajuda e esclarecimentos.

Ao Fundo de incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo patrocínio do projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado a mim concedida.

*“Não é preciso ter olhos abertos
para ver o sol,
nem é preciso ter ouvidos afiados
para ouvir o trovão.
Para ser vitorioso você precisa
ver o que não está visível”*

Sun Tzu

Resumo

Introdução: A epilepsia é uma doença caracterizada principalmente pela recorrência espontânea de crises não provocadas que podem ser desencadeadas por vários fatores. A relação entre epilepsia e comorbidades psiquiátricas é reconhecida há séculos, no entanto, o amplo espectro de comorbidades neuropsiquiátricas tem sido mais apropriadamente investigado ao longo dos últimos anos. É plausível pensar em mecanismos genéticos e epigenéticos que possam estar ligados ao desenvolvimento da epilepsia e/ou pelo menos aos transtornos psiquiátricos na epilepsia, uma vez que a associação entre algumas formas de epilepsia e comorbidades psiquiátricas são altamente prevalentes. BDNF é membro da família das neurotrofinas, sendo crucial nos sistemas neurotransmissores. Acredita-se que pode desempenhar um papel na patogênese e resposta a tratamentos em diferentes doenças neuropsiquiátricas. A serotonina tem influência sobre o equilíbrio inibitório/excitatório cortical e subcortical, participando em vários processos fisiológicos e patológicos do cérebro, fato que, acredita-se que pode estar relacionado a epileptogênese. A metilação é o mecanismo de mudança epigenética mais estudado e sua ocorrência na região promotora de um gene pode levar ao silenciamento das suas funções.

Objetivos: Avaliar o perfil de metilação da região promotora dos genes *BDNF* e *SLC6A4* em uma amostra de pacientes com diagnóstico de epilepsia do lobo temporal e um grupo controle, comparando esse perfil com características clínicas e psiquiátricas que podem estar associadas a doença.

Métodos: Foram analisados 172 pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT), selecionados no Ambulatório de Epilepsia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Nesta amostra, um total de 139 foram avaliados por entrevista estruturada de acordo com os critérios contemplados pelo DSM-IV. Primeiramente averiguou-se a relação entre o status de metilação dos promotores dos exons I e IV do gene *BDNF* e a possível correlação com ELT. Outra análise realizada buscou avaliar o perfil de metilação nos promotores dos genes *BDNF* e *SLC6A4* em pacientes com epilepsia do lobo temporal com ou sem comorbidades psiquiátricas associadas. A análise de metilação foi realizada pelo método de *High Resolution Melting* seguido por sequenciamento.

Resultados: Pacientes com epilepsia mostraram ter o promotor do éxon I do gene *BDNF* mais metilado enquanto que o éxon IV mostrou uma prevalência do perfil não metilado quando comparado aos controles. Não houve diferenças entre o status de

metilação e as características clínicas dos pacientes com epilepsia estudados. Com relação à segunda análise, o status metilado em relação aos promotores do gene *SLC6A4* e *BDNF* foi encontrado em 17 pacientes (12,2%) e o não metilado ocorreu em 122 pacientes (87,8%). Não houve diferenças estatísticas entre status de metilação dos promotores e as principais características do TLE. Não houve diferenças significativas em relação às comorbidades neuropsiquiátricas estudadas.

Conclusão: Observamos alterações seletivas na metilação do DNA em regiões promotoras do gene *BDNF*. Não houve diferenças significativas quanto ao padrão de metilação e as características clínicas dos pacientes com epilepsia. A contribuição da metilação seletiva em *BDNF* e *SLC6A4* para epileptogênese, características da epilepsia ou comorbidades psiquiátricas associadas à epilepsia precisa ser melhor explorada.

Palavras-chave: Epilepsia, *BDNF*, *SLC6A4*, Metilação

Abstract

Background: Epilepsy is a disorder primarily characterized by the spontaneous recurrence of unprovoked seizures that can be triggered by multiple factors. The relationship between epilepsy and psychiatry comorbidities has been recognized for centuries. However, the wide spectrum of neuropsychiatric comorbidities has been more precisely investigated over the past years. It is plausible to think that genetic and epigenetic mechanisms may be linked to the development of psychiatric disorders in epilepsy, since the association between some forms of epilepsy and psychiatric comorbidities are highly prevalent. *BDNF* is a member of the neurotrophin family, being crucial in neurotransmitter systems. It is believed that it may play a role in pathogenesis and treatment response in different neuropsychiatric disorders. Serotonin has an influence on the inhibitory / excitatory cortical and subcortical balance participating in various physiological and pathological processes in the brain, and it is believed that may be related to epileptogenesis. Methylation mechanism is the epigenetic change most studied and its occurrence in the promoter region of a gene can lead to the silencing of their functions.

Objectives: To evaluate the methylation profile of the promoter region of *BDNF* and *SLC6A4* genes in a sample of patients diagnosed with temporal lobe epilepsy and a

control group, comparing this profile with clinical and psychiatric characteristics that may be associated with disease.

Methods: A total of 172 patients with temporal lobe epilepsy (TLE) were analyzed, selected at the Epilepsy Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). In this sample, a total of 139 structured interview were evaluated according to the criteria contemplated by the DSM-IV. First analysis examined the relationship between the methylation status of the promoter of exons I and IV of the *BDNF* gene with TLE. Further analysis was sought to evaluate the methylation profile in the promoters of *BDNF* and *SLC6A4* genes in patients with temporal lobe epilepsy with or without psychiatric comorbidities associated. Analyses were performed by *High Resolution Melting* method followed by sequencing.

Results: Patients with epilepsy showed more methylated status in exon I promoter of *BDNF* gene and exon IV showed a prevalence of unmethylated profile when compared with controls. There were no differences between the methylation status and clinical characteristics of the patients with epilepsy. Regarding the second analysis, methylated status at the promoters of *SLC6A4* and *BDNF* genes was found in 17 patients (12.2%) and non-methylated status occurred in 122 patients (87.8%). There were no statistical differences between methylation status of the promoters and the main features of TLE or the presence of neuropsychiatric comorbidities.

Conclusion: It is believed that selective changes in DNA methylation in *BDNF* promoter regions may turn out to highlight the relation of epigenetic factors in epilepsy. The contribution of selective *BDNF* and *SLC6A4* methylation to epileptogenesis, epilepsy characteristics or psychiatric comorbidities in epilepsy needs to be further explored.

Keywords: Epilepsy, *BDNF*, *SLC6A4*, Methylation

Lista de Figuras

Figura 1.	
Estratégia de busca das referências bibliográficas	18
Figura 2.	
Média do número de pessoas com epilepsia por 1000 habitantes em Regiões da OMS e no mundo	25
Figura 3.	
Número de pessoas com epilepsia em 105 países pesquisados	25
Figura 4.	
Linha do tempo mostrando fatos importantes na história da epigenética	31
Figura 5.	
Mecanismo de metilação do DNA em uma ilha CpG	32
Figura 6.	
Epigenética e Epilepsia	35
Figura 7.	
Localização cromossômica e estrutura do gene <i>BDNF</i> humano	38
Figura 8.	
Representação esquemática do gene <i>SLC6A4</i>	43
Figura 9.	
Análise da curva fluorescente de <i>melting</i>	49

Lista de Tabelas

Tabela 1.

Classificação das epilepsias e síndromes epiléticas segundo a ILAE22

Tabela 2.

Nova proposta para organização de síndromes eletroclínicas e outras epilepsias..23

Tabela 3.

Alterações epigenéticas em doenças neuropsiquiátricas34

Tabela 4.

Estudos de modificações epigenéticas em epilepsia36

Lista de Siglas e Abreviaturas

5-C	5-Citosina
5-HMC	5-Hidroximetilcitosina
5-HT	Serotonina
5-HTT	Transportador de serotonina
5-HTTLPR	Polimorfismo da região promotora do gene transportador de serotonina
5-mC	5-Metilcitosina
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CpG	Região na sequência do DNA onde a Citosina é seguida por Guanina
DNMTs	DNA Metiltransferases
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders fourth edition</i>
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HEP	<i>Human Epigenome Project</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
L	Alelo longo do 5-HTTLPR
NNA	<i>Nearest Neighbor Analysis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
S	Alelo curto do 5-HTTLPR
SE	<i>Status epilepticus</i>
SLC6A4	<i>Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter)</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TET1	Metilcitosina deoxigenase
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i>
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
WHO	World Health Organization

Sumário

1. Introdução	17
2. Revisão da Literatura	19
2.1. Estratégias para localização e seleção das informações.....	19
3. Epilepsia: Presente, passado e futuro	21
3.1. Epidemiologia da Epilepsia.....	26
3.2. Comorbidades psiquiátricas na Epilepsia	28
4. Epigenética, Epilepsia e comorbidades.....	30
5. Gene <i>BDNF</i> : caracterização e importância nos estudos genéticos e epigéticos em Epilepsia.....	39
6. Gene <i>SLC6A4</i> , Epilepsia e Epigenética	42
7. Genes <i>BDNF</i> e <i>SLC6A4</i> e a Metilação do DNA	46
8. <i>High Resolution Melting</i> : ferramenta para a análise de metilação.....	49
9. Objetivos	52
9.1. Objetivo Principal.....	52
9.2. Objetivos Secundários	52
10. Referências Bibliográficas da Revisão	53
11. Artigos	81
11.1. Artigo 1	81
11.2. Artigo 2	97
12. Considerações Finais e Perspectivas	115
13. Anexos	116
13.1 Anexo 1.....	116
13.2. Anexo 2.....	119
13.3 Anexo 3.....	122

1. Introdução

A epilepsia pode ser definida conceitualmente como um distúrbio crônico do cérebro caracterizado por uma predisposição persistente em gerar crises epiléticas, alterações comportamentais súbitas que tendem a se repetir ao longo da vida do paciente. Essas crises refletem uma atividade elétrica anormal e paroxística, acometendo preferencialmente uma ou várias áreas do córtex cerebral e podem ser causadas por inúmeras patologias estruturais ou neuroquímicas (Palmini, 1998; Chang & Lowenstein, 2003, Fisher *et al.*, 2014).

Dentro do contexto da neurobiologia da epilepsia, a genética tem sido cada vez mais importante. A identificação de genes relacionados a causalidade em muitas epilepsias, sugere que variantes genéticas podem oferecer um novo paradigma para a etiologia das epilepsias (Thomas & Berkovic, 2014). Efeitos genéticos sobre fenótipos complexos tais como efeitos nos distúrbios clínicos apresentados pelos indivíduos portadores de epilepsia, podem ser resultado da ação de múltiplos genes que atuam em pontos diferentes no desenvolvimento, em associação com outros fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (Cole *et al.*, 2011).

Considerando-se aspectos genéticos, potencialmente, todos os genes podem ser expressos em todas as células. No entanto, as funções e regulação gênicas são moduladas por fatores genéticos e epigenéticos. Mecanismos epigenéticos permitem a adaptação do DNA genômico e das células ao ambiente. Aproximadamente 33% dos genes humanos, que codificam diferentes tipos de proteínas, são expressos no sistema nervoso. Alguns genes codificam enzimas, receptores e neurotransmissores, enquanto outros codificam proteínas responsáveis pela estrutura e formação do sistema nervoso. A expressão gênica é modulada pela expressão de outros genes, estrutura do DNA e ambiente (por exemplo, células e moléculas vizinhas) (Davies & Morris, 1997; Hartl & Jones, 2001; Hauser & Beal, 2015).

O sequenciamento do genoma humano foi seguido pelo Projeto Epigenoma Humano (*HEP*) que buscou desvendar o significado da metilação do DNA no controle de funções de genes especializados, entre outros mecanismos de igual importância. Evidências apontam que o controle primário está no DNA em nível de cromatina. A natureza das interações entre o DNA e as proteínas traz avanços no

campo da epigenética, e começa a elucidar problemas da atualidade, tais como a reprogramação do genoma que inicia os processos normais de desenvolvimento (Holliday, 2006). O objetivo do projeto epigenoma humano (*HEP*) foi gerar um mapa de alta resolução da metilação do genoma (Novik *et al.*, 2002; Rakyan *et al.*, 2004).

Alterações epigenéticas são mudanças hereditárias na expressão gênica que não envolvem uma alteração na seqüência do DNA. Dentro do núcleo, o DNA é “empacotado”, juntamente com proteínas histonas, em uma estrutura conhecida como cromatina. A interpretação da informação genética codificada no DNA é regulada por mecanismos que envolvem modificações estáveis e hereditárias do DNA e histonas. Essas modificações incluem metilação de DNA em dinucleotídeos CpG e acetilação, metilação e fosforilação de histonas. Mudanças nos padrões dessas modificações estão associadas com remodelação da cromatina e podem resultar em alterações na expressão gênica por meio de mecanismos que têm sido cada vez mais estudados e compreendidos (Lachner *et al.*, 2003). Os defeitos na metilação do DNA envolvem hipometilação global do genoma e hipermetilação de ilhas CpG específicas, ambas associadas com alterações na cromatina (Scarano *et al.*, 2005). O mecanismo de metilação do DNA é a alteração epigenética mais estudada, ocorrendo por meio da adição de um radical metil na base citosina adjacente à guanina. A metilação da região promotora de um gene pode levar ao silenciamento aberrante de suas funções (Bird, 2002; Moura Lima *et al.*, 2008).

A maioria das alterações epigenéticas é independente de alterações genéticas, mas podem ocorrer interações entre genes específicos, em vias de sinalização e dentro de domínios cromossômicos. O perfil epigenômico de metilação do DNA e modificação das histonas são alvos para terapias e com as novas tecnologias moleculares (Nagarajan & Costello, 2009), sendo assim, muito se poderá compreender sobre como a contribuição genética e epigenética afetam a suscetibilidade, desenvolvimento e o processo de manutenção da epilepsia (Qureshi & Mehler, 2010; Hwang *et al.*, 2013).

Sabe-se que a serotonina (5-HT) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) estão envolvidos em neuroplasticidade e neurogênese e são conhecidos por modular respostas ao estresse e mediar eficácia terapêutica de fármacos por meio da plasticidade neuronal e também dos mecanismos epigenéticos. BDNF é membro da família das neurotrofinas e desempenha um papel importante na plasticidade

neuronal no adulto. O sistema serotoninérgico é filogeneticamente mais antigo e tem implicações em muitas funções no sistema nervoso central, dentre elas está o controle do humor, sono, funções cognitivas, aprendizado, memória entre outros (Homberg *et al.*, 2014).

O presente estudo busca avaliar se há alguma diferença entre pacientes com epilepsia e controles em relação ao status de metilação dos genes *BDNF* e *SLC6A4*, bem como estudar as características clínicas e comorbidades associadas à epilepsia do lobo temporal. Até o momento não foram encontrados estudos na literatura que avaliassem especificamente essas relações.

2. Revisão da Literatura

2.1. Estratégias para localização e seleção das informações

Na revisão da literatura serão apresentados os principais aspectos relacionados à epilepsia, comorbidades psiquiátricas associadas e os genes *BDNF* e *SLC6A4*. A estratégia de busca envolveu as bases de dados *MEDLINE (PubMed)*, *LILACS-BIREME* e *SciELO*. Também foram consultados bancos de monografias, dissertações e teses de universidades brasileiras e estrangeiras, além de livros-texto.

Nos portais *Pubmed* e *SciELO* foram realizadas buscas utilizando as palavras-chave *Temporal lobe epilepsy*, *BDNF*, *SLC6A4*, *Psychiatric Comorbidities*, *Epigenetics* e *Methylation*, com combinações destes termos, conforme mostra a figura 1.

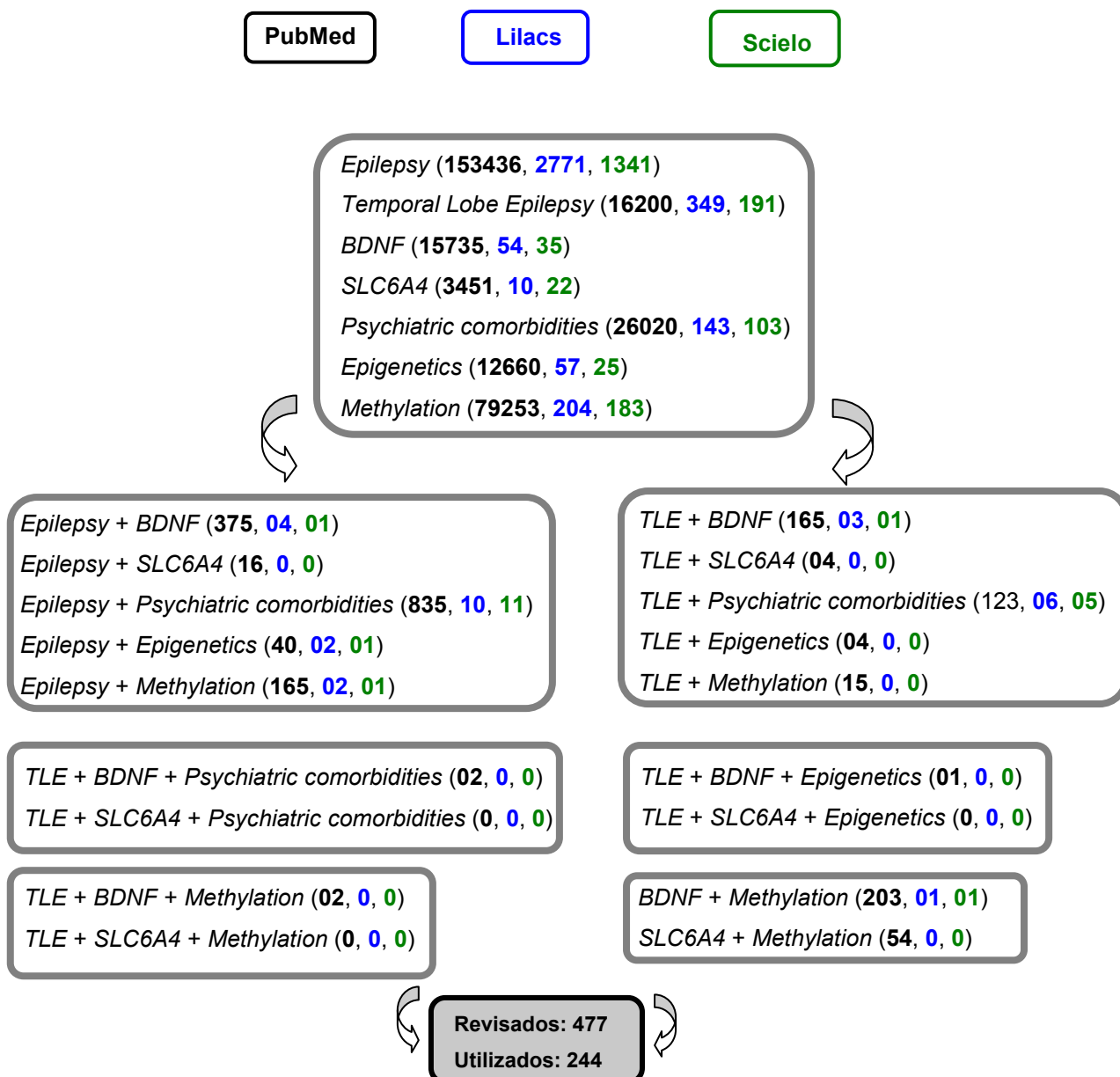


Figura 1: Estratégia de busca das referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos desse estudo. O resultado para cada busca de cada termo e suas combinações nas principais bases de dados está representado entre parênteses e em cores correspondentes. A caixa cinza mostra os artigos lidos e utilizados após seleção.

3. Epilepsia: Presente, passado e futuro

A epilepsia sempre chamou muito a atenção e gerou inúmeros debates ao longo dos anos e sua história é rodeada por crenças principalmente religiosas (Gomes, 2006). Este aspecto tornou a epilepsia uma doença altamente estigmatizante em muitas culturas, como as não ocidentais, onde foi associada ao pecado e a possessão por espíritos malignos. Além disso, acreditava-se que as crises seriam indício de feitiçaria e eram também consideradas contagiosas (Masia & Devinsky, 2000; Jacoby *et al.*, 2005, Ismail *et al.*, 2005).

Textos históricos que abrangem um período milenar descrevem “ataques” epiléticos em uma série de civilizações, incluindo o Egito, China, Índia e Babilônia. Hipócrates foi o primeiro a classificar a epilepsia como uma doença do cérebro e não como algo sobrenatural como se acreditava anteriormente (Goldensohn *et al.*, 1997). Em 400 a.C. ele relatou que a epilepsia não era uma doença relacionada ao “divino”, mas sim que sua causa estava relacionada ao “corpo”. Ele também foi pioneiro em afirmar a relação existente entre epilepsia e depressão e, neste mesmo ano, afirmou que epiléticos se tornariam melancólicos e vice-versa e que tudo dependeria da direção que a doença seguisse; se sobre o corpo, epilepsia, se sobre a “inteligência”, melancolia (Lewis, 1934; Temkin, 1994). No entanto, somente no final do século XIX que uma compreensão mais clara desta enfermidade começou a surgir, seguida por experimentações relacionadas às crises epiléticas. Anos mais tarde, os trabalhos de Gibbs, Lennox, Penfield e Jasper consolidaram o entendimento da epilepsia como uma doença médica (Goldensohn *et al.*, 1997; Magiorkinis *et al.*, 2014).

A epilepsia pode ser definida como uma doença crônica que têm como característica comum crises epiléticas recorrentes na ausência de doenças tóxico-metabólicas ou febris e que podem ocorrer em qualquer faixa etária (*Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy*, 1989; *World Health Organization*, 2015). A epilepsia é considerada uma doença do cérebro definida por qualquer uma das seguintes condições: (1) Pelo menos duas crises não provocadas ou reflexas que ocorrem em um intervalo maior que 24 horas, (2) uma crise não provocada (ou reflexa) e uma probabilidade de novas crises semelhante ao risco de recorrência geral (pelo menos 60%), após duas crises não provocadas,

ocorrendo ao longo de 10 anos e (3) diagnóstico de uma síndrome epiléptica (Fisher *et al.*, 2014; Fisher, 2015).

A epilepsia presume a existência de uma anormalidade epileptogênica intrínseca, endógena ao próprio cérebro e que está presente mesmo entre as crises, independentemente de qualquer condição ou insulto agudo. Esta propriedade do “cérebro epiléptico” pode gerar crises recorrentes durante um período de tempo relativamente curto ou durante muitos anos, ou mesmo durante toda a vida do indivíduo (Engel, 2006). A atividade cerebral epiléptica pode ser desencadeada por diversos fatores, e por isso a epilepsia é considerada uma disfunção complexa e multifatorial. Essa doença é caracterizada por crises recorrentes, resultantes de uma atividade neuronal excessiva, devido a um aumento de descargas elétricas produzidas pelos neurônios no cérebro (Engel, 1995; WHO, 2015).

A epilepsia é considerada em remissão para indivíduos após a idade aplicável de uma síndrome epiléptica idade-dependente ou aqueles que permaneceram durante os últimos 10 anos sem crises e, sem medicamentos anticonvulsivos, nos últimos 5 anos. Quando a epilepsia for considerada em remissão, isso implica que a pessoa já não tem epilepsia, embora não haja garantia de que a doença não vai ocorrer novamente (Fisher, 2015).

Quanto à sua classificação, muito se tem debatido ao longo dos anos. A metodologia clássica foi proposta em 1985 e revisada em 1989, porém, passados mais de vinte anos de tal formulação, houve a necessidade de introduzir novos conhecimentos científicos obtidos ao longo deste tempo, possíveis graças aos avanços em neuroimagem, genética e biologia molecular, que permitiram a evolução dos estudos genômicos (Engel, 2001, 2006; Berg *et al.*, 2010). As modificações propostas na organização das epilepsias são em resposta à necessidade de atualizar a terminologia e a classificação utilizadas no diagnóstico e tratamento da doença podendo assim refletir os avanços científicos significativos que melhoraram a compreensão em relação à caracterização das crises e epilepsias. A classificação de um grupo complexo de doenças como epilepsias será sempre um desafio, onde buscar o contínuo aperfeiçoamento é essencial (Scheffer *et al.*, 2013).

A tabela 1 mostra a classificação em vigor das epilepsias segundo critérios estabelecidos pela *ILAE* (*ILAE*, 1989). A tabela 2 resume a nova proposta de

classificação das síndromes eletroclínicas e outras epilepsias levando em consideração a organização das formas de epilepsia pela especificidade.

A epilepsia do lobo temporal destaca-se como a forma focal mais comum de epilepsia, podendo ser desencadeada por um insulto, como por exemplo, *status epilepticus* ou ainda por uma crise prolongada. Sua patogênese não está completamente esclarecida, mas estudos em diversos temas, como plasticidade sináptica, neurotransmissores, canais iônicos, entre outros, buscam elucidar esses mecanismos (Chayasirisobhon, 2009; Sperk et al., 2009).

A epilepsia é uma condição clínica e fisiopatologicamente heterogênea e, apesar dos avanços da ciência, que buscam identificar genes a ela relacionados, a causa da maior parte dos tipos de epilepsia permanece desconhecida. Novos esforços científicos estão sendo feitos, dentre eles destaca-se a epigenética e os seus mecanismos que estão gerando evidências de que alterações na sua regulação afetam a suscetibilidade em desenvolver epilepsia bem como a sua manutenção (Qureshi & Mehler, 2010; Lubin, 2012; Roopra et al., 2012; Hwang et al., 2013).

Tabela 1. Classificação das epilepsias e síndromes epiléticas segundo a ILAE.

Epilepsias e síndromes						Síndromes especiais	
Relacionadas a localização			Generalizadas			Indeterminadas, focais ou generalizadas	
Idiopáticas (idade)	Sintomáticas	Criptogênicas	Idiopáticas (idade)	Criptogênicas ou Sintomáticas	Sintomáticas	Crises (alterações metabólicas)	Crises situacionais
Benigna da infância com ponta centro-temporal	Parcial contínua		Convulsão neonatal benigna	Síndrome de West	Etiologia inespecífica	Crises (alterações tóxicas)	Convulsões febris
Benigna da infância com paroxismos occipitais	Síndromes caracterizadas por crises com fatores precipitantes		Mioclônica benigna da infância	Síndrome de Lennox-Gastaut	Síndromes específicas	Crise neonatal	Crises isoladas ou estado de mal epilético isolado
Primária da leitura	Epilepsia do lobo frontal		Ausência da infância	Epilepsia com crises mioclôno-astáticas		Mioclônica severa da infância	
	Epilepsia do lobo temporal		Ausência juvenil	Epilepsia com ausências mioclônicas		Ponta-onda contínua durante o sono lento	
	Epilepsia do lobo parietal		Mioclônica juvenil			Epilepsia-afasia adquirida	
	Epilepsia do lobo occipital		Tônico-clônica generalizada do despertar			Epilepsias indeterminadas	
			Outras epilepsias generalizadas idiopáticas				
			Epilepsias precipitadas por fatores específicos				

Fonte: *International League Against Epilepsy, 1989.*

Tabela 2. Nova proposta para organização de síndromes eletroclínicas e outras epilepsias.

Síndromes eletroclínicas organizadas pela idade de início

Período neonatal

Epilepsia familiar benigna neonatal
Encefalopatia mioclônica precoce
Síndrome de Ohtahara

Lactente

Epilepsia do lactente com crises focais migratórias
Síndrome de West
Epilepsia mioclônica do lactente
Epilepsia benigna do lactente
Epilepsia familiar benigna do lactente
Síndrome de Dravet
Encefalopatia mioclônica em distúrbios não progressivos

Infância

Crises febris plus (podem começar no lactente)
Síndrome de Panayiotopoulos
Epilepsia com crises mioclônico atônicas (previamente astáticas)
Epilepsia benigna com descargas centrotemporais
Epilepsia autossômica-dominante noturna do lobo frontal
Epilepsia occipital da infância de início tardio (tipo Gastaut)
Epilepsia com ausências mioclônicas
Síndrome de Lennox-Gastaut
Encefalopatia epiléptica com espícula-onda contínua durante sono
Síndrome de Landau-Kleffner
Epilepsia ausência da infância

Adolescência – Adulto

Epilepsia ausência juvenil
Epilepsia mioclônica juvenil
Epilepsia com crises generalizadas tônico-clônicas somente
Epilepsias mioclônicas progressivas
Epilepsia autossômica dominante com características auditivas
Outras epilepsias familiares do lobo temporal

Relação menos específica com idade

Epilepsia familiar focal com focos variáveis (infância à vida adulta)

Epilepsias reflexas

Constelações distintas

Epilepsia mesial temporal com esclerose hipocampal
Síndrome de Rasmussen
Crises gelásticas com hamartoma hipotalâmico
Epilepsia-hemiconvulsão-hemiplegia

Epilepsias que não se enquadram em nenhuma destas categorias diagnósticas podem ser distinguidas

inicialmente na presença ou ausência de condição estrutural ou metabólica (causa presumida) e no modo primário do início de crise (generalizado vs. focal)

Epilepsias atribuídas a causa estrutural-metabólica

Malformações do desenvolvimento cortical (hemimegalencefalia, heterotopia, etc.)

Síndromes neurocutâneas (complexo esclerose tuberosa, Sturge-Weber, etc.)

Tumor

Infecção

Trauma

Angioma

Insultos perinatais

Acidente vascular cerebral

Epilepsias de causa desconhecida

Condições com crises epilépticas que são tradicionalmente não diagnosticadas como uma forma de epilepsia per si

Crises benignas neonatais

Crises febris

Fonte: Adaptado de Berg *et al.*, 2010

3.1. Epidemiologia da Epilepsia

Epilepsia é uma das enfermidades neurológicas mais prevalentes, afetando pessoas de todas as idades. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, cerca de 50 milhões de pessoas no mundo têm epilepsia (Engel, 1995; WHO, 2015). Devido a fatores como alta prevalência, gravidade, morbidade e impacto socioeconômico, as pesquisas científicas no campo da epileptologia têm adquirido caráter prioritário nas políticas em saúde pública (Sundqvist, 2002; Li & Sander, 2003).

O número de pessoas com epilepsia é bastante alto ao redor do mundo. O número médio de pacientes com epilepsia a cada 1000 habitantes é de 8.93 usando como base a cobertura de 105 países pela Organização Mundial da Saúde em 2005. A figura 2 mostra o número médio de afetados pela doença em regiões da OMS e no mundo (WHO, 2005).

Com relação ao número de pessoas acometidas pela doença, a figura 3 mostra o total de afetados nas regiões alcançadas pela OMS em 2005, abrangendo um total de 105 países, com um N específico de regiões cobertas em cada país.

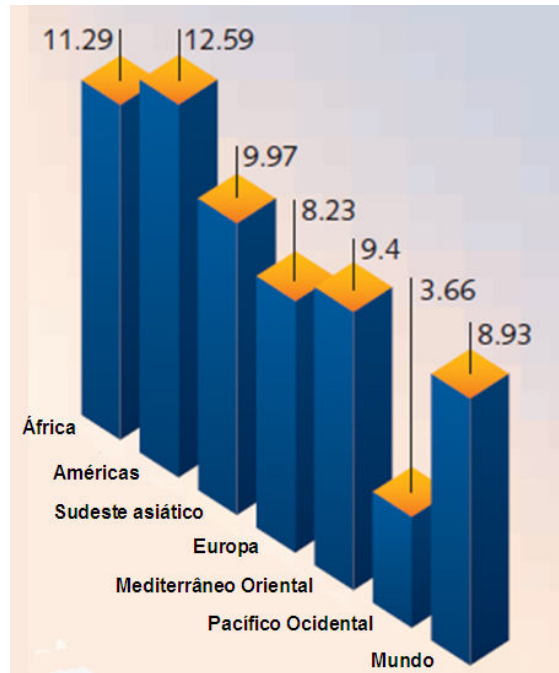


Figura 2. Média do número de pessoas com epilepsia por 1000 habitantes em Regiões da OMS e no mundo. Adaptado de WHO, 2005.

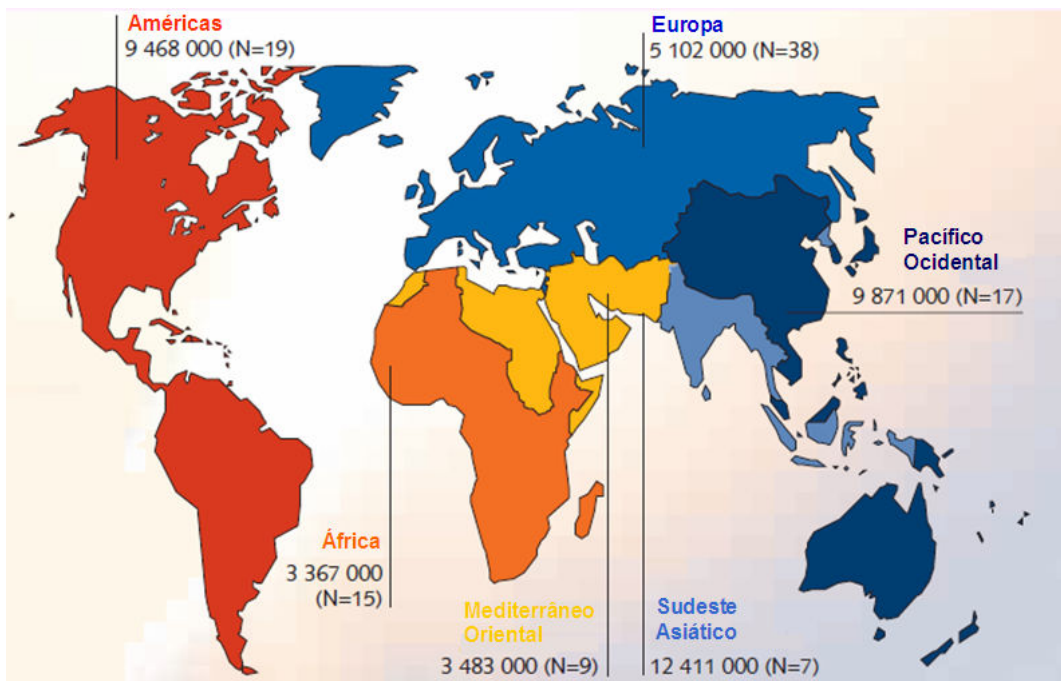


Figura 3. Número de pessoas com epilepsia em regiões da OMS, considerando um N total de 105 países pesquisados. Adaptado de WHO, 2005.

Globalmente, estima-se que 2,4 milhões de pessoas são diagnosticadas com epilepsia a cada ano. Em países de alta renda, novos casos anuais são de 30 a 50 por 100.000 pessoas na população em geral. Já em países de baixa e média renda, este número pode ser até duas ou três vezes maior. Outro aspecto importante é que aproximadamente 30% dos pacientes não respondem bem aos tratamentos farmacológicos disponíveis, não tendo controle adequado de suas crises (Kwan *et al.*, 2010; WHO, 2015).

No Brasil, há poucos dados epidemiológicos disponíveis, acredita-se que as taxas de prevalência variam de 1.19 a 2.03% (Feijó de Melo *et al.*, 2007). Um estudo realizado na Grande São Paulo mostrou uma taxa de prevalência de epilepsia de 1,19% (Marino *et al.*, 1986). Um estudo populacional realizado na cidade de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, encontrou uma taxa de prevalência de 1,65% de epilepsia ativa e 2,03% de epilepsia inativa (Fernandes *et al.*, 1992).

3.2. Comorbidades psiquiátricas na Epilepsia

Originalmente criado por Feinstein, o termo comorbidade é usado para se referir a uma associação entre duas doenças maior do que a possibilitada pela coincidência da ocorrência das duas doenças em um mesmo indivíduo. Comorbidades psiquiátricas em pessoas com epilepsia tem grandes implicações clínicas, terapêuticas e para a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Estudos de prevalência referentes à associação entre epilepsia e transtornos psiquiátricos mostraram que a epilepsia pode preceder, ocorrer concomitantemente ou ainda ocorrer posteriormente ao diagnóstico de uma comorbidade (Feinstein, 1970, Gaitatzis *et al.*, 2004; 2012; Schenkel *et al.*, 2012).

A relação existente entre epilepsia e psiquiatria é reconhecida há séculos, contudo, o amplo espectro de comorbidades neuropsiquiátricas e sua extensão foram sendo amplamente investigadas com o passar dos anos. O impacto destas comorbidades no comportamento relacionado à busca de ajuda, controle de crises e qualidade de vida sugere que detectar e tratar precocemente esses problemas é de suma importância. Porém, é importante reconhecer com acurácia a condição

neuropsiquiátrica para que ocorra o manejo apropriado da mesma e essa necessidade de aprimorar o diagnóstico segue em discussão atualmente (Devinsky, 2003; Agrawal & Govender, 2011).

Há alguns dados na literatura referentes à prevalência de desordens psiquiátricas em epilepsia e essas estimativas dependem das definições clínicas e dos métodos diagnósticos. Dados disponíveis sugerem que desordens psiquiátricas ocorrem em 20 a 40% dos pacientes com epilepsia, com uma incidência ainda maior em pacientes com epilepsia do lobo temporal e epilepsias refratárias ao tratamento. Dentre os problemas de ordem psiquiátrica que podem ocorrer em pessoas com epilepsia estão transtornos afetivos, doenças psicóticas, neuroses, transtornos de humor, transtornos de personalidade e problemas comportamentais. No entanto, a maioria dos estudos tem seu enfoque na relação entre epilepsia e depressão e, conseqüentemente, há um *déficit* de dados epidemiológicos sobre a associação entre epilepsia e transtornos psiquiátricos de uma forma geral (Devinsky 2003; Gaitatzis *et al.*, 2004; Bragatti *et al.*, 2011; 2014; Schenckel *et al.*, 2012).

A depressão é o transtorno psiquiátrico mais comum em pacientes com epilepsia e uma importante causa de morbidade. Os dados sobre os índices de depressão na epilepsia são 20 a 55% de pacientes com crises recorrentes, dependendo do estudo (Kanner, 2003). Características de depressão, tais como perturbações do sono, alterações do apetite, falta de concentração e os níveis de energia reduzidos são clinicamente pouco úteis no diagnóstico de tal comorbidade, devido ao efeito intrínseco da epilepsia e os efeitos colaterais de medicamentos anti-epilépticos. Uma maior ênfase deve ser dada a falta de interesse, anedonia e problemas cognitivos, além do quadro de tristeza sustentada (Kanner 2000, 2003).

Outro transtorno de ordem psiquiátrica que pode ocorrer em pacientes com epilepsia é a psicose. Ela foi diferenciada da esquizofrenia na década de 50 e inclui uma série de desordens psicóticas, como por exemplo, delírios paranóicos com alucinações visuais e auditivas. Transtornos psicóticos frequentemente ocorrem em pacientes com epilepsia e eles raramente apresentam sintomas mais negativos relacionados à esquizofrenia e, geralmente, preservam sua personalidade e afetividade (Agrawal & Govender, 2011).

A última década testemunhou uma mudança significativa na evolução da compreensão da relação entre transtornos psiquiátricos e a epilepsia. Enquanto

esses transtornos tradicionalmente eram considerados como uma complicação relacionada às crises epiléticas, novos dados epidemiológicos, apoiados por pesquisa clínica e experimental, sugeriram a existência de uma relação bidirecional entre as duas condições, principalmente no caso dos transtornos depressivos. Não apenas os pacientes com epilepsia apresentam um maior risco de sofrer de um transtorno depressivo, mas os pacientes com transtornos psiquiátricos primários também apresentam maior risco de desenvolver epilepsia (Kanner *et al.*, 2014).

No que tange especificamente a epilepsia do lobo temporal, sabe-se que elevados índices de transtornos psiquiátricos estão associados a essa condição, justamente por estar envolvida em centros importantes do sistema límbico, relacionado à integração dos processos emocionais. O sistema límbico situa-se na parte medial dos lobos temporais o que leva a crer que distúrbios psiquiátricos são mais esperados em pacientes cujo foco das crises pertence a essa região. Dentre os fatores biológicos de risco para o desenvolvimento de comorbidades em ELT estão danos neuropatológicos em áreas referentes às funções psíquicas (amígdala, sistema límbico, córtex frontal e gânglios basais) e ainda os efeitos colaterais de cunho emocional e cognitivo produto da utilização dos medicamentos antiepiléticos (Gaitatzis *et al.*, 2004; Swinkels *et al.*, 2005).

É plausível pensar que mecanismos genéticos e epigenéticos possam estar intimamente ligados tanto à epileptogênese quanto ao desenvolvimento de desordens psiquiátricas, visto que a associação entre essas enfermidades é altamente prevalente. Uma melhor compreensão de como essas alterações podem ocorrer em nível molecular pode trazer novos conhecimentos em neurodesenvolvimento e também alternativas terapêuticas para tais enfermidades (Gaitatzis *et al.*, 2004; Tsankova *et al.*, 2007).

4. Epigenética, Epilepsia e comorbidades

O termo “epigenética” é atribuído a Conrad Waddington que em 1942 o definiu como “o ramo da biologia que estuda as interações causais entre os genes e os seus produtos, que fazem o fenótipo ser”, porém ele não tinha uma definição específica para epigenética. Waddington e outros estudiosos tentaram estabelecer conexões entre a genética e o desenvolvimento. Hoje essa área de estudo está se

expandindo rapidamente e os resultados emergentes se mostram relevantes para a medicina, trazendo conhecimentos importantes referentes à fisiopatologia e também a respeito de tratamentos para diversas doenças (Holliday, 2006; Pulido Fontes *et al.*, 2015).

A epigenética pode ser definida como o estudo de mudanças na expressão gênica que ocorrem sem alterar a sequência de DNA. Esses processos podem ser entendidos não apenas como reguladores ou silenciadores da expressão, mas também como, quando e onde os genes serão mais intensamente expressos (Akbarian *et al.*, 2013). Evidências mostram que os processos epigenéticos podem ser modificados por fatores físicos, químicos, nutricionais e até mesmo psicossociais. O ambiente e os hábitos de vida podem modificar a expressão gênica através desses mecanismos (Feil, 2006; Feil & Fraga, 2012).

Em 1975 foi proposto que a metilação de DNA pode ser responsável pela manutenção estável de um determinado padrão de expressão de genes através da divisão de células mitóticas (Riggs, 1975; Holliday & Pugh, 1975). Desde então, se tem obtido amplas evidências que suportam este conceito e a metilação do DNA é agora reconhecida como sendo um dos principais mecanismos envolvidos na estabilidade dos estados de expressão gênica. Especificamente, a metilação do DNA estabelece um estado de cromatina silenciada, que colabora com proteínas que modificam os nucleossomos (Wolffe & Matzke, 1999).

Historicamente, a metilação do DNA foi descoberta nos mamíferos tão cedo quanto o DNA foi identificado como o material genético (Avery *et al.*, 1944; McCarty & Avery, 1946). Em 1948, Rollin Hotchkiss observou pela primeira vez uma citosina modificada em uma preparação utilizando cromatografia em papel. Hotchkiss (1948) levantou a hipótese de que esta fração era 5-metilcitosina (5mC) porque se separou da citosina de uma forma semelhante a timina (também conhecida como metiluracila) separada da uracila, e sugeriu ainda que esta citosina modificada existia naturalmente no DNA (Hotchkiss, 1948). A figura 4 mostra uma linha do tempo referente às descobertas nessa área.

Embora muitos pesquisadores tenham proposto que a metilação do DNA possa regular a expressão gênica, foi apenas na década de 1980 que vários estudos demonstraram que a metilação do DNA estava envolvida na regulação de genes e diferenciação celular (Holliday & Pugh, 1975; Compere & Palmiter, 1981).

Atualmente é bem reconhecido que a metilação do DNA, juntamente com outros reguladores, é um dos principais fatores epigenéticos que influenciam as atividades dos genes (Moore, 2012).

A metilação do DNA é o processo epigenético mais estudado, que consiste na adição de um grupo metil no carbono 5 das moléculas de citosina que são seguidas por guanina (dinucleotídeos CpG). No genoma dos mamíferos, aproximadamente 70 a 80% desses dinucleotídeos apresentam essa modificação. Essas moléculas não estão distribuídas no genoma de maneira uniforme, justamente ao contrário, elas aparecem em clusters chamados de ilhas CpG que geralmente se localizam nas regiões promotoras dos genes (Rodríguez-Dorantes et al., 2004; Lister et al., 2009).

A maioria dos promotores de genes dos mamíferos estão englobados nas ilhas CpG que possuem um elevado número de dinucleotídeos CpG não metilados. Essa modificação está associada com alterações da cromatina e possíveis implicações no processo de transcrição (Klose & Bird, 2006; Blackledge & Klose, 2011). As ilhas CpG utilizam processos relacionados a cromatina para contribuir para o potencial transcricional associado aos genes (Blackledge & Klose, 2011).

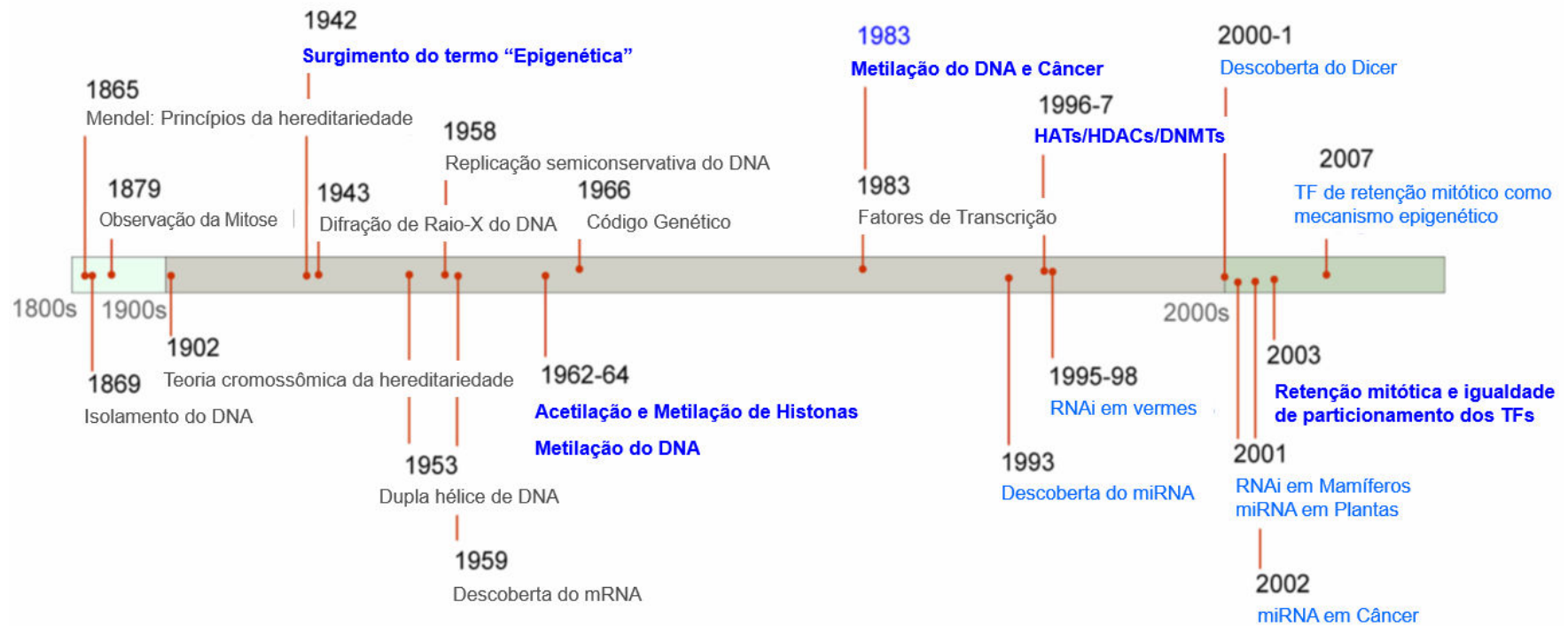


Figura 4. Linha do tempo mostrando fatos importantes na história da epigenética. Adaptado de Zaidi *et al.*, 2011.

O mecanismo de metilação da região promotora de um gene está geralmente associado com a inibição da transcrição, também conhecido como silenciamento gênico. A metilação inibe a transcrição por meio de dois mecanismos. O primeiro impede a ligação de fatores de transcrição reguladores cujos locais de reconhecimento contêm CpG. O segundo mecanismo envolve complexos de proteínas que se ligam especificamente a locais CpG metilados e indiretamente impedem a ligação do fator de transcrição ao limitar o acesso dos elementos regulatórios (Rodríguez-Dorantes *et al.*, 2004). A figura 5 mostra esquematicamente como ocorrem esses dois mecanismos.

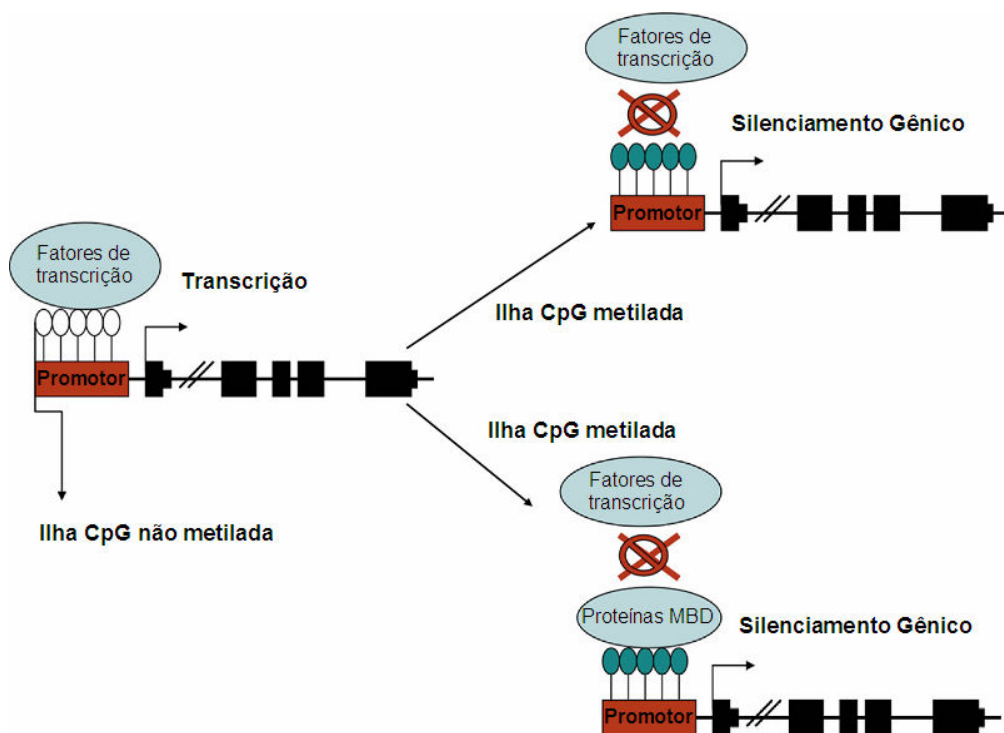


Figura 5. Mecanismo de metilação do DNA em uma ilha CpG localizada na região promotora de um gene. A metilação inibe a transcrição diretamente (impedindo a ligação do fator de transcrição) ou indiretamente, através da ligação de proteínas reguladoras no domínio de ligação metil-CpG (MBD). Adaptado de Pulido Fontes *et al.*, 2015.

Metilação aberrante de DNA pode apresentar implicações em uma ampla gama de doenças, como câncer, doenças relacionadas ao mecanismo de *imprinting*, doenças neurocomportamentais como X-Frágil (Robertson, 2005), doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, acidente

vascular cerebral e epilepsia (Petrij *et al.*, 1995; Bartsch *et al.*, 2005; Roelfsema *et al.*, 2005; Urdinguio *et al.*, 2009; Qureshi & Mehler, 2010b). Uma das frentes de estudo que tem evoluído muito nas últimas décadas diz respeito às investigações de vias moleculares associadas ao processo epileptogênico. Muitos esforços têm sido realizados para identificar genes e processos epigenéticos que podem estar associados à epilepsia e também as comorbidades psiquiátricas que podem estar ou não relacionadas a ela (Morimoto *et al.*, 2004; McNamara *et al.*, 2006; Kanner *et al.*, 2014; Miller-Delaney *et al.*, 2015). A tabela 3 apresenta um panorama da epigenética nas comorbidades psiquiátricas.

A Metilação do DNA é uma ferramenta chave na sinalização epigenética usada pelas células para “desligar” os genes. Padrões de metilação do DNA devidamente estabelecidos e mantidos são essenciais para o desenvolvimento normal do cérebro, para o comprometimento das linhagens celulares e funcionamento normal do organismo adulto (Robertson, 2005; Guibert *et al.*, 2009; Senner, 2011). A metilação fornece marcas estáveis ao longo dos domínios cromossômicos, originando estados memorizados de expressão dos genes que podem ser herdados de uma geração celular para a próxima (Borrelli *et al.*, 2008; Day & Sweatt, 2011).

Kobow & Blumcke propuseram recentemente a “Hipótese da metilação”, a qual sugere que mecanismos epigenéticos como metilação do DNA ou modificações nas caudas das histonas podem causar alterações na estrutura da cromatina e conseqüentemente na expressão de genes relacionados à epilepsia, o que poderia ter um papel crucial no processo de epileptogênese devido ao fato de que esses mecanismos poderiam ser induzidos por condições como um insulto primário ou ainda uma crise resultando em uma lesão cerebral estrutural, resistência aos tratamentos ou ainda disfunção cognitiva (Kobow & Blumcke, 2011; 2012).

Mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos no desenvolvimento e progressão da epilepsia e a doença, por sua vez, pode mudar o “cenário” no sistema nervoso central. A figura 6 ilustra os processos epigenéticos que podem estar envolvidos na epileptogênese. Independente das crises iniciarem cedo ou tarde na vida, os processos como plasticidade sináptica, neuro-gliogênese e neuroproteção são processos de desenvolvimento em curso que são mediados por alterações epigenéticas na estrutura da cromatina.

Tabela 3. Alterações epigenéticas em doenças neuropsiquiátricas.

Doença Neuropsiquiátrica	Mecanismo Epigenético	Referência
Doença de Alzheimer	Diminuição da acetilação de histonas no gene <i>APP</i> Diminuição da metilação global do gene <i>BDNF</i>	Kuo <i>et al.</i> , 1996; Selkoe, 1998; Sastre <i>et al.</i> , 2001; Kimberly <i>et al.</i> , 2001; Cao & Sudhof, 2001; von Rotz <i>et al.</i> , 2004; Rao <i>et al.</i> , 2012
Síndrome de Rett	Mutação em MeCP2	Amir <i>et al.</i> , 1999 ; Ausio <i>et al.</i> , 2003
Síndrome de Rubinstein-Taybi	Mutação em <i>cAMP response element binding (CREB)</i>	Vo & Goodman, 2001; Ausió <i>et al.</i> , 2003
Síndrome de Coffin-Lowry	Mutações em RSK2, podendo interagir com CREB e fosforilar H3	Merienne <i>et al.</i> , 2001; Weeber <i>et al.</i> , 2002
Síndrome de ICF*	Mutações em Dnmt3B, hipometilação nas regiões centroméricas dos cromossomos 1, 9 e 16	Merienne <i>et al.</i> , 2001; Ausió <i>et al.</i> , 2003
Esquizofrenia	Aumento da metilação do DNA no gene codificador de Relina Diminuição da metilação global do gene <i>BDNF</i> Aumento da metilação do DNA no éxon I de <i>BDNF</i>	Costa <i>et al.</i> , 2002; Chen <i>et al.</i> , 2002 Kordi-Tamandani <i>et al.</i> , 2012; Ikegame <i>et al.</i> , 2013b
Síndrome do X-Frágil	Hipermetilação dos promotores de <i>FMR1</i> e <i>FMR2</i>	Ausió <i>et al.</i> , 2003; Lim <i>et al.</i> , 2005
Síndrome de Prader-Willi	<i>Imprinting</i> anormal (Metilação do DNA) da região 15q11-13 no cromossomo paterno	Davies <i>et al.</i> , 2005; Tsankova <i>et al.</i> , 2007
Síndrome de Angelman	<i>Imprinting</i> anormal (Metilação do DNA) da região 15q11-13 no cromossomo materno	Davies <i>et al.</i> , 2005; Tsankova <i>et al.</i> , 2007
Epilepsia	Desregulação epigenética da plasticidade sináptica e neurogênese	Levenson, 2007; Lubin, 2012
Depressão	Desregulação epigenética leva à redução da neurogênese e prejudica a plasticidade neuronal, principais fatores da patogênese da depressão, comportamento desesperado e déficits cognitivos Aumento da metilação do DNA nos exons I e VI de <i>BDNF</i> Diminuição da metilação global e no promotor do éxon IV do gene <i>BDNF</i>	Mateus-Pinheiro <i>et al.</i> , 2011; Fuchikami <i>et al.</i> , 2011; Kang <i>et al.</i> , 2013; Kim <i>et al.</i> , 2013; D'Addario <i>et al.</i> , 2013; Tadić <i>et al.</i> , 2014
Tumores do SNC (padiátrico e adulto)	Alterações epigenéticas envolvidas na manutenção e progressão tumoral	Qureshi & Mehler, 2011
Transtorno de Humor Bipolar	Aumento da metilação dos promotores do éxon I e IV do gene <i>BDNF</i>	D'Addario <i>et al.</i> , 2012; Perroud <i>et al.</i> , 2013

* Síndrome de imunodeficiência - instabilidade centromérica - anomalias faciais

Fonte: Adaptado de Levenson & Sweat 2005; Ravi & Kannan, 2013; Martínez-Levy & Cruz-Fuentes, 2014; Mitchelmore & Gede, 2014.

Essas modificações baseadas no ambiente, estímulo e desenvolvimento conduzem a biologia do indivíduo dentro de células distintas do SNC. Deste modo, a epigenética fornece um mecanismo pelo qual as células do SNC podem reagir a estímulos internos e externos e registram a experiência de forma modificável e hereditária. O surgimento de diagnósticos genômicos, juntamente com exames de imagem de alta resolução podem identificar respostas celulares normais e aberrantes a esses estímulos, o que permitiria identificar o circuito aberrante que leva a progressão da epilepsia e patologias subjacentes (Foti & Roskams, 2011).

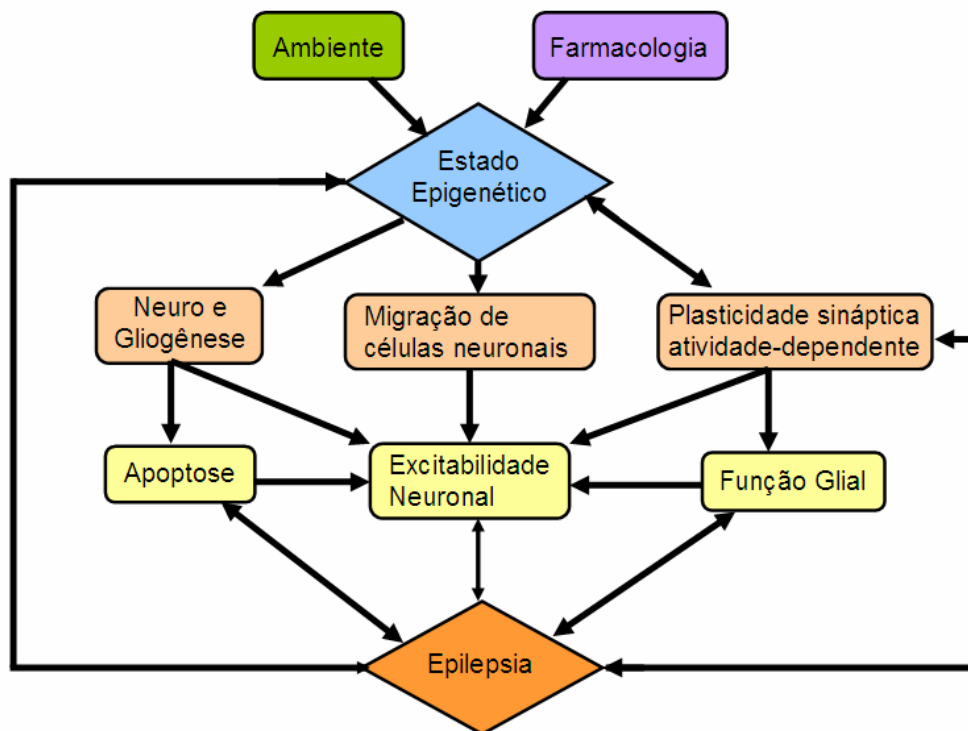


Figura 6. Epigenética e Epilepsia. Regulação epigenética dos genes pode impactar dinamicamente numerosos processos fisiológicos no sistema nervoso. Adaptado de Foti & Roskams, 2011.

A epigenética é influenciada pelo ambiente e tem um papel em diversos aspectos da função neuronal, desde a embriogênese e desenvolvimento inicial do cérebro até expressão gênica tecido-específica e silenciamento gênico global. Por conseguinte, é razoável acreditar que uma desregulação epigenética pode ter um papel significativo em distúrbios neuropsiquiátricos, AVC e Epilepsia, entre outros (Levenson & Sweatt, 2005; Graff *et al.*, 2011). A tabela 4 mostra uma série de estudos realizados que tentaram desvendar a relação da epigenética com a epilepsia.

Tabela 4. Estudos de modificações epigenéticas em Epilepsia.

Modelo do estudo	Tecido estudado	Análise epigenética	Referência
Ratos – indução de crises (Pilocarpina)	Hipocampo	H4 Hipoacetilação – <i>Glur2</i> H4 Hiperacetilação - <i>BDNF</i>	Huang <i>et al.</i> , 2002
Ratos – indução de crises (eletricamente)	Hipocampo	H4 Hipoacetilação – <i>CREB</i> H4 Hiperacetilação – <i>CREB</i>	Tsankova <i>et al.</i> , 2004
TLE* em humanos	Hipocampo	Hipermetilação do promotor de relina	Kobow <i>et al.</i> , 2009
Ratos – Indução de SE (Cainato)	Hipocampo, Sangue periférico	miRNA	Liu <i>et al.</i> , 2010
Ratos – <i>Status Epilepticus</i>	Hipocampo	Aumento expressão miRNA 132	Hu <i>et al.</i> , 2011 Jimenez-Mateos <i>et al.</i> , 2011 Song <i>et al.</i> , 2011
TLE em humanos	Córtex temporal	Expressão – DMNT 1 e 3A	Zhu <i>et al.</i> , 2012
Ratos – Indução de SE* (Cainato)	Hipocampo	Perfil de global Metilação	Miller-Delaney <i>et al.</i> , 2012
Ratos – indução de crises (Pilocarpina)	Córtex temporal	Expressão – HDAC2	Huang <i>et al.</i> , 2012
TLE em humanos			
TLE – ratos	Hipocampo	Aumento da metilação na região hipocampal durante a epileptogênese	Williams-Karnesky <i>et al.</i> , 2013
Ratos – indução de crises (Pilocarpina)	Hipocampo	Perfil de global Metilação	Kobow <i>et al.</i> , 2013
TLE em humanos	Hipocampo	Perfil global de metilação	Miller-Delaney <i>et al.</i> , 2015

*TLE – Temporal Lobe Epilepsy; SE – *Status epilepticus*

Fonte: Adaptado de Pulido Fontes *et al.*, 2015.

5. Gene *BDNF*: caracterização e importância nos estudos genéticos e epigênicos em Epilepsia

As neurotrofinas, que incluem o Fator de Crescimento do Nervo (NGF), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), Neurotrofina-3 (NT-3), e a Neurotrofina-4 (NT-4), são uma família única de fatores de crescimento polipeptídicos, presente em todas as espécies de vertebrados, que influenciam a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células neuronais. O aparecimento evolutivamente tardio das neurotrofinas (visto que não estão presentes em invertebrados como, por exemplo, *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans*) implica que estas moléculas de sinalização podem ser necessárias para o desenvolvimento e funcionamento de um sistema nervoso mais complexo (Chao, 2000; Beck *et al.*, 2004).

O gene que codifica o fator neurotrófico de crescimento cerebral (BDNF), o *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*, localiza-se no braço curto do cromossomo 11p13 e codifica o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), que é membro da família das neurotrofinas e está relacionado com a diferenciação, maturação, sobrevivência e morte celular (Hashimoto, 2007; Louhivuori *et al.*, 2009), com efeitos importantes em sistemas neurotransmissores como serotoninérgico, glutamatérgico e dopaminérgico (Mössner *et al.*, 2000; Guillin *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2008). No SNC, a transcrição de *BDNF* é regulada pela atividade neuronal com alta expressão no hipocampo e no córtex (Timmusk *et al.*, 1993; West, 2008).

O gene *BDNF* contém múltiplos promotores que geram transcritos por meio de diferentes exons não codificantes unidos em uma única região codificadora (Timmusk *et al.*, 1993; Martinowich *et al.*, 2003). De acordo com algumas descrições sobre a organização do gene *BDNF* e os transcritos gerados por *splicing* alternativo, sabe-se que esse gene apresenta 7 exons não codificantes e um codificante (Aoyama *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005). Complementando o que se conhece a esse respeito, Pruunsild e colaboradores (2007) realizaram um amplo estudo sobre *BDNF* em humanos e constataram a presença de onze exons no total e nove promotores funcionais que determinam a expressão tecido-específica dos transcritos, que se

localizam predominantemente no SNC. A complexa regulação transcricional presente neste gene leva a formação de pelo menos 3 isoformas pré e pro-BDNF (D'Addario *et al.*, 2012). A figura 7 mostra a localização cromossômica e representação esquemática do gene *BDNF*.

Com relação à genética, alguns polimorfismos foram descritos no gene *BDNF* e, dentre eles se destaca um polimorfismo de base única (SNP) funcional (rs6265) que resulta na substituição de uma metionina por uma valina no códon 66 de *BDNF*. A variante Met tem sido associada a uma quantidade intracelular diminuída de pro-BDNF nos dendritos e vesículas, bem como uma redução de secreção atividade-dependente, processo que desempenha um papel importante na regulação extracelular dos níveis de BDNF. Essa variante mostrou ter influência sobre o volume hipocampal e a memória (Egan *et al.*, 2003), além disso, esse SNP só existe em humanos e também está associado a suscetibilidade a uma variedade de doenças neuropsiquiátricas (Neves-Pereira *et al.*, 2002; Ventriglia *et al.*, 2002; Dwivedi *et al.*, 2003; Weickert *et al.*, 2003; Sen *et al.*, 2003; Binder, 2004; Hashimoto *et al.*, 2005).

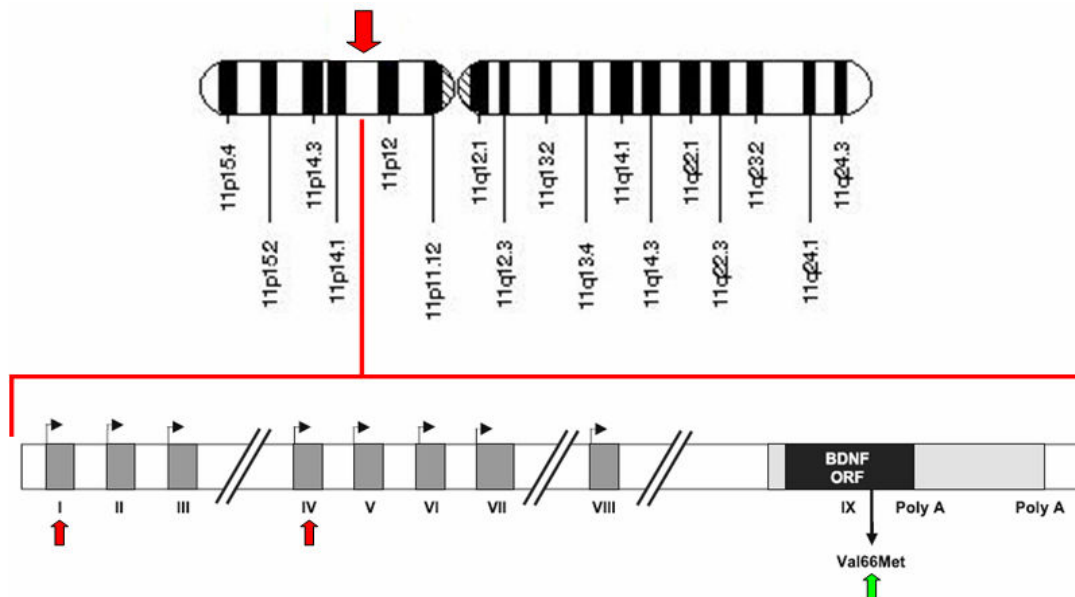


Figura 7. Localização cromossômica e estrutura do gene *BDNF* humano.

Exons estão representados por caixas cinza e íntrons como caixas brancas. Os algarismos romanos indicam o número dos exons. A caixa preta representa a proteína pró-BDNF. Duas caixas cinza no éxon IX são os locais de poliadenilação. As setas indicam as regiões promotoras dos exons I e IV (analisadas no presente estudo) e também a região onde se localiza o

polimorfismo mais estudado do gene *BDNF*, Val66Met (rs6265). Adaptado de Ikegame *et al.*, 2013a; Sha'ari *et al.*, 2015.

As ações de BDNF são ditadas por duas classes de receptores de superfície celular, o receptor Tirosina kinase B (TrkB) e o receptor de Neurotrofina p75 (p75NTR), um membro da superfamília de receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF) (Chao, 2003). No cérebro dos mamíferos, BDNF é sintetizado como um precursor chamado proBDNF, que é clivado proteoliticamente para gerar o BDNF maduro. ProBDNF pode preferencialmente se ligar ao p75NTR, ao passo que o BDNF maduro se liga preferencialmente ao receptor TrkB (Lee *et al.*, 2001, Teng *et al.*, 2005). Uma grande quantidade de evidências indica que BDNF e o seu receptor de alta afinidade trkB, além de modular a sobrevivência e diferenciação neuronal, estão criticamente envolvidos na excitabilidade neuronal e na modulação da transmissão sináptica (Thoenen, 1995, 2000; Schuman, 1999; Poo, 2000).

BDNF está presente no SNC tanto durante o desenvolvimento quanto na idade adulta, e é regulado por uma grande variedade de estados fisiológicos e patológicos. Em geral, além de seus efeitos tróficos sobre neurônios-alvo, *BDNF* parece constituir um mecanismo geral para modificações atividade-dependente das sinapses no sistema nervoso central em desenvolvimento e adulto. Doenças de suporte trófico anormal (tais como doenças neurodegenerativas) e doenças de excitabilidade anormal (como epilepsia) podem ser relacionadas, em alguns casos, com uma sinalização anormal de *BDNF* (Binder, 2004).

Considerando a grande importância de *BDNF* no sistema nervoso central e seu papel crucial na neurotransmissão, um grande número de estudos vem buscando analisar o papel desse gene na patogênese e resposta aos tratamentos em diferentes condições neuropsiquiátricas (Hashimoto, 2007; Martinowich *et al.*, 2007). Espera-se que a compreensão da hiperexcitabilidade associada à *BDNF* possa levar a novas drogas anticonvulsivantes ou terapias antiepilépticas. Estudos mais aprofundados de mecanismos celulares e moleculares pelos quais *BDNF* influencia a sobrevivência da célula e a excitabilidade provavelmente poderão proporcionar novos conceitos e alvos para o tratamento de diversas doenças do SNC (Binder, 2004). BDNF e trkB

são ativamente produzidos e transitam em várias regiões do cérebro adulto, onde influenciam a atividade, função e sobrevivência neuronal ao longo da vida. A presença diversificada e atividade de BDNF sugere um papel potencial desta molécula na patogênese e tratamento de ambas as doenças neurológicas e psiquiátricas (Nagahara & Tuszynski, 2011).

BDNF desempenha um papel importante no crescimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses, bem como na sobrevivência de neurônios existentes do sistema nervoso central e periférico (Fargali *et al.*, 2012; Ichim *et al.*, 2012). Evidências sugerem uma potencial contribuição de BDNF e seu receptor, TrkB, com a fisiopatologia da epilepsia. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que os níveis e atividade de BDNF estão aumentados durante a epileptogênese (Scharfman, 2002; 2005). Além disso, a diminuição dos níveis de TrkB no hipocampo de ratos adultos dificultou a ocorrência de crises; sendo assim, estas proteínas foram sugeridas como alvos para intervenção terapêutica em epilepsia (Kotloski & McNamara, 2010; Heinrich *et al.*, 2011).

Muitas evidências apontam que, juntamente com a regulação de expressão por fatores transcricionais, a transcrição de *BDNF* também é regulada por mecanismos epigenéticos, como remodelação da cromatina e metilação do DNA. Alterações na estrutura da cromatina resultam da modificação pós traducional nas histonas por acetilação, metilação e fosforilação (Bird, 2007), mostrando que nos mecanismos epigenéticos podem estar algumas respostas para perguntas que não puderam ser completamente respondidas somente pela genética.

6. Gene *SLC6A4*, Epilepsia e Epigenética

A serotonina é um importante neurotransmissor no sistema nervoso central (CNS), com várias funções no neurodesenvolvimento, bem como no funcionamento e na plasticidade do cérebro adulto (Catalano *et al.*, 2001; Lesch *et al.*, 2001), é também um dos neurotransmissores que influenciam o equilíbrio inibitório/excitatório cortical e subcortical e tem participação em vários processos fisiológicos e patológicos do cérebro, fato que, acredita-se que pode estar relacionado a epileptogênese (Theodore, 2003). A possibilidade de comprometimento da neurotransmissão de 5-HT pode estar envolvida na

fisiopatologia da epilepsia tem sido amplamente discutido (Jobe *et al.*, 2003; Jamali *et al.*, 2006). Em modelos animais de epilepsia, dados experimentais ilustraram o papel patogênico de 5-HT na predisposição a crises: diminuição da atividade serotoninérgica facilita a gênese focal de crises e exacerba a gravidade delas (Jobe *et al.*, 1999).

A vasta gama de desordens associadas à disfunção serotoninérgica não é surpreendente, já que o sistema de transmissão de 5-HT inerva quase todas as regiões citoarquitetônicas do cérebro e da medula espinhal e tem sido implicado na modulação de cada comportamento humano e processo fisiológico orquestrado pelo sistema nervoso. O que é bastante surpreendente, tendo em vista a grande amplitude de influência, é que o sistema 5-HT tem origem a partir de uma pequena percentagem dos neurônios que são geneticamente programados para produzir e utilizar a 5-HT como um neurotransmissor. O número de neurônios 5-HT no cérebro de ratos é estimada como sendo de 26.000 (Ishimura *et al.*, 1988) e, no cérebro humano, aproximadamente 300.000 (Baker *et al.*, 1991; Hornung, 2003).

O gene do transportador de serotonina *solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter), Member 4 (SLC6A4, SERT, 5-HTT)* está localizado no cromossomo 17q11.1-12 e possui 14 éxons que codificam uma proteína de 630 aminoácidos (Ramamoorthy *et al.*, 1993; Lesch *et al.*, 1994). Dois polimorfismos comuns, uma inserção/deleção na região promotora do gene (elemento repetitivo de comprimento variável conhecido como 5HTTLPR - *5HTT gene linked polymorphic region*) e um polimorfismo de número variável de repetições em tandem (*VNTR*) no íntron 2 foram previamente descritos como capazes de modular a expressão do transportador de serotonina em nível transcricional (Heils *et al.*, 1996; Lesch *et al.*, 1996; Fiskerstrand *et al.*, 1999; MacKenzie *et al.*, 1999). Esses polimorfismos foram amplamente estudados em várias doenças neuropsiquiátricas e também foram avaliados com relação à resposta aos tratamentos antidepressivos (Veenstra-VanderWeele *et al.*, 2000; Courtet *et al.*, 2001; Mössner *et al.*, 2001; Mundo *et al.*, 2001). Devido a esses mecanismos, pode ocorrer variação na neurotransmissão serotoninérgica, que tem sido relacionada a uma ampla

variedade de doenças neuropsiquiátricas (Munafo *et al.*, 2003; Schenkel *et al.*, 2012).

A variante 5-HTTLPR é talvez o polimorfismo melhor estudado em humanos, e se refere a uma inserção/deleção de 43pb na região promotora do gene *SLC6A4*, que gera uma variante curta (S) e outra longa (L). A variante curta (s) indica que houve deleção, resultando em um alelo de 485pb, enquanto que a ausência dessa deleção resulta na variante longa (L), que gera um alelo de 529pb. A variante curta (S) apresenta 14 cópias do elemento de repetição e longa (L), tem 16 cópias desse elemento, que apresenta de 20 a 23pb (Heils *et al.*, 1996; Lesch *et al.*, 1996). As propriedades do alelo s foram extensivamente analisadas e parecem estar associadas a uma diminuição de transcrição de mRNA e, conseqüentemente, decréscimo na produção de proteína, e redução de atividade biológica do transportador. Já em relação a variante longa (L), foi relatado que ela está associada a uma maior concentração de mRNA e absorção de serotonina (Heils *et al.*, 1996; Lesch *et al.*, 1996; Stoltenberg *et al.*, 2002; Bradley *et al.*, 2005). Os níveis mais altos de mRNA se devem a presença do alelo A do SNP rs25531. Este polimorfismo causa a troca de adenina por guanina dentro da primeira das duas repetições extras do alelo longo, o que modifica ainda mais a expressão do gene. Indivíduos com a combinação alelo longo e SNP-A (representados como L_A) tem níveis mais altos, enquanto o alelo L_G é funcionalmente semelhante ao alelo S (Hu *et al.*, 2004; 2006).

O polimorfismo é referente a um número variável de repetições em tandem (*VNTR*) de 17pb no íntron 2 do gene *SLC6A4* (5-HTTVNTR) (Lesch *et al.*, 1994). Os tamanhos comuns dos fragmentos do *VNTR* são 9, 10, e 12 repetições. Em se tratando deste polimorfismo também foi sugerido que essa região com *VNTR* pode atuar como um regulador transcricional do gene *5-HTT* de uma maneira alelo-dependente. O alelo com 12 repetições tem propriedades de estímulo mais fortes do que o alelo com 10 repetições (Fiskerstrand *et al.*, 1999; Lovejoy *et al.*, 2003). A figura 8 mostra a representação esquemática do gene *SLC6A4*, destacando as principais variantes.

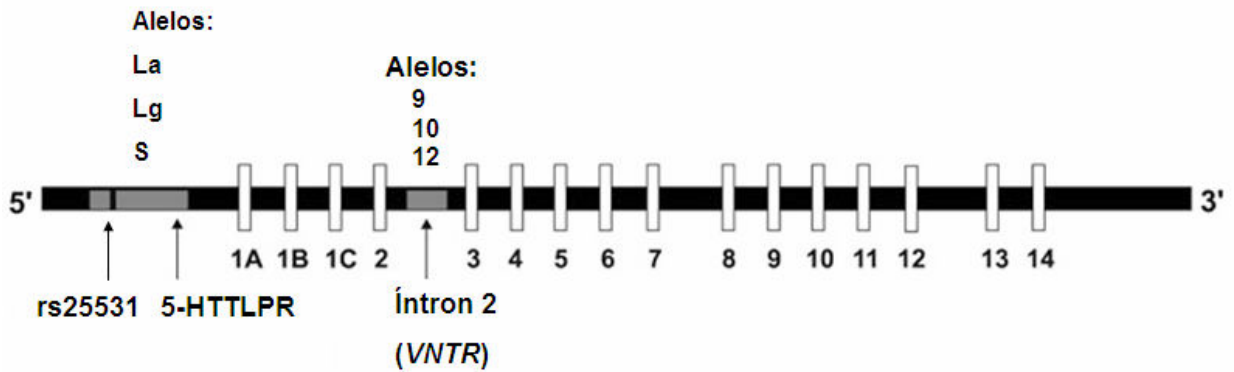


Figura 8. Representação esquemática do gene SLC6A4, destacando os principais polimorfismos, na região promotora e no íntron 2. Adaptado de Haddley *et al.*, 2012.

Em relação às epilepsias, estudos de associação entre casos e controles vêm sendo desenvolvidos no intuito de entender a influência da serotonina e do transportador da serotonina na etiologia da doença. A serotonina, quando liberada na fenda sináptica, exerce sua ação através de receptores tanto pré quanto pós-sinápticos. Os receptores 5-HT (5-HTR) podem, direta ou indiretamente, alterar a condução iônica, resultando em despolarização ou hiperpolarização. Deste modo, a serotonina, através de seus receptores, pode alterar a excitabilidade em processos envolvidos com a epilepsia. Em consequência, medicamentos que exercem propriedades agonistas e/ou antagonistas nos 5-HTR devem ser considerados importantes fatores para a patogênese da epilepsia (Stefulj *et al.*, 2010). Muitos grupos têm estudado o papel de variantes regulatórias no gene *SLC6A4* que podem estar envolvidas na codificação do transportador de serotonina, considerando a complexa etiologia da epilepsia do lobo temporal, mas os resultados obtidos por esses grupos são contraditórios. Além disso, estudos clínicos envolvendo imagem e farmacologia sugerem que alterações na transmissão serotoninérgica podem desempenhar um importante papel na epilepsia do lobo temporal e nas comorbidades a ela associadas (Manna *et al.*, 2007; Stefulj *et al.*, 2010, Schenkel *et al.*, 2011; Córdoba *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2013).

SLC6A4 é de particular interesse no contexto dos resultados relacionados a alterações epigenéticas. Acredita-se que a metilação neste gene pode contribuir para a vulnerabilidade a doenças neuropsiquiátricas

(Devlin *et al.*, 2010; Beach *et al.*, 2010, 2011; Koenen *et al.*, 2011). SLC6A4 é uma proteína integral de membrana, principalmente nos sistemas nervoso central e periférico, que transporta serotonina (5-HT), a partir de espaços sinápticos em neurônios pré-sinápticos e serve para regular aspectos emocionais do comportamento (Meyer-Lindenberg, 2009). Este processo de transporte por SLC6A4 finaliza a ação da serotonina. A redução dos níveis de 5-HT pode, eventualmente, aumentar o risco de desenvolver depressão ao longo da vida (Jans *et al.*, 2007).

Uma evidência em relação à metilação em ilhas CpG (a jusante da região 5-HTTLPR) emerge, sugerindo que esse mecanismo poderia estar associado aos níveis de expressão de SLC6A4. Metilação do DNA é um dos principais mecanismos de regulação epigenética ou de regulação de funções genéticas. Acredita-se que efeitos epigenéticos podem ser moderadores importantes na vulnerabilidade a doenças neuropsiquiátricas. Devido à importância desse gene na regulação da neurotransmissão serotoninérgica, tenta-se entender a base dessa regulação estudando polimorfismos dos genes que afetam os níveis de expressão de 5HTT, porém, poucos mecanismos ligando esses polimorfismos à vulnerabilidade para efeitos epigenéticos têm sido descritos (Philibert *et al.*, 2007; Koenen *et al.*, 2011).

7. Genes *BDNF* e *SLC6A4* e a Metilação do DNA

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético com grande poder em regular a estrutura da cromatina que controla persistentemente a expressão gênica no SNC (Jiang *et al.*, 2008; Lubin *et al.*, 2008). A metilação do DNA no SNC pode ocorrer de duas formas, a primeira é a formação de 5-metilcitosina (5-mC) a partir de 5-Citosina (5-C) catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMTs) e a segunda, a formação de 5-hidroximetilcitosina (5-HMC) a partir de 5-mC catalisada por TET1 (Metilcitosina deoxigenase) (Kriaucionis & Heintz, 2009; Munzel *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011). Acreditava-se que a metilação do DNA ocorreria principalmente durante o desenvolvimento e a diferenciação neuronal e permaneceria estático após esses processos. Porém, alguns estudos mudaram esse panorama e evidências recentes sugerem que a metilação é, de fato, um processo molecular dinâmico e persistente capaz de

controlar a transcrição dos genes em neurônios pós-mitóticos no CNS adulto (Levenson *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2008; Feng & Fan, 2009; Feng *et al.*, 2010).

A contribuição de alterações celulares e moleculares foi bastante documentada com relação ao seu envolvimento em diferentes estágios da epileptogênese, desde a fase de insulto inicial até fases mais tardias, em que crises recorrentes espontâneas começam a desenvolver e progredir o quadro de epilepsia. No entanto, os mecanismos que guiam muitas destas alterações celulares e moleculares, ocorrem quando a epileptogênese ainda é imperceptível. Alterações na metilação do DNA por mecanismos epileptogênicos podem ser transientes ou persistentes, afetando os padrões de expressão em genes que podem ser biomarcadores potenciais para as fases chave do processo de epileptogênese que necessitam ser mais investigadas (Loscher & Brandt, 2010; Pitkanen & Lukasiuk, 2011; Parrish *et al.*, 2013).

A metilação do DNA relacionada aos mecanismos de remodelação da cromatina exerce um papel vital no controle de crises. O estudo de Parrish e colaboradores (2013) sugere que prevenir essas alterações na metilação precocemente durante o insulto provavelmente pode resultar em um pior estado epilético como um aumento da excitabilidade neuronal no hipocampo, desta maneira, o aumento da metilação do DNA na epilepsia pode ser um alvo viável para intervenções terapêuticas na epilepsia do lobo temporal em humanos (Parrish *et al.*, 2013).

Evidências sugerem que modificações epigenéticas no gene *BDNF* estão associadas com a fisiopatologia das desordens psiquiátricas, como esquizofrenia e transtornos de humor. Pacientes com problemas psiquiátricos geralmente mostram uma diminuição dos níveis de BDNF neurais, o que está associado com um aumento da metilação em promotores específicos no gene. O estudo de Ikegame e colaboradores (2013a) ressalta que as alterações de metilação observadas foram consistentes entre tipos de amostras utilizadas (tecido cerebral e sangue periférico), o que sugere a utilidade desses resultados em mostrar a plausibilidade desses biomarcadores em comorbidades psiquiátricas (Ikegame *et al.*, 2013a).

D'Addario e colaboradores (2012) investigaram como alterações seletivas na metilação do DNA em regiões promotoras do gene *BDNF* podem vir a destacar a relação dos fatores epigenéticos em doenças neuropsiquiátricas, proporcionando uma nova visão sobre os mecanismos de expressão gênica. Eles estudaram uma amostra de pacientes com transtorno de humor bipolar e propuseram que conhecer mais sobre como estes mecanismos poderiam influenciar no mecanismo de ação dos medicamentos antidepressivos e estabilizadores de humor, ressaltando que os efeitos dos fármacos poderiam ter relação com a regulação da expressão de *BDNF* (D'Addario *et al.*, 2012).

BDNF foi extensamente investigado nos últimos anos e associado com adaptações neuronais ao estresse, plasticidade sináptica e resposta aos antidepressivos, bem como sua influência no sistema serotoninérgico e regulação do humor, o que o torna um candidato plausível para predisposição de distúrbios psiquiátricos (Henikoff & Matzke, 1997; Duman *et al.*, 2000; Shirayama *et al.*, 2002; Nakata *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2004; Castrén & Rantamäki, 2010; Grande *et al.*, 2010).

A serotonina (5-HT) exerce um papel crítico na relação entre os fatores ambientais, como as experiências de vida e um aumento do risco para distúrbios emocionais (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996). Um nível reduzido de 5-HT pode aumentar o risco de desenvolver depressão ao longo da vida, refletindo o que se chama de “vulnerabilidade serotoninérgica” (Jans *et al.*, 2007). Um regulador chave dos níveis de 5-HT é o transportador transmembrana de serotonina (5-HTT) que regula a reabsorção de 5-HT e determina a magnitude e duração da ação da serotonina. Acredita-se que o polimorfismo 5-HTTLPR na região promotora do gene que codifica o transportador de serotonina contribui na variação de expressão do gene e conseqüentemente variações na eficiência de recaptção de serotonina (Lesch *et al.*, 1996, Lesch & Mossner, 1998; Heils *et al.*, 1996). A expressão de *SLC6A4* pode também ser regulada por mecanismos epigenéticos, nesse sentido, sabe-se que o *status* de metilação da região promotora desse gene mostrou desempenhar um papel importante na regulação dos níveis de mRNA

e esses processos parecem estar vinculados aos genótipos de 5-HTTLPR (Philibert *et al.*, 2007).

Estudos referentes à metilação em ilhas CpG do gene *5HTT*, mostraram que os níveis de mRNA foram significativamente associados aos níveis de metilação, mas apenas se a influência dos genótipos de 5HTTLPR for controlada. O argumento utilizado pelos autores a respeito deste controle é que os níveis de 5HTT são fortemente regulados e os efeitos contraditórios da metilação na variação genética pode ser um mecanismo de adaptação para manter um nível desejado de transcrição do gene. A vulnerabilidade relacionada à variante SS para o desenvolvimento de problemas psicológicos em resposta a eventos adversos pode ser reduzida por níveis mais elevados de metilação. Isso poderia diminuir o risco de perda ou trauma em portadores do alelo curto do gene transportador de serotonina, o que implica valor adaptativo (Philibert *et al.*, 2007; IJzendoorn *et al.*, 2010b)

Um aumento na metilação na região promotora do gene *SLC6A4* foi correlacionado com decréscimo nos seus níveis de mRNA e na síntese de serotonina no cérebro. Esse aumento na metilação no promotor deste gene também foi associado ao desenvolvimento de depressão maior (Philibert *et al.*, 2008; Olsson *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). A expressão do gene *SLC6A4* é também regulada pelo polimorfismo na região promotora 5-HTTLPR, com seus alelos longo (L) e curto (S). Acredita-se que o alelo s reduz a expressão deste gene e é considerado fator de risco para depressão (Anguelova *et al.*, 2003). Além disso, acredita-se que o *status* de metilação deste gene possa estar associado ao polimorfismo 5-HTTLPR e, conseqüentemente, essa associação mostra efeitos diferenciais na depressão (Philibert *et al.*, 2007; Kinnally *et al.*, 2010).

8. High Resolution Melting: ferramenta para a análise de metilação

O crescente interesse nas funções biológicas da metilação do DNA e a sua relação com as doenças levaram ao desenvolvimento de várias técnicas para a análise deste mecanismo. Com o avanço das tecnologias, foram se desenvolvendo métodos precisos, eficientes e reprodutíveis para detectar e quantificar a metilação nos nucleotídeos citosina (Laird, 2003; Murrell *et al.*,

2005; Patterson *et al.*, 2011). Métodos mais conhecidos como o *NNA* (*Nearest Neighbor Analysis*) e o *HPLC* (*High-Performance Liquid Chromatography*) são valiosos para quantificar o total de 5-metilcitosina em uma amostra de DNA, porém, não informam a posição que essa citosina ocupa no genoma (Ramsahoye, 2002a;b). A amplificação por PCR seguida de sequenciamento de DNA genômico convertido por bissulfito de sódio emergiu como padrão-ouro para análise e comparação de padrões de metilação loci-específica. O bissulfito de sódio converte a citosina não-metilada em uracila sem causar alterações na citosina metilada (5-Metilcitosina) (Frommer *et al.*, 1992).

Avanços recentes em relação a reagentes fluorescentes, metodologias, instrumentos e softwares para a análise de metilação do DNA criaram novas ferramentas versáteis para a análise de variantes. A Análise de Dissociação de Alta Resolução (*High Resolution Melting Analysis*) é mais rápida, mais simples e menos dispendiosa do que os métodos alternativos mais sofisticados, como os que requerem sondas marcadas, por exemplo (Wittwer, 2009).

O método de *HRM* foi introduzido em 2002 através de uma parceria entre a Universidade de Utah nos Estados Unidos e a indústria, representada pela *Idaho Technology*, também dos EUA. Como o método mais simples para genotipagem e *screening* de mutações sua popularidade cresceu, pois nesta metodologia não há necessidade de processamento, adição de reagentes ou separação das amostras após a amplificação por PCR, já que o fluoróforo é capaz de se intercalar na molécula de fita dupla do DNA antes da amplificação. As curvas de *melting* são geradas através da monitorização da fluorescência do fluoróforo saturante que não inibe a PCR (Reed *et al.*, 2007), sendo assim a fluorescência é continuamente coletada e, com o aumento da temperatura de *melting* (T_m), ela vai decrescendo, mostrando a desnaturação do DNA em fita simples. A figura 9 mostra como ocorre a reação de *HRM*.

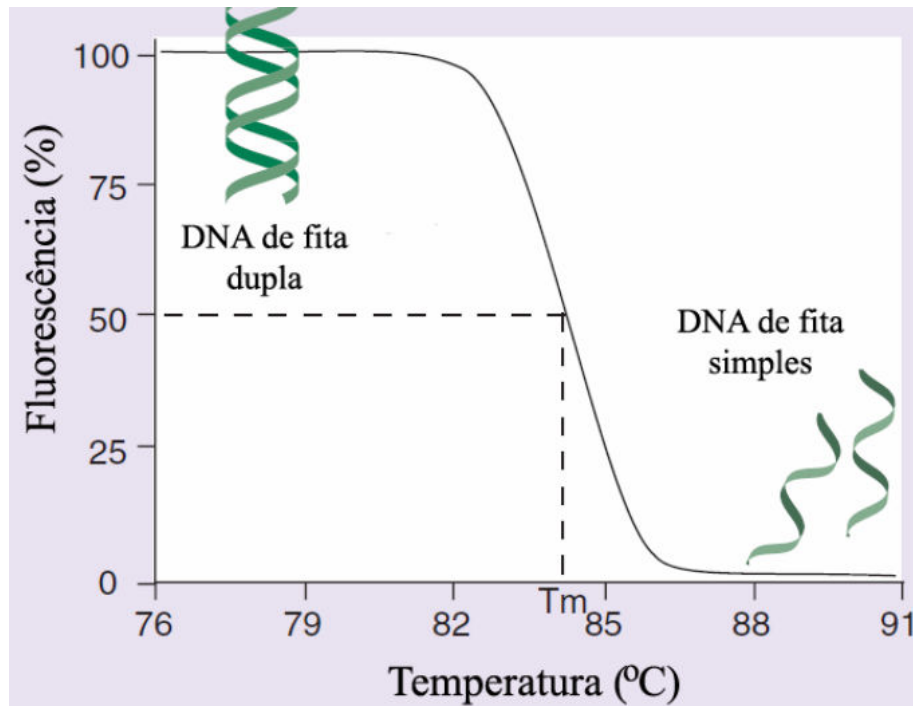


Figura 9. Análise da curva fluorescente de *melting*. A curva de dissociação é construída conforme a amostra vai sendo aquecida durante a reação, a temperatura aumenta e a fluorescência diminui devido à desnaturação do DNA, formando fita simples. A temperatura de *melting* (T_m) é o valor no qual 50% de cada fragmento de DNA esté desnaturado. Adaptado de Reed *et al.*, 2007.

A consistência dos perfis gerados por *HRM* permite que seja estimado o status de metilação com base nas semelhanças dos perfis normalizados. No entanto, no momento de desenhar o ensaio, o tamanho do fragmento que será analisado e o número de diferenças entre os produtos metilados e não-metilados devem ser levados em conta. Um produto de menor tamanho terá maior sensibilidade, mas limitam a análise em relação às diferenças existentes entre os perfis de metilação, pois em um fragmento pequeno são observadas poucas diferenças entre os produtos metilados e não-metilados. Produtos que consigam abranger uma região um pouco maior poderão ser mais eficientes em detectar as diferenças entre os perfis de metilação, quando comparados com a curva padrão de metilação (diluição da curva de porcentagem de metilação), que deve ser inserida em cada ensaio realizado. A temperatura de anelamento deve manter um equilíbrio entre as variáveis em questão e ser

definida de forma empírica durante os testes de padronização do ensaio (Wojdacz & Dobrovic, 2007).

Migheli e colaboradores (2013) testaram o método de análise de metilação *MS-HRM* e compararam os resultados obtidos com o método de pirosequenciamento, que é o padrão-ouro para esta análise. Eles observaram perfis semelhantes de metilação e um alto coeficiente de correlação entre as duas técnicas, corroborando que ele é capaz de gerar dados confiáveis e comparáveis ao padrão-ouro (Migheli *et al.*, 2013).

9. Objetivos

9.1. Objetivo Principal

Avaliar o perfil de metilação da região promotora dos genes *BDNF* e *SLC6A4* em uma amostra de pacientes com diagnóstico de epilepsia, atendidos pelo serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

9.2. Objetivos Secundários

- 1- Avaliar o perfil de metilação dos promotores I e IV do gene *BDNF* e na região promotora do gene *SLC6A4* em pacientes com epilepsia atendidos no ambulatório de epilepsia do HCPA
- 2- Comparar os resultados obtidos nos pacientes com um grupo controle constituído de doadores saudáveis
- 3- Fazer uma análise comparativa dos resultados obtidos com variáveis clínicas dos pacientes, buscando relacionar dados que podem estar envolvidos com alterações no perfil de metilação
- 4- Avaliar o possível envolvimento do *status* de metilação das regiões de interesse com a ocorrência de comorbidades psiquiátricas nos pacientes com epilepsia.

10. Referências Bibliográficas da Revisão

Agrawal N, Govender S (2011) Epilepsy and neuropsychiatric comorbidities. *Advances in psychiatric treatment*; (17): 44–53.

Akbarian S, Beerli MS, Haroutunian V (2013) Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition. *JAMA Neurol*; 70:711—718.

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*; 23:185–188.

Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G (2003) A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders. *Molecular Psychiatry*; 8:574e91.

Aoyama M1, Asai K, Shishikura T, Kawamoto T, Miyachi T, Yokoi T, Togari H, Wada Y, Kato T, Nakagawara A (2001) Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett*; 164:51–60.

Ausió J, Levin DB, De Amorim GV, Bakker S, Macleod PM (2003) Syndromes of disordered chromatin remodeling. *Clin Genet*; 64:83–95.

Baker KG, Halliday GM, Halasz P, Hornung JP, Geffen LB, Cotton RG, Törk I (1991) Cytoarchitecture of serotonin-synthesizing neurons in the pontine tegmentum of the human brain. *Synapse*; 7:301–320.

Bartsch O1, Schmidt S, Richter M, Morlot S, Seemanová E, Wiebe G, Rasi S (2005) DNA sequencing of CREBBP demonstrates mutations in 56% of patients with Rubinstein-Taybi syndrome (RSTS) and in another patient with incomplete RSTS. *Hum Genet*; 117:485–493.

Beach SR, Brody GH, Todorov AA, Gunter TD, Philibert RA (2010) Methylation at SLC6A4 is linked to family history of child abuse: an examination of the Iowa adoptee sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*; 153B:710–713.

Beach SR, Brody GH, Todorov AA, Gunter TD, Philibert RA (2011) Methylation at 5HTT mediates the impact of child sex abuse on women's antisocial behavior: an examination of the Iowa adoptee sample. *Psychosom Med*; 73(1): 83–87.

Beck G, Munno DW, Levy Z, Dissel HM, Van-Minnen J, Syed NI, Fainzilber M (2004) Neurotrophic activities of trk receptors conserved over 600 million years of evolution. *Journal of Neurobiology*; 60:12-20.

Berg AT1, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*; 51(4): 676–685.

Binder DK (2004) The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system. *Adv Exp Med Biol*; 548:34-56.

Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*; 16:6-21.

Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature*; 447:396-398.

Blackledge NP, Klose R (2011) CpG island chromatin: a platform for gene regulation. *Epigenetics*; 6(2):147-152.

Borrelli E, Nestler EJ, Allis CD, Sassone-Corsi P (2008) Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron*; 60:961–974.

Bradley SL, Dodelzon K, Sandhu HK, Philibert RA (2005) Relationship of serotonin transporter gene polymorphisms and haplotypes to mRNA transcription. *Am J Med Genet Part B*; 136B(1):58–61.

Bragatti JA, Torres CM, Londero RG, Martin KC, Souza AC, Hidalgo MP, Chaves ML, Bianchin MM (2011) Prevalence of psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy in a Southern Brazilian population. *Arq Neuropsiquiatr*; 69(2A):159-165.

Bragatti JA, Bandeira IC, de Carvalho AM, Abujamra AL, Leistner-Segal S, Bianchin MM (2014) Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene polymorphisms and psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*; 32:59-63.

Cao X, Sudhof TC (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*; 293:115–120.

Carvalho AL, Caldeira MV, Santos SD, Duarte CB (2008) Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *BR J Pharmacol*; 153(suppl 1):S310–S324.

Castrén E, Rantamäki T (2010). The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol*; 70: 289–297.

Catalano M (2001) Functionally gene-linked polymorphic regions and genetically controlled neurotransmitters metabolism. *Eur Neuropsychopharmacol*; 11:431–439.

Chang BS, Lowenstein DH (2003) Epilepsy. *N Engl J Med*; 349(13):1257-66.

Chao MV (2000) Trophic factors: An evolutionary cul-de-sac or door into higher neuronal function? *Journal of Neuroscience Research*; 59:353-355.

Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nat Rev Neurosci*; 4:299–309.

Chayasirisobhon S (2009) The mechanisms of medically refractory temporal lobe epilepsy. *Acta Neurol Taiwan*; 18:155–160.

Chen Y, Sharma RP, Costa RH, Costa E, Grayson DR (2002) On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res*; 30:2930–2939.

Cole J, Weinberger DR, Mattay VS, Cheng X, Toga AW, Thompson PM, Powell-Smith G, Cohen-Woods S, Simmons A, McGuffin P, Fu CH (2011) No effect of 5HTTLPR or BDNF Val66Met polymorphism on hippocampal morphology in major depression. *Genes Brain Behav*; 10(7):756-764.

Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy (1985) Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*; 26:268-278.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*; 30:389–399.

Commission on Epidemiology and Prognosis (1993) International league against epilepsy. Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. *Epilepsia*; 34:592–596.

Compere SJ, Palmiter RD (1981) DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene lymphoid cells. *Cell*; 25:233–240.

Córdoba M, Consalvo D, Moron DG, Kochen S, Kauffman MA (2012) SLC6A4 gene variants and temporal lobe epilepsy susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*; 39(12):10615-10619.

Costa E, Chen Y, Davis J, Dong E, Noh JS, Tremolizzo L, Veldic M, Grayson DR, Guidotti A (2002) REELIN and schizophrenia: a disease at the interface of the genome and the epigenome. *Mol Interv*; 2(1):47-57.

Courtet P, Baud P, Abbar M, Boulenger JP, Castelnau D, Mouthon D, Malafosse A, Buresi C (2001) Association between violent suicidal behavior and the low activity allele of the serotonin transporter allele. *Mol Psychiatry*; 6:338–341.

D'Addario C, Dell'osso B, Palazzo MC, Benatti B, Lietti L, Cattaneo E, Galimberti D, Fenoglio C, Cortini F, Scarpini E, Arosio B, Di Francesco A, Di Benedetto M, Romualdi P, Candeletti S, Mari D, Bergamaschini L, Bresolin N, Maccarrone M, Altamura AC (2012) Selective DNA Methylation of BDNF Promoter in Bipolar Disorder: Differences Among Patients with BDI and BDII. *Neuropsychopharmacology*; 37(7):1647-1655.

D'Addario C, Dell'Osso B, Galimberti D, Palazzo MC, Benatti B, Di Francesco A, Scarpini E, Altamura AC, Maccarrone M (2013) Epigenetic modulation of BDNF gene in patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry*; 73(2):e6-7.

Davies R, Morris B (1997) *Molecular biology of the neuron*. 2nd Edition; Oxford, UK: Oxford Univeristy Press; 498p.

Davies W, Isles AR, Wilkinson LS (2005) Imprinted gene expression in the brain. *Neurosci Biobehav Rev*; 29:421–430.

Day JJ, Sweatt JD (2011) Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron*; 70:813–829.

Devinsky O (2003) Psychiatric comorbidity in patients with epilepsy: implications for diagnosis and treatment. *Epilepsy and Behavior*; 4:S2–10.

Devlin AM, Brain U, Austin J, Oberlander TF (2010) Prenatal exposure to maternal depressed mood and the MTHFR C677T variant affect SLC6A4 methylation in infants at birth. *PLoS ONE*; 16:5(8).

Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C (2000) Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry*; 48:732–739.

Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN (2003) Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*; 60:804–815.

Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*; 112(2):257-269.

Engel J (2001) A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*; 42:796–803.

Engel J Jr (1995) Concepts of epilepsy. *Epilepsia*; 36(Suppl. 1):23-29.

Engel J Jr (2006) Report of the ILAE classification core group. *Epilepsia*; 47(9):1558-1568.

Fang H, Chartier J, Sodja C, Desbois A, Ribocco-Lutkiewicz M, Walker PR, Sikorska M (2003) Transcriptional activation of the human brain-derived neurotrophic factor gene promoter III by dopamine signaling in NT2/N neurons. *J Biol Chem*; 278:26401–26409.

Fargali S, Sadahiro M, Jiang C, Frick AL, Indall T, Cogliani V, Welagen J, Lin WJ, Salton SR (2012) Role of neurotrophins in the development and function of neural circuits that regulate energy homeostasis. *J Mol Neurosci*; 48(3):654–659.

Feil R (2006) Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutat Res*; 600:46—57.

Feil R, Fraga MF (2012) Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet*; 13:97—109.

Feinstein AR (1970) The pretherapeutic classification of comorbidity in chronic disease. *J Chronic Dis*; 2:455–468.

Feng J, Fan G (2009) The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders. *Int Rev Neurobiol*; 89:67–84.

Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan G (2010) Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci*; 13:423–430.

Fernandes JG, Schimidt MI, Monte TL, Tozzi S, Sander JW (1992) Prevalence of epilepsy: the Porto Alegre study. *Epilepsia*; 33(Suppl 3):S132.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S (2014) ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*; 55(4):475-482.

Fisher RS (2015) Redefining epilepsy. *Curr Opin Neurol*; 28(2):130-135.

Fiskerstrand CE, Lovejoy EA, Quinn JP (1999) An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells. *FEBS Lett*; 458:171–174.

Foti SB, Roskams AJ (2011) A tale of two epiphenomena: The complex interplay of epigenetics and epilepsy, underlying mechanisms of epilepsy. *Tech.* (Acessado em 16/11/2011). Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/20742.pdf>

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89:1827–1831.

Fuchikami M, Morinobu S, Segawa M, Okamoto Y, Yamawaki S, Ozaki N, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T (2011) DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. *PLoS One*; 6(8):e23881.

Gaitatzis A, Trimble MR, Sander JW (2004) The psychiatric comorbidity of epilepsy. *Acta Neurol Scand*; 110:207–220.

Gaitatzis A, Sisodiya SM, Sander JW (2012). The somatic comorbidity of epilepsy: a weighty but often unrecognized burden. *Epilepsia*; 53:1282–1293.

Goldensohn ES, Porter RJ, Schwartzkroin PA (1997) The American Epilepsy Society: an historic perspective on 50 years of advances in research. *Epilepsia*; 38:124–50.

Gomes MM (2006) History of epilepsy: a epistemologic point of view. *J. epilepsy clin. neurophysiol*; 12(3):161-167.

Graff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH (2011) Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev*; 91:603–649.

Grande I, Fries GR, Kunz M, Kapczinski F (2010) The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder. *Psychiatry Investig*; 7:243–250.

Guibert S, Forne T, Weber M (2009) Dynamic regulation of DNA methylation during mammalian development. *Epigenomics*; 1:81–98.

Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P (2001) *BDNF* controls dopamine D₃ receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature*; 411:1079–1088.

Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H (2011) Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*; 145:423–434.

Haddley K, Bubb VJ, Breen G, Parades-Esquivel UM, Quinn JP (2012) Behavioural genetics of the serotonin transporter. *Curr Top Behav Neurosci*; 12:503-535.

Hartl D, Jones E (2001) *Genetics: analysis of genes and genomes*. 8th Edition; Sudbury, MA: Jones & Bartlett; 804p.

Hashimoto K (2007) *BDNF* variant linked to anxiety-related behaviors. *BioEssays*; 29:116–119.

Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M (2004) Critical role of brain derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Rev*; 45:104–114.

Hashimoto T, Bergen SE, Nguyen QL, Xu B, Monteggia LM, Pierri JN, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA (2005) Relationship of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB to altered inhibitory prefrontal circuitry in schizophrenia. *J Neurosci*; 25:372–383.

Hauser S, Beal MF. *Biologia de doenças neurológicas*. In: Hauser SL, Josephson A (2015) *Neurologia Clínica de Harrison*. 3ª Ed., McGraw-Hill Ed., p 170-179.

Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP (1996) Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem*; 66(6):2621-2624.

Heinrich C, Lähteinen S, Suzuki F, Anne-Marie L, Huber S, Häussler U, Haas C, Larmet Y, Castren E, Depaulis A (2011) Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*; 42(1):35–47.

Henikoff S, Matzke MA (1997) Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet*; 13:293–295.

Holliday R (2006) Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*; 1:76—80.

Holliday R, Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*; 187(4173):226-232.

Homberg JR, Molteni R, Calabrese F, Riva MA (2014) The serotonin-BDNF duo: developmental implications for the vulnerability to psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev*; 43:35-47.

Hornung JP (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat*; 26:331–343.

Hotchkiss RD (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem*; 175:315–332.

Hu X, Zhu G, Lipsky R, Goldman D (2004) HTTLPR allele expression is codominant, correlating with gene effects on fMRI and SPECT imaging intermediate phenotypes, and behavior. *Biol Psychiatry*; 55:191S.

Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, Xu K, Arnold PD, Richter MA, Kennedy JL, Murphy DL, Goldman D (2006) Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet*; 78(5):815-826.

Hu K, Zhang C, Long L, Long X, Feng L, Li Y, Xiao B (2011) Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurosci Lett*; 488:252—257.

Huang Y, Doherty JJ, Dingledine R (2002) Altered histone acetylation at glutamate receptor 2 and brain-derived neurotrophic factor genes is an early event triggered by status epilepticus. *J Neurosci*; 22:8422—8428.

Huang Y, Zhao F, Wang L, Yin H, Zhou C, Wang X (2012) Increased expression of histone deacetylases 2 in temporal lobe epilepsy: a study of epileptic patients and rat models. *Synapse*; 66:151—159.

Hwang JY, Aromolaran KA, Zukin RS (2013) Epigenetic mechanisms in stroke and epilepsy. *Neuropsychopharmacology*; 38:167—82.

Ichim G, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P (2012) Neurotrophins and cell death. *Exp Cell Res*; 318(11):1221–1228.

Ikegame T, Bundo M, Murata Y, Kasai K, Kato T, Iwamoto K (2013a) DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. *J Hum Genet*; 58(7):434-438.

Ikegame T, Bundo M, Sunaga F, Asai T, Nishimura F, Yoshikawa A, Kawamura Y, Hibino H, Tochigi M, Kakiuchi C, Sasaki T, Kato T, Kasai K, Iwamoto K (2013b) DNA methylation analysis of BDNF gene promoters in peripheral blood cells of schizophrenia patients. *Neurosci Res*; 77(4):208-214.

Ishimura K, Takeuchi Y, Fujiwara K, Tominaga M, Yoshioka H, Sawada T (1988) Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain. *Neurosci Lett*; 91:265–270.

Ismail H, Wright J, Rhodes P, Small N, Jacoby A (2005) South Asians and epilepsy: exploring health experiences, needs and beliefs of communities in the north of England. *Seizure*; 14:497–503.

Jacoby A, Snape D, Baker GA (2005) Epilepsy and social identity: the stigma of a chronic neurological disorder. *Lancet Neurol*; 4:171–178.

Jamali S, Bartolomei F, Robaglia-Schlupp A, Massacrier A, Peragut JC, Régis J, Dufour H, Ravid R, Roll P, Pereira S, Royer B, Roeckel-Trevisiol N, Fontaine M, Guye M, Boucraut J, Chauvel P, Cau P, Szepetowski P (2006) Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain*; 129:625–641.

Jans LA, Riedel WJ, Markus CR, Blokland A (2007) Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications. *Mol Psychiatry*; 12(6):522–543.

Jiang Y, Langley B, Lubin FD, Renthal W, Wood MA, Yasui DH, Kumar A, Nestler EJ, Akbarian S, Beckel-Mitchener AC (2008) Epigenetics in the nervous system. *J Neurosci*; 28:11753–11759.

Jimenez-Mateos EM1, Bray I, Sanz-Rodriguez A, Engel T, McKiernan RC, Mouri G, Tanaka K, Sano T, Saugstad JA, Simon RP, Stallings RL, Henshall DC (2011) miRNA expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. *Am J Pathol*; 179:2519—2532.

Jobe PC (2003) Common pathogenic mechanisms between depression and epilepsy: an experimental perspective. *Epilepsy Behav*; 4(Suppl 3):S14–S24.

Jobe PC, Dailey JW, Wernicke JF (1999) A noradrenergic and serotonergic hypothesis of the linkage between epilepsy and affective disorders. *Crit Rev Neurobiol*; 13:317–356.

Kang HJ, Kim JM, Lee JY, Kim SY, Bae KY, Kim SW, Shin IS, Kim HR, Shin MG, Yoon JS (2013) BDNF promoter methylation and suicidal behavior in depressive patients. *J Affect Disord*; 151(2):679-685.

Kanner AM, Kozak AM, Frey M (2000) The use of sertraline in patients with epilepsy: is it safe? *Epilepsy and Behavior*; 1:100–105.

Kanner AM (2003) Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment. *Biological Psychiatry*; 54:388–398.

Kanner AM, Mazarati A, Koepp M (2014) Biomarkers of epileptogenesis: psychiatric comorbidities (?). *Neurotherapeutics*; 11(2):358-372.

Kim JM, Stewart R, Kang HJ, Kim SY, Kim SW, Shin IS, Park MS, Kim HR, Shin MG, Cho KH, Yoon JS (2013) A longitudinal study of BDNF promoter methylation and genotype with poststroke depression. *J Affect Disord*;149(1-3):93-99.

Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ (2001) The intracellular domain of the β -amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a Notch-like manner. *J. Biol. Chem*; 276:40288–40292.

Kinnally EL, Capitanio JP, Leibel R, Deng L, LeDuc C, Haghghi F, Mann JJ (2010) Epigenetic regulation of serotonin transporter expression and behavior in infant rhesus macaques. *Genes Brain and Behavior*; 9:575e82.

Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*; 31:89-97.

Kobow K, Jeske I, Hildebrandt M, Hauke J, Hahnen E, Buslei R, Buchfelder M, Weigel D, Stefan H, Kasper B, Pauli E, Blümcke I (2009) Increased reelin promoter methylation is associated with granule cell dispersion in human temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol*; 68:356—364.

Kobow K, Blümcke I (2011) The methylation hypothesis: do epigenetic chromatin modifications play a role in epileptogenesis? *Epilepsia*; 52 Suppl 4:15-19.

Kobow K, Blümcke I (2012) The emerging role of DNA methylation in epileptogenesis. *Epilepsia*; 53 Suppl 9:11-20.

Kobow K, Kaspi A, Harikrishnan KN, Kiese K, Ziemann M, Khurana I, Fritzsche I, Hauke J, Hahnen E, Coras R, Mühlebner A, El-Osta A, Blümcke I (2013) Deep sequencing reveals increased DNA methylation in chronic rat epilepsy. *Acta Neuropathol*; 126:741—756.

Koenen KC, Uddin M, Chang SC, Aiello AE, Wildman DE, Goldmann E, Galea S. (2011) SLC6A4 methylation modifies the effect of the number of traumatic events on risk for posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety*; 28(8):639–647.

Kordi-Tamandani DM, Sahranavard R, Torkamanzehi A (2012) DNA methylation and expression profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and dopamine transporter (DAT1) genes in patients with schizophrenia. *Mol Biol Rep*; 39(12):10889-10893.

Kotloski R, McNamara JO (2010) Reduction of TrkB expression de novo in the adult mouse impairs epileptogenesis in the kindling model. *Hippocampus*; 20(6):713–723.

Kriaucionis S, Heintz N (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*; 324:929–930.

Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, Kasunic TC, Kirkpatrick JB, Murdoch GH, Ball MJ, Roher AE (1996) Water-soluble A β (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem*; 271(8):4077-4081.

Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J (2010) Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*; 51:1069—77.

Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*; 116: 2117–2124.

Laird, PW (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Rev Cancer*; 3:253–266.

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted pro-neurotrophins. *Science*; 294:1945–1948.

Lesch KP (2001) Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol*; 11:457–474.

Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P (1994) Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen Sect*; 95(2):157-162.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996) Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*; 274:1527–1531.

Lesch KP, Mossner R (1998) Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biol Psychiatry*; 44:179–192.

Levenson JM, Sweatt JD (2005) Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci*; 6:108–118.

Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM, Sweatt JD (2006) Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem*; 281:15763–15773.

Levenson JM (2007) DNA (Cytosine-5) methyltransferase inhibitors: A potential therapeutic agent for schizophrenia. *Mol Pharmacol*; 71:635–637.

Lewis A (1934) Melancholia: a historical review. *J Mental Sci*; 80:1–42.

Li LM, Sander JW (2003) National demonstration project on epilepsy in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*; 61(1):153-156.

Lim JH, Booker AB, Fallon JR (2005) Regulating fragile X gene transcription in the brain and beyond. *J Cell Physiol*; 205:170–175.

Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*; 462:315-322.

Liu QR1, Walther D, Drgon T, Poleskaya O, Lesnick TG, Strain KJ, de Andrade M, Bower JH, Maraganore DM, Uhl GR (2005) Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*; 134:93–103.

Liu DZ1, Tian Y, Ander BP, Xu H, Stamova BS, Zhan X, Turner RJ, Jickling G, Sharp FR (2010) Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. *J Cereb Blood Flow Metab*; 30:92—101.

Loscher W, Brandt C (2010) Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev*; 62:668–700.

Louhivuori V, Arvio M, Soronen P, Oksanen V, Paunio T, Castrén ML (2009) The Val66Met polymorphism in the BDNF gene is associated with epilepsy in fragile X syndrome. *Epilepsy Res*; 85(1):114-117.

Lovejoy EA, Scott AC, Fiskerstrand CE, Bubb VJ, Quinn JP (2003) The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to affective disorders has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit. *Eur J Neurosci*; 17:417–420.

Lubin FD (2012) Epileptogenesis can the science of epigenetics give us the answers? *Epilepsy Curr*; 12:105—10.

Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD (2008) Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci*; 28:10576–10586.

MacKenzie A, Quinn J (1999) A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has alleledependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96:15251–15255.

Magiorkinis E, Diamantis A, Sidiropoulou K, Panteliadis C (2014) Highlights in the history of epilepsy: the last 200 years. *Epilepsy Res Treat*; 582039.

Manna I, Labate A, Gambardella A, Forabosco P, La Russa A, Le Piane E, Aguglia U, Quattrone A (2007) Serotonin transporter gene (5-Htt): association analysis with temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett*; 421(1):52–56.

Marino Jr. R, Cukiert A, Pinho E (1986) Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo. Um estudo da prevalência. *Arq Neuropsiquiatr*; 44(3):243-54.

Martinez A, Finegersh A, Cannon DM, Dustin I, Nugent A, Herscovitch P, Theodore WH (2013) The 5-HT_{1A} receptor and 5-HT transporter in temporal lobe epilepsy. *Neurology*; 80(16):1465-1471.

Martínez-Levy GA, Cruz-Fuentes CS (2014) Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. *Yale J Biol Med*; 87(2):173-186.

Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*; 302:890–893.

Martinowich K, Manji H, Lu B (2007) New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci*; 10:1089–1093.

Masia SL, Devinsky O (2000) Epilepsy and behavior: A brief history. *Epilepsy Behav*; 1(1):27-36.

Mateus-Pinheiro M, Pinto L, Sousa N (2011) Epigenetic (de)regulation of adult hippocampal neurogenesis: Implications for depression. *Clin Epigenetics*; 3:5.

McNamara JO, Huang YZ, Leonard AS (2006) Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci STKE*; (356):re12.

Meyer-Lindenberg A (2009) Neural connectivity as an immediate phenotype: brain networks under genetic control. *Hum Brain Mapp*; 30:1938–1946.

Merienne K, Pannetier S, Harel-Bellan A, Sassone-Corsi P (2001) Mitogen-regulated RSK2-CBP interaction controls their kinase and acetylase activities. *Mol Cell Biol*; 21:7089–7096.

Migheli F, Stoccoro A, Coppedè F, Wan Omar WA, Failli A, Consolini R, Seccia M, Spisni R, Miccoli P, Mathers JC, Migliore L (2013) Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of APC and CDKN2A gene methylation. *PLoS One*; 8(1):e52501.

Miller-Delaney SF, Das S, Sano T, Jimenez-Mateos EM, Bryan K, Buckley PG, Stallings RL, Henshall DC (2012) Differential DNA methylation patterns define status epilepticus and epileptic tolerance. *J Neurosci*; 31:1577—1588.

Miller-Delaney SF, Bryan K, Das S, McKiernan RC, Bray IM, Reynolds JP, Gwinn R, Stallings RL, Henshall DC (2015) Differential DNA methylation profiles of coding and non-coding genes define hippocampal sclerosis in human temporal lobe epilepsy. *Brain*; 138(Pt 3):616-631.

Mitchelmore C, Gede L (2014) Brain Derived Neurotrophic Factor: epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Brain Res*; 1586:162-172.

Moore LD, Le T, Fan G (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*; 38(1):23-38.

Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ (2004) Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol*; 73(1):1-60.

Mössner R, Daniel S, Albert D, Heils A, Okladnova O, Schmitt A, Lesch KP (2000) Serotonin transporter function is modulated by brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) but not nerve growth factor (*NGF*). *Neurochem Int*; 36:197–202.

Mössner R, Henneberg A, Schmitt A, Syagailo YV, Grässle M, Hennig T, Simantov R, Gerlach M, Riederer P, Lesch KP (2001) Allelic variation of serotonin transporter expression is associated with depression in Parkinson's disease. *Mol Psychiatry*; 6: 350–352.

Moura Lima E, Ferreira Leal M, Cardoso Smith Mde A, Rodríguez Burbano R, Pimentel de Assumpção P, Bello MJ, Rey JA, Ferreira de Lima F, Casartelli C (2008) DNA mismatch repair gene methylation in gastric cancer in individuals from northern Brazil. *Biocell*; 32(3):237-243.

Munafo MR, Clark TG, Moore LR, Payne E, Walton R, Flint J (2003) Genetic polymorphisms and personality in healthy adults: A systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*; 8(5):471–484.

Mundo E, Walker M, Cate T, Macciardi F, Kennedy J (2001) The role of the serotonin transporter protein gene in antidepressant-induced mania in bipolar disorder: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry*; 58:539–544.

Munzel M, Globisch D, Bruckl T, Wagner M, Welzmler V, Michalakis S, Muller M, Biel M, Carell T (2010) Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angew Chem Int Ed Engl*; 49:5375–5377.

Murrell A, Rakyan VK, Beck S (2005) From genome to epigenome. *Hum Mol Genet*; 14:R3–R10.

Nagahara AH, Tuszynski MH (2011) Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov*; 10(3):209-219.

Nagarajan RP, Costello JF (2009) Molecular epigenetics and genetics in neuro-oncology. *Neurotherapeutics*; 6(3):436-446.

Nakata K, Ujike H, Sakai A, Uchida N, Nomura A, Imamura T, Katsu T, Tanaka Y, Hamamura T, Kuroda S (2003) Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder. *Neurosci Lett*; 337:17–20.

Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM (2008) Activity-dependent suppression of miniature neurotransmission through the regulation of DNA methylation. *J Neurosci*; 28:395–406.

Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy J (2002) The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet*; 71:651–655.

Novik KL, Nimmrich I, Genc B, Maier S, Piepenbrock C, Olek A, Beck S (2002) Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr. Issues Mol Biol*; 4: 111–128.

Olsson CA, Foley DL, Parkinson-Bates M, Byrnes G, McKenzie M, Patton GC, Morley R, Anney RJ, Craig JM, Saffery R (2010) Prospects for epigenetic research within cohort studies of psychological disorder: a pilot investigation of a peripheral cell marker of epigenetic risk for depression. *Biological Psychology*; 83:159e65.

Palmini CJ (1998) Introdução à epilepsia clínica e classificação das epilepsias e crises epiléticas. In: *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias*, volume II, Ed Lemos, São Paulo.

Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S (2011) DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *J Vis Exp*; (56) pii:3170.

Perroud N, Salzmann A, Prada P, Nicastro R, Hoeppli ME, Furrer S, Ardu S, Krejci I, Karege F, Malafosse A (2013) Response to psychotherapy in borderline personality disorder and methylation status of the BDNF gene. *Transl Psychiatry*; 3:e207.

Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ, Breuning MH (1995) Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional coactivator CBP. *Nature*; 376: 348–351.

Philibert R, Madan A, Andersen A, Cadoret R, Packer H, Sandhu H (2007) Serotonin transporter mRNA levels are associated with the methylation of an upstream CpG island. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*; 144B(1):101-105.

Philibert RA, Sandhu H, Hollenbeck N, Gunter T, Adams W, Madan A (2008) The relationship of 5HTT (SLC6A4) methylation and genotype on mRNA expression and liability to major depression and alcohol dependence in subjects from the Iowa adoption studies. *American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics*; 147B:543e9.

Pitkanen A, Lukasiuk K (2011) Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol*; 10:173–186.

Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*; 2:24–32.

Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T (2007) Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*; 90(3):397–406.

Pulido Fontes L, Quesada Jimenez P, Mendioroz Iriarte M (2015) Epigenetics and epilepsy. *Neurologia*; 30(2):111–118.

Qureshi IA, Mehler MF (2010a) Epigenetic mechanisms underlying human epileptic disorders and the process of epileptogenesis. *Neurobiol Dis*; 39:53–60.

Qureshi IA, Mehler MF (2010b). Emerging role of epigenetics in stroke: part 1: DNA methylation and chromatin modifications. *Arch Neurol*; 67:1316–1322.

Qureshi IA, Mehler MF (2011) Epigenetics, nervous system tumors, and cancer stem cells. *Cancers*; 3:3525–3556.

Rakyan VK1, Hildmann T, Novik KL, Lewin J, Tost J, Cox AV, Andrews TD, Howe KL, Otto T, Olek A, Fischer J, Gut IG, Berlin K, Beck S (2004) DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biol*; 2:e405.

Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD (1993) Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90(6):2542–2546.

Ramsahoye BH (2002) Measurement of genome-wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods*; 27:156–161.

Ramsahoye BH (2002) Nearest-neighbor analysis. *Methods Mol Biol*; 200:9–15.

Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI (2012) Epigenetic modification in frontal cortex from Alzheimer disease and bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry*; 2:e132.

Ravi B, Kannan M (2013) Epigenetics in the nervous system: An overview of its essential role. *Indian J Hum Genet*; 19(4):384-391.

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT (2007) High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*; 8(6):597-608.

Riggs AD (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet*; 14(1):9-25.

Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*; 6:597–610.

Rodríguez-Dorantes M, Tellez-Ascensio N, Cerbón MA, López M, Cervantes A (2004) Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Invest Clin*; 56:56—71.

Roelfsema JH, White SJ, Ariyürek Y, Bartholdi D, Niedrist D, Papadia F, Bacino CA, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Breuning MH, Hennekam RC, Peters DJ (2005) Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease. *Am J Hum Genet*; 76:572–580.

Roopra A, Dingleline R, Hsieh J (2012) Epigenetic and epilepsy. *Epilepsia*; 53:2—10.

Ryley Parrish R, Albertson AJ, Buckingham SC, Hablitz JJ, Mascia KL, Davis Haselden W, Lubin FD (2013) Status epilepticus triggers early and late alterations in brain-derived neurotrophic factor and NMDA glutamate receptor Grin2b DNA methylation levels in the hippocampus. *Neuroscience*; 248:602-619.

Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condron MM, Teplow DB, Haass C (2001) Presenilin-dependent γ -secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep*; 2:835–841.

Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M (2005) DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J Cell Physiol*; 204(1):21-35.

Scharfman HE (2002) Epilepsy as an example of neural plasticity. *Neuroscientist*; 8(2):154–173.

Scharfman HE (2005) Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy—a missing link? *Epilepsy Curr*; 5(3):83–88.

Scheffer IE, Berkovic SF, Capovilla G, Connolly MB, Guilhoto L, Hirsch E, Moshe SL,

Nordli D, Yue-HuaZhang, Zuberi SM (2013) The Organization of the Epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology. Disponível em: <http://www.ilae.org/visitors/centre/Documents/OrganizationEpilepsy.pdf>

Acessado em: 24 Jun. 2015.

Schenkel LC, Bragatti JA, Torres CM, Martin KC, Gus-Manfro G, Leistner-Segal S, Bianchin MM (2011) Serotonin transporter gene (5HTT) polymorphisms and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*; 95(1-2):152-157.

Schenkel LC, Bragatti JA, Becker JA, Torres CM, Martin KC, de Souza AC, Manfro GG, Leistner-Segal S, Bianchin MM (2012) Serotonin gene polymorphisms and psychiatry comorbidities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*; 99(3):260-266.

Schuman EM (1999) Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol*; 9:105-109.

Selkoe DJ (1998) The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*; 8:447–453.

Sen S, Nesse RM, Stoltenberg SF, Li S, Gleiberman L, Chakravarti A, Weder AB, Burmeister M (2003) A BDNF coding variant is associated with the NEO personality inventory domain neuroticism, a risk factor for depression. *Neuropsychopharmacology*; 28:397–401.

Senner CE (2011) The role of DNA methylation in mammalian development. *Reprod Biomed Online*; 22:529–535.

Sha'ari HM, Haerian BS, Baum L, Tan HJ, Rafia MH, Kwan P, Cherny SS, Sham PC, Gui H, Raymond AA, Lim KS, Mohamed Z (2015) Association of BDNF Polymorphisms with the Risk of Epilepsy: a Multicenter Study. *Mol Neurobiol*; Apr 16. [Epub ahead of print].

Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*; 22:3251–3261.

Song YJ, Tian XB, Zhang S, Zhang YX, Li X, Li D, Cheng Y, Zhang JN, Kang CS, Zhao W (2011) Temporal lobe epilepsy induces differential expression of hippocampal miRNAs including let-7e and miR-23a/b. *Brain Res*; 28:134–140.

Sperk G, Drexel M, Pirker S (2009) Neuronal plasticity in animal models and the epileptic human hippocampus. *Epilepsia*; 50(Suppl) 12:29–31.

Stefulj J, Bordukalo-Niksic T, Hecimovic H, Demarin V, Jernej B (2010) Epilepsy and serotonin (5HT): variations of 5HT-related genes in temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett*; 478(1):29-31.

Stoltenberg SF1, Twitchell GR, Hanna GL, Cook EH, Fitzgerald HE, Zucker RA, Little KY (2002) Serotonin transporter promoter polymorphism, peripheral indexes of serotonin function, and personality measures in families with alcoholism. *Am J Med Genet*; 114(2):230–234.

Sundqvist A (2002) Epilepsy: a clinical diagnostic overview. *Eur J Pain*; 6(Suppl A):21-25.

Swinkels WAM, Kuyk J, Van Dyck R, Spinhoven Ph (2005) Psychiatric comorbidity in epilepsy. *Epilepsy Behav*; 7:37-50.

Tadić A, Müller-Engling L, Schlicht KF, Kotsiari A, Dreimüller N, Kleimann A, Bleich S, Lieb K, Frieling H (2014) Methylation of the promoter of brain-derived neurotrophic factor exon IV and antidepressant response in major depression. *Mol Psychiatry*; 19(3):281-283.

Temkin O (1994) *The Falling Sickness: A History of Epilepsy from the Greeks to the Beginnings of Modern Neurology*. Second edition. 467 pp. Baltimore, Johns Hopkins University Press.

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*; 25:5455–5463.

Theodore WH (2003) Does serotonin play a role in epilepsy? *Epilepsy Curr*; 3(5):173–177.

Thoenen H (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*; 270:593-598.

Thoenen H (2000) Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog Brain Res*; 128:183-191.

Thomas RH, Berkovic SF (2014) The hidden genetics of epilepsy-a clinically important new paradigm. *Nat Rev Neurol*; 10(5):283-292.

Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, Persson H (1993) Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*; 10(3):475-489.

Tsankova NM, Kumar A, Nestler EJ (2004) Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci*; 24:5603—5610.

Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ (2007) Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*; 8(5):355-367.

Urduingio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M (2009) Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol*; 8:1056–1072.

Urnov FD, Wolffe AP (2001) Above and within the genome: epigenetics past and present. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*; 6(2):153-167.

van IJzendoorn MH, Caspers K, Bakermans-Kranenburg MJ, Beach SR, Philibert R (2010) Methylation matters: interaction between methylation density and serotonin transporter genotype predicts unresolved loss or trauma. *Biol Psychiatry*; 68(5):405-407.

Veenstra-VanderWeele J, Anderson GM, Cook EH (2000) Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. *Eur J Pharmacol*; 410:165–181.

Ventriglia M, Bocchio Chiavetto L, Benussi L, Binetti G, Zanetti O, Riva MA, Gennarelli M (2002) Association between the BDNF 196 A/G polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*; 7:136–137.

Vo N, Goodman RH (2001) CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem*; 276:13505–13508.

von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci*; 117:4435–4448.

Wang D, Szyf M, Benkelfat C, Provençal N, Turecki G, Caramaschi D, Côté SM, Vitaro F, Tremblay RE, Booij L (2012) Peripheral SLC6A4 DNA methylation is associated with in vivo measures of human brain serotonin synthesis and childhood physical aggression. *PLoS One*; 7:e39501.

Weeber EJ, Levenson JM, Sweatt JD (2002) Molecular genetics of human cognition. *Mol Interv*; 2(6):376-391, 339.

Weickert CS, Hyde TM, Lipska BK, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE (2003) Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry*; 8:592–610.

West AE (2008) Biological functions of activity-dependent transcription revealed. *Neuron*; 60:523–525.

Whitaker-Azmitia PM, Druse M, Walker P, Lauder JM (1996) Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res*; 73:19–29.

WHO 2005 Atlas: Epilepsy Care in the World. Geneva: World Health Organization.

Williams-Karnesky RL, Sandau US, Lusardi TA, Lytle NK, Farrell JM, Pritchard EM, Kaplan DL, Boison D (2013) Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis. *J Clin Invest*; 123(8):3552-3563.

Wittwer CT (2009) High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat*; 30(6):857-859.

Wojdacz TK, Dobrovic A (2007) Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res*; 35(6):e41.

Wolffe AP, Matzke MA (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science*; 286(5439):481-486.

World Health Organization (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/> Acessado em: 23 Jun. 2015.

Zaidi SK, Young DW, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS (2011) Bookmarking the genome: maintenance of epigenetic information. *J Biol Chem*; 286(21):18355-61.

Zhu Q1, Wang L, Zhang Y, Zhao FH, Luo J, Xiao Z, Chen GJ, Wang XF (2012) Increased expression of DNA methyltransferase 1 and 3 in human temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci*; 46:420—426.

11. Artigos

11.1. Artigo 1

Methylation profile analysis of *BDNF* promoters I and IV in patients with temporal lobe epilepsy

Isabel Cristina Bandeira^{1,2}; Lucas Giombelli²; Ágata Mantese de Carvalho²; Mariana Fitarelli-Kiehl^{3,4}; Isabel Cristina Werlang^{1,2}; Ana Lucia Abujamra^{1,2}, Sandra Leistner-Segal^{2,5}; Marino Muxfeldt Bianchin^{1,2,6}

1. Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil
2. Basic Research and Advanced Investigations in Neurology, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
3. Genomic Medicine Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
4. Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil
5. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
6. Division of Neurology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Address correspondence to:

Marino M. Bianchin, mmbianchin@hotmail.com

B.R.A.I.N.; Experimental Research Centre Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Ramiro Barcelos, 2350,
Porto Alegre, RS, Brasil, 90035-903

Abstract

Epilepsy is a disorder primarily characterized by the spontaneous recurrence of unprovoked seizures that can be triggered by multiple factors. The cellular mechanism known as methylation is the most studied epigenetic change and its occurrence in the promoter region of a gene can lead to its silencing and loss of function. We analyze 172 patients with temporal lobe epilepsy (TLE), selected from the Epilepsy Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) for *BDNF* gene promoters I and IV methylation status and its correlation with TLE. Patients with epilepsy showed increased *BDNF* methylation in promoter I and decreased methylation in promoter IV when compared to controls. No differences of methylation status of the promoters studied and main features of TLE were observed. It is believed that selective changes in DNA methylation in *BDNF* promoter regions may turn out to highlight the relation of epigenetic factors in epilepsy. Our results need to be confirmed by future studies and the contribution of selective *BDNF* methylation for epileptogenesis or epilepsy characteristics needs to be further explored.

Keywords: Temporal Lobe Epilepsy, *BDNF*, Methylation

Introduction

Epilepsy is a disorder primarily characterized by the spontaneous recurrence of unprovoked seizures associated with diverse factors, including genetic predispositions or abnormalities, head injury, toxins, fever, tumors, electrolyte imbalance, among others (1, 2). These seizures reflect an abnormal electrical activity that occurs mainly in one or more areas of the cerebral cortex reflecting numerous structural or neurochemical dysfunctions (3, 4). Epilepsy may be associated with different pathogenic mechanisms, seizure patterns and frequencies, comorbid conditions (e.g., neurological and neuropsychiatric disorders), pharmacological therapeutic responses and different prognosis.

The role of DNA methylation is complex and, with some disruption in the process, it may be associated with processes such as carcinogenesis, for example. Aberrant DNA methylation involves global hypomethylation of the genome and specific CpG island hypermethylation, both associated with

changes in chromatin (6). Methylation mechanism is the most studied epigenetic change and occurs through the addition of a methyl radical in the cytosine base adjacent to guanine. The methylation occurrence in the promoter region of a gene can lead to its silencing and loss of function (7, 8).

Epigenetics can be defined as the study of inheritance of changes in gene expression that occur with no modifications in the DNA sequence. Epigenetic processes may be modified by physical, chemical, nutritional, psychosocial factors, among others (9-11). Epigenetic processes are involved in gene expression regulating mechanisms that determine expression or silencing and also where, when, and how intensely genes are expressed (12) Epigenetic mechanisms has shown important determinants of how genes are regulated in health and disease, including epilepsy (13-17).

BDNF gene encoding brain-derived neurotrophic factor (BDNF), is a member of neurotrophins family, and is related to differentiation, maturation, survival and cell death (18, 19). BDNF has important effects in neurotransmission such as glutamatergic, GABAergic, serotonergic and dopaminergic systems (20-22). BDNF is present in the central nervous system during development and adulthood and is regulated by a variety of physiologic and pathologic states. In general, besides the trophic effects on target neurons, BDNF appears to be a general mechanism for activity-dependent changes of synapses in the CNS development and in adult. Abnormal trophic support diseases (such as neurodegenerative diseases) and abnormal excitability diseases (such as epilepsy) may be associated in some cases with BDNF abnormal signaling (23). Here we analyze methylation changes in promoters I and IV of the *BDNF* gene in samples from patients with temporal lobe epilepsy.

Methods

Patients and Samples

The cases were 172 patients with TLE, selected from the Epilepsy Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The control group consisted of 158 healthy unrelated subjects that don't have psychiatric disease. To confirm that information all controls were evaluated with a clinical interview and the Mini International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.). This group is

composed to 39 male (24.7%) and 119 female (75.3%). Inclusion criteria for the patient group were based on the ILAE's (International League Against Epilepsy) classification and neuroimaging results (24). The Ethics Committee of the institution, in accordance with the Declaration of Helsinki, approved the study and all subjects provided written informed consent to participate.

DNA processing and HRM analysis

Genomic DNA was extracted using *salting-out* method previously described by Miller et al. (1988) (25). For the methylation profile analysis the sodium bisulphite treatment of DNA samples was carried out and consisted in the conversion of unmethylated cytosines to uracil. If the cytosine is methylated this change will not occur. The conversion was carried out by using EpiTect bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Methylation profile analysis was performed using High Resolution Melting method on equipment StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). We accessed two promoter regions of *BDNF* gene, I and IV. The primers used were previously described by D'addario and colleagues (2012) (26) and Ikegame and colleagues (2013b) (27). As a methylated/unmethylated control, we used Cells-to-CpG Methylated and Unmethylated gDNA Control Kit (Applied Biosystems®). To create the range of methylated and unmethylated dilutions, the controls were mixed to obtain the following ratios of methylation: 0%, 25%, 75%, and 100%. Standard curves with known methylation ratios were included in each assay and were used to deduce the methylation ratio of each sample.

All analyses were run according to the following conditions: Holding step (95°C for 10min), 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1 minute, followed by an HRM step of 95°C for 10s, 60°C for 1 minute, 95°C for 15s, and 60°C for 15s, with continuous acquisition per 0.2°C. HRM mix was performed in a final volume of 10uL, containing 5uL of MeltDoctor (Applied Biosystems), 5 pmol of each primer and 1uL (almost 20 ng/uL) of bisulfite modified DNA samples. Each reaction was performed in duplicate. After amplification by HRM, all samples of interest were purified and sequenced by Sanger's method to confirm our results. The sequences were aligned using the Bioedit program's *CLUSTALW*

algorithm, manually inspected. The curve points below 50% were considered unmethylated and the points above this value were considered methylated.

Statistical analysis

We assessed statistical differences of the methylation status of two *BDNF* gene promoters (I and IV) between controls and TLE patients. The patient group was studied, evaluating clinical variables related to the epileptogenic process. The variables studied were age, sex, seizure control, family history and duration of epilepsy. Good seizure control was defined as no seizure during the last year. Data were analyzed statistically by Fisher's Exact Test for qualitative variables. For quantitative variables we used the independent T-test with Levene's test for equality of variances. Qualitative variables are expressed as percentage with odds ratio (95% C.I.). Quantitative variables are expressed as mean \pm SD. All statistical analyses were carried out with the SPSS statistical package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results were significant if *p* was lower than 0.05.

Results

Clinical characteristics

Frequency of methylation of patients and controls are presented in Table 1. Patients with epilepsy showed statistically significant differences in promoters I and IV of *BDNF* when compared with controls. Interestingly, patients showed increased methylation in promoter I ($P < 0.047$) and decreased methylation in promoter IV when compared to controls without epilepsy ($P < 0.005$). Considering only patients with epilepsy, methylation frequency for the *BDNF* gene promoters was 9.3% (N=16) for TLE cases and the unmethylated cases was 90.7% (N=156). There were no statistical differences between methylation status of the promoters and main features of TLE, like sex, age, age of onset, mean age at epilepsy, family history and other important variables related to medication. Figure 1 shows the methylation patterns used to determine methylation status of each TLE sample.

In our study, the TLE patients had a mean age of 44.21 ± 12.9 years for unmethylated status and 43.13 ± 10.4 for methylated. The entire group consists

of 112 (65.1%) females and 60 (34.9%) males. The mean duration of epilepsy was 25.6 years for unmethylated samples and 23.0 for methylated. There were no significant differences in age, gender and other features amongst the TLE group (Tables 2 and 3).

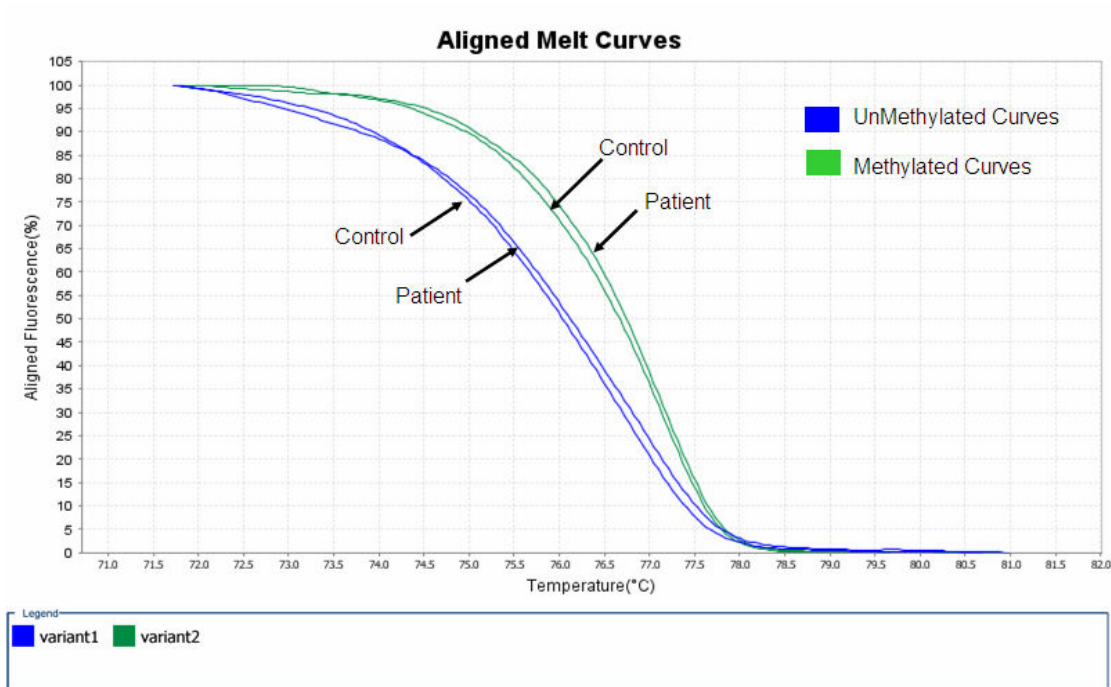


Figure 1. Aligned melt curves representing methylation controls versus patients. The image shows two TLE samples compared to methylation controls showing the similarity of the aligned curves, the range of unmethylated curve was 0% to 25% and for the methylated status was 75% to 100%.

Table 1. Frequency of *BDNF* promoters methylation in patients and controls.

		ELT patients	Controls	Odds Ratio (95% Confidence Interval)	<i>P</i> value
BDNF PI	Unmethylated	159 (92.4%)	154 (97.5%)		
	Methylated	13 (7.6%)	4 (2.5%)	3.1 (1 - 9.9)	0.047
BDNF PIV	Unmethylated	169 (98.3%)	144 (91.1%)		
	Methylated	3 (1.7%)	14 (8.9%)	5.5 (1.5 – 19.4)	0.005

Table 2. Clinical variables according to *BDNF* promoter I methylation status.

Variable	Unmethylated	Methylated	Odds Ratio (95% Confidence Interval)	P value
Mean age at Epilepsy				
(in years - SD)	44.2 (13.0)	42.5 (8.4)		0.494
Epilepsy age of onset				
(in years - SD)	18.1 (14.2)	21.6 (16.9)		0.474
Mean duration of Epilepsy				
(in years – SD*)	25.7 (13.8)	21.1 (16.2)		0.336
Sex				
Male	56 (35.2%)	4 (30.8%)		
Female	103 (64.8%)	9 (69.2%)	0.8 (0.2 - 2.8)	1.000
Family History of Epilepsy				
Negative	108 (67.9%)	7 (53.8%)		
Positive	51 (32.1%)	6 (46.2%)	1.8 (0.6 - 5.7)	0.361
Control of Seizures				
Controlled	72 (45.3%)	6 (46.2%)		
Not Controlled	87 (54.7%)	7 (53.8%)	0.97 (0. 3- 3.0)	1.000
Interictal EEG				
Unilateral	88 (55.3%)	10 (76.9%)		
Bilateral	71 (44.7%)	3 (23.1%)	0.4 (0.09 – 1.4)	0.155
Antiepileptic drugs				
Monotherapy	80 (50.3%)	8 (61.5%)		
Polytherapy	79 (49.7%)	5 (38.5%)	1.5 (0.5 – 4.5)	0.620
Benzodiazepines use				
No	134 (84.3%)	11 (84.6%)		
Yes	25 (15.7%)	2 (15.4%)	0.8 (0.2 – 4.7)	1.000
Psychotropic drugs				
No	134 (84.3%)	9 (69.2%)		
Antidepressants	20 (12.6%)	4 (30.8%)		
Association	5 (3.1%)	0 (0%)		0.166

Table 3. Clinical variables according to *BDNF* promoters I and IV methylation status.

Variable	Unmethylated	Methylated	Odds Ratio (95% Confidence Interval)	P value
Mean age at Epilepsy				
(in years - SD)	44.2 (12.9)	43.1 (10.4)		0.702
Epilepsy age of onset				
(in years - SD)	18.2 (14.2)	20.3 (15.5)		0.598
Mean duration of Epilepsy				
(in years – SD*)	25.6 (13.7)	23.0 (17.0)		0.566
Sex				
Male	55 (35.3%)	5 (31.2%)		
Female	101 (64.7%)	11 (68.8%)	0.8 (0.3 - 2.5)	1.000
Family History of Epilepsy				
Negative	107 (68.6%)	8 (50.0%)		
Positive	49 (31.4%)	8 (50.0%)	2.2 (0.7 - 6.1)	0.165
Control of Seizures				
Controlled	70 (44.9%)	8 (50.0%)		
Not Controlled	86 (55.1%)	8 (50.0%)	0.8 (0.3 - 2.3)	0.794
Interictal EEG				
Unilateral	88 (56.4%)	10 (62.5%)		
Bilateral	68 (43.6%)	6 (37.5%)	0.8 (0.3 – 2.2)	0.793
Antiepileptic drugs				
Monotherapy	79 (50.6%)	9 (56.2%)		
Polytherapy	77 (49.4%)	7 (43.8%)	0.8 (0.3 – 2.2)	0.860
Benzodiazepines use				
No	132 (84.6%)	13 (81.3%)		
Yes	24 (15.4%)	3 (18.7%)	1.3 (0.3 – 4.8)	0.720
Psychotropic drugs				
No	131 (84.0%)	12 (75.0%)		
Antidepressants	20 (12.8%)	4 (25.0%)		
Association	5 (3.2%)	0 (0%)		0.334

Discussion

The present study investigated the effect of methylation in the promoters I and IV of *BDNF* gene on the clinical variables in patients with temporal lobe epilepsy. Patients with epilepsy showed increased methylation in exon I and decreased methylation in exon IV when compared with controls. No association was found between the methylation status and clinical characteristics of patients with epilepsy. D'Addario et al. (2012) found a correlation between increased methylation status in *BDNF* exon I promoter and the treatment used by bipolar patients. Higher levels of DNA methylation were observed in BD subjects on pharmacological treatment with mood stabilizers plus antidepressants compared with those exclusively on mood-stabilizing agents. Moreover, among the different pharmacological therapies, lithium and valproate were associated with a significant reduction of DNA methylation compared with other drugs, showing that changes can occur in DNA methylation of *BDNF* promoter mediated by epigenetic factors (26). In another study of the same group, there was a similar correlation between these variables in patients with major depression. Patients in treatment with antidepressants showed higher methylation than patients who intake a combination of antidepressants and mood stabilizers (28).

DNA methylation levels are known to be affected by several confounding factors, such as tissue type, age, medication status, gender and others (29). Only DNA methylation status of promoters I and IV were studied and they were found to be tightly regulated in physiological conditions. In response to environmental stimuli, methylation levels of these promoters can be actively increased or decreased and transcription from these promoters may be altered (30). Ikegame et al. (2013b) examined blood samples from patients with schizophrenia and did not observe significant correlations between age, gender and DNA methylation level at any CpG site of promoters I or IV of *BDNF* gene. Furthermore, they noted that DNA methylation levels of 4 CpG sites in promoter IV were very comparable between the brain and blood, which seems to indicate the plausibility of using this biological material in these analyzes (27). Parrish et al. (2015) presented recently an experimental study of *BDNF* gene in ELT animal model, evaluating the relation

between methylation and memory consolidation. They found a decreased *BDNF* DNA methylation levels strongly correlated with abnormally high levels of *BDNF* mRNA in the epileptic hippocampus during memory consolidation (31). The results of this work suggest that aberrant DNA methylation mediated gene transcription contributes to TLE-associated memory deficits.

Kobow & Blumcke proposed the "*methylation hypothesis*," which suggests that epigenetic mechanisms such as DNA methylation and histone modifications in the tails can cause changes in chromatin structure and consequently gene expression, which could play a crucial role in the process of epileptogenesis (32). It is believed that selective changes in DNA methylation of *BDNF* promoter regions may turn out to highlight the relation of epigenetic factors in epilepsy, providing new insight into the mechanisms of gene expression. Also, further knowledge about how genetic and epigenetic mechanisms can influence the patient's progression, by observing how *BDNF* might be regulated, could offer new insights into epileptogenesis and the development of new drugs for epilepsy treatment (26).

Our study also has some limitations. First, methylation status was investigated only in two small regions of *BDNF* gene. Further studies in other CpG islands for this gene, and genome-wide DNA methylation are therefore needed. Second, the *BDNF* promoter methylation profile could be tissue-specific. Because our results on methylation status were drawn from genomic DNA isolated from leukocytes, it is not clear in what extension it correlates with nervous system tissue or specific cells. Finally, we had a limited sample size for detecting associations particularly with *BDNF* gene-methylation interactions. Nevertheless, we observe interesting differences that might help to elucidate adaptative mechanisms of *BDNF* pathway in patients with epilepsy.

Conclusions

We observed different levels of methylation in promoters of *BDNF* gene when compared with controls, but no differences in main clinical variables of epilepsy. These differences could reflect mechanisms of epileptogenicity or alternatively, adaptative mechanisms of *BDNF* pathway in patients with epilepsy.

Further studies are necessary to confirm our observations and to elucidate the importance of these differences in epilepsy.

Acknowledgments

This study was supported by Research Incentive Fund (FIPE-HCPA), PRONEM/FAPERGS and CNPq. A special thanks for Prof. Dr. Patrícia Ashton Prolla and your research group of Genomic Medicine Laboratory for technical support in HRM analysis.

References

1. Loscher W, Brandt C (2010) Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev*; 62:668–700.
2. Foti SB, Roskams AJ (2011) A tale of two epiphenomena: The complex interplay of epigenetics and epilepsy, underlying mechanisms of epilepsy. *Tech*.
3. Palmieri CJ (1998) Introdução à epilepsia clínica e classificação das epilepsias e crises epilépticas. In: *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias*, volume II, Ed Lemos, São Paulo.
4. Chang BS, Lowenstein DH (2003) Epilepsy. *N Engl J Med*; 349(13):1257-66.
5. Qureshi IA, Mehler MF (2014) Sex, epilepsy, and epigenetics. *Neurobiol Dis*; 72 Pt B:210-216.
6. Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M (2005) DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J Cell Physiol*; 204(1):21-35.

7. Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*; 16:6-21.
8. Moura Lima E, Ferreira Leal M, Cardoso Smith Mde A, Rodríguez Burbano R, Pimentel de Assumpção P, Bello MJ, Rey JA, Ferreira de Lima F, Casartelli C (2008) DNA mismatch repair gene methylation in gastric cancer in individuals from northern Brazil. *Biocell*; 32(3):237-243.
9. Akbarian S, Beerli MS, Haroutunian V. Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition. *JAMA Neurol*. 2013;70:711—8.
10. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet*. 2012;13:97—109.
11. Feil R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutat Res*. 2006;600:46—57.
12. Fontes LP, Quesada Jimenez P, Mendioroz Iriarte M (2015) Epigenetics and epilepsy. *Neurologia*; 30(2):111-118.
13. Kobow K, Blümcke I (2011) The methylation hypothesis: do epigenetic chromatin modifications play a role in epileptogenesis? *Epilepsia*; 52 Suppl 4:15-19.
14. Lubin FD (2012) Epileptogenesis can the science of epigenetics give us the answers? *Epilepsy Curr*; 12:105—10.
15. Roopra A, Dingledine R, Hsieh J (2012) Epigenetic and epilepsy. *Epilepsia*; 53:2—10.

16. Boison D, Sandau US, Ruskin DN, Kawamura M Jr, Masino SA. Homeostatic control of brain function - new approaches to understand epileptogenesis. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 109.
17. Miller-Delaney SF, Das S, Sano T, Jimenez-Mateos EM, Bryan K, Buckley PG, Stallings RL, Henshall DC (2012) Differential DNA methylation patterns define status epilepticus and epileptic tolerance. *J Neurosci*; 31:1577—1588.
18. Hashimoto K (2007) *BDNF* variant linked to anxiety-related behaviors. *BioEssays*; 29:116–119.
19. Louhivuori V, Arvio M, Soronen P, Oksanen V, Paunio T, Castrén ML (2009) The Val66Met polymorphism in the *BDNF* gene is associated with epilepsy in fragile X syndrome. *Epilepsy Res*; 85(1):114-117.
20. Mössner R, Daniel S, Albert D, Heils A, Okladnova O, Schmitt A, Lesch KP (2000) Serotonin transporter function is modulated by brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) but not nerve growth factor (NGF). *Neurochem Int*; 36:197–202.
21. Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P (2001) *BDNF* controls dopamine D 3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature*; 411:1079–1088.
22. Carvalho AL, Caldeira MV, Santos SD, Duarte CB (2008) Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *BR J Pharmacol*; 153(suppl 1):S310–S324.
23. Binder DK (2004) The role of *BDNF* in epilepsy and other diseases of the mature nervous system. *Adv Exp Med Biol*; 548:34-56.

24. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010;51(4):676-85.
25. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
26. D'Addario C, Dell'osso B, Palazzo MC, Benatti B, Lietti L, Cattaneo E, Galimberti D, Fenoglio C, Cortini F, Scarpini E, Arosio B, Di Francesco A, Di Benedetto M, Romualdi P, Candeletti S, Mari D, Bergamaschini L, Bresolin N, Maccarrone M, Altamura AC (2012) Selective DNA Methylation of BDNF Promoter in Bipolar Disorder: Differences Among Patients with BDI and BDII. *Neuropsychopharmacology*; 37(7):1647-1655.
27. Ikegame T, Bundo M, Sunaga F, Asai T, Nishimura F, Yoshikawa A, Kawamura Y, Hibino H, Tochigi M, Kakiuchi C, Sasaki T, Kato T, Kasai K, Iwamoto K (2013b) DNA methylation analysis of BDNF gene promoters in peripheral blood cells of schizophrenia patients. *Neurosci Res*; 77(4):208-214.
28. D'Addario C, Dell'Osso B, Galimberti D, Palazzo MC, Benatti B, Di Francesco A, Scarpini E, Altamura AC, Maccarrone M (2013) Epigenetic modulation of BDNF gene in patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry*; 73(2):e6-7.
29. Nishioka, M., Bundo, M., Kasai, K., Iwamoto, K., 2012. DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. *Genome Med.* 4, 96.

30. Ikegame T, Bundo M, Murata Y, Kasai K, Kato T, Iwamoto K (2013a) DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. *J Hum Genet*; 58(7):434-438.

31. Parrish RR, Buckingham SC, Mascia KL, Johnson JJ, Matyjasik MM, Lockhart RM, Lubin FD (2015) Methionine increases BDNF DNA methylation and improves memory in epilepsy. *Ann Clin Transl Neurol*; 2(4):401-416.

32. Kobow K, Blümcke I (2011) The methylation hypothesis: do epigenetic chromatin modifications play a role in epileptogenesis? *Epilepsia*; 52 Suppl 4:15-19.

11.2. Artigo 2

Methylation of *BDNF* and *SLC6A4* gene promoters in patients with temporal lobe epilepsy presenting psychiatric comorbidities

Isabel Cristina Bandeira^{1,2}; Lucas Giombelli²; Ágata Mantese de Carvalho²; Mariana Fitarelli-Kiehl^{3,4}; Isabel Cristina Werlang^{1,2}; Ana Lucia Abujamra^{1,2}, Sandra Leistner-Segal^{2,5}; Marino Muxfeldt Bianchin^{1,2,6}

1. Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

2. Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

3. Genomic Medicine Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

4. Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

5. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

6. Division of Neurology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Address correspondence to:

Marino M. Bianchin, mmbianchin@hotmail.com

B.R.A.I.N.; Experimental Research Centre Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ramiro Barcelos, 2350,

Porto Alegre, RS, Brasil, 90035-903

Abstract

Epilepsy is one of the most prevalent neurological diseases, affecting people of all ages all around the world. The relationship between epilepsy and psychiatry comorbidities has been recognized for centuries. However, the wide spectrum of neuropsychiatric comorbidities and its extension have been more appropriately investigated over the last years. It is plausible to think that genetic and epigenetic mechanisms may be linked to the development of psychiatric disorders in epilepsy, since the association between some forms of epilepsy and psychiatric comorbidities are highly prevalent. The aim of this study is to evaluate the methylation profile in *BDNF* and *SLC6A4* genes in patients with temporal lobe epilepsy with or without psychiatric comorbidities associated. The cases were 139 patients with TLE, selected from the Epilepsy Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Methylation frequency for *BDNF* and *SLC6A4* gene promoters was 17 (12.2%) for TLE cases and the unmethylated cases was 122 (87.8%). There were no statistical differences between methylation status of the promoters and main features of TLE. There were no significant differences in age, gender, neuropsychiatric comorbidities and main clinical features amongst the methylation status of TLE group, regarding patients with or without psychiatric comorbidities. In our study, degree of methylation of *BDNF* and *SLC6A4* gene promoters was not associated with neuropsychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy.

Keywords: Temporal lobe epilepsy, psychiatric comorbidities, *BDNF*, *SLC6A4*

Introduction

Epilepsy is one of the most prevalent neurological diseases, affecting people of all ages. According to estimates of the World Health Organization, about 50 million people worldwide have epilepsy (1, 2). Due to factors such as high prevalence, severity, morbidity and socioeconomic impact, scientific research in the field of epileptology became a priority basis in public health policies (3, 4).

The relationship between epilepsy and psychiatric disorders has been recognized for centuries. However, the wide spectrum of neuropsychiatric

comorbidities and its extension have been more properly investigated only during the last years. The impact of these comorbidities on behavior related to seeking help, seizure control and quality of life suggests that prompt detection and treatment of these problems is very important. However, it is important to recognize accurately the occurring neuropsychiatric condition in order to provide appropriate management and to improve the diagnostic, which is currently under discussion (5, 6).

The prevalence of psychiatric disorders is higher in people with epilepsy than in the general population. In patients with epilepsy, depression occurs in about 30% of patients, anxiety disorders in 10–25%, and psychosis in 2–7% of them (7). However, most studies focus on the relationship between epilepsy and depression and consequently there is a deficit of epidemiological data on the association between epilepsy and other psychiatric disorders in general (5, 7-11). These patients are more likely to have psychiatric diseases and are more than three times as likely to commit suicide as the general population (12).

Epigenetics is influenced by the environment and plays a role in many aspects of neuronal function, since embryogenesis and early brain development to tissue-specific gene expression and global gene silencing. It is therefore plausible that an epigenetic dysregulation may play a significant role in brain disorders like neuropsychiatric disorders or epilepsy (14, 15). BDNF plays an important role in growth and differentiation of new neurons and synapses, as well as in survival of existing neurons of the central and peripheral nervous system (16, 17). Evidence suggests a potential contribution of BDNF and its receptor TrkB in the pathophysiology of epilepsy. In vivo and in vitro studies have shown that BDNF levels and activity are increased during epileptogenesis (18, 19). Moreover, the reduction of TrkB levels in the hippocampus of adult rats decreases the occurrence of seizures, suggesting that TrkB could be a target for therapeutic intervention in epilepsy (20, 21).

Serotonin is an important neurotransmitter in the central nervous system (CNS), with several roles in brain development and neuroplasticity in the adult brain (22, 23). It also affects balance between excitatory and inhibitory neural

pathways and thus it might be involved in various physiological and pathological processes in the brain, including epilepsy (24, 25, 26). Some authors have studied the role of *SLC6A4* variants, the gene that encodes the serotonin transporter, in the etiology or neuropsychiatric comorbidities of temporal lobe epilepsy. Additionally, clinical studies involving image and pharmacology, suggests that changes in serotonergic transmission may play an important role in temporal lobe epilepsy and the comorbidities associated (27-31). *SLC6A4* is of particular interest in the context of results related to epigenetic changes. It is believed that the methylation of this gene may contribute to vulnerability to neuropsychiatric disorders (32-35). *SLC6A4* is an integral membrane protein, primarily in the central and peripheral nervous systems, which carries serotonin (5-HT) from synaptic spaces into presynaptic neurons and serves to regulate emotional aspects of behavior (36).

Due to the high prevalence of psychiatric abnormalities in patients with epilepsy, it is plausible to suppose that this association might occur due to physiopathogenic mechanisms common to both disorders. If this is true, than we can expect also that a better understanding of these mechanisms at molecular level may eventually bring new knowledge for genesis of epilepsy or psychiatric disorders as well as it might allow development of alternative therapies for such diseases (7, 13). The purpose of this study is to evaluate a plausible role of the methylation profile of *BDNF* and *SLC6A4* genes, in development of neuropsychiatric comorbidities in patients with temporal lobe epilepsy.

Methods

Patients and Samples

The cases evaluated were 139 patients with TLE, selected from the Epilepsy Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Inclusion criteria were based on the ILAE's electroclinical classification (Commission on Classification Terminology of the International League Against Epilepsy) (37) and neuroimaging results. The Ethics Committee of the institution, in accordance with

the Declaration of Helsinki, approved the study and all subjects provided written informed consent to participate.

Genomic DNA was extracted using the *salting-out* method previously described by Miller et al. (1988) (38). For the methylation profile analysis the conversion procedure with sodium bisulphite was performed in the DNA samples. This process consists in the conversion of unmethylated cytosines to uracil. If the cytosine is methylated this change will not occur. Bisulfite conversion was carried out by using bisulfite EpiTect Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

HRM analysis

Methylation profile analysis was performed using High Resolution Melting method on equipment StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). We accessed two promoter regions of *BDNF* gene, I and IV. The primers used were previously described by D'addario and colleagues (2012) and Ikegame and colleagues (2013) (39, 40). The *SLC6A4* promoter region was accessed with primers described by Kim et al. (2013) (41). As controls, we used Cells-to-CpG Methylated and Unmethylated gDNA Control Kit (Applied Biosystems®). To create the range of methylated and unmethylated dilutions, the controls were mixed to obtain the following ratios of methylation: 0%, 25%, 75%, and 100%. Standard curves with known methylation ratios were included in each assay and were used to deduce the methylation ratio of each sample. The curve points below 50% were considered unmethylated and the points above this value were considered methylated.

All analyses were run according to the following conditions: Holding step (95°C for 10min), 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1 minute, followed by an HRM step of 95°C for 10s, 60°C for 1 minute, 95°C for 15s, and 60°C for 15s, with continuous acquisition per 0.2°C. HRM mix was performed in a final volume of 10uL, containing 5uL of MeltDoctor (Applied Biosystems), 5 pmol of each primer and 1uL (almost 20 ng/uL) of bisulfite modified DNA sample. Each reaction was performed in duplicate. After amplification by HRM, all samples of interest were

purified and sequenced by Sanger's method to confirm our results. The sequences were aligned using the Bioedit program's *CLUSTALW* algorithm, manually inspected.

Psychiatric interview

All patients were assessed by means of the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID) (42), divided into six modules, for the detection of one or more lifelong diagnoses from the Axis I Diagnostic and Statistical Manual, fourth edition (DSM-IV) (43). The groups of patients (group with TLE with psychiatric comorbidity and group with TLE without psychiatric comorbidity) were compared for clinical and methylation status differences. Patients were classified according to the presence or absence of psychiatric comorbidities, such as mood disorder, psychosis disorders, anxiety disorder and alcohol/drug abuse.

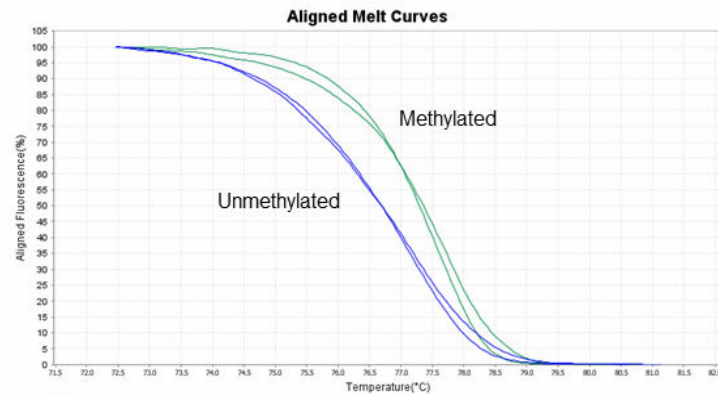
Statistical analysis

We assessed statistical differences between TLE patients with or without psychiatric comorbidities and controls methylation status of *BDNF* and *SLC6A4* gene promoters. Patient and control groups were studied, evaluating clinical variables related to the epileptogenic process and psychiatric comorbidities. The variables studied directly related to epilepsy were age, gender, seizure control, family history and duration of epilepsy. Good seizure control was defined as no seizure during the last year. Data were analyzed statistically by Fisher's Exact Test for qualitative variables. For quantitative variables we used the independent T-test with Levene's test for equality of variances. Qualitative variables are expressed as percentage with odds ratio (95%C.I.). Quantitative variables are expressed as mean \pm SD. All statistical analyses were carried out with the SPSS statistical package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results were significant if p was lower than 0.05.

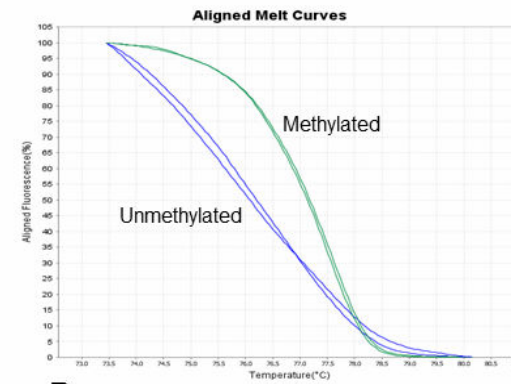
Results

Clinical characteristics

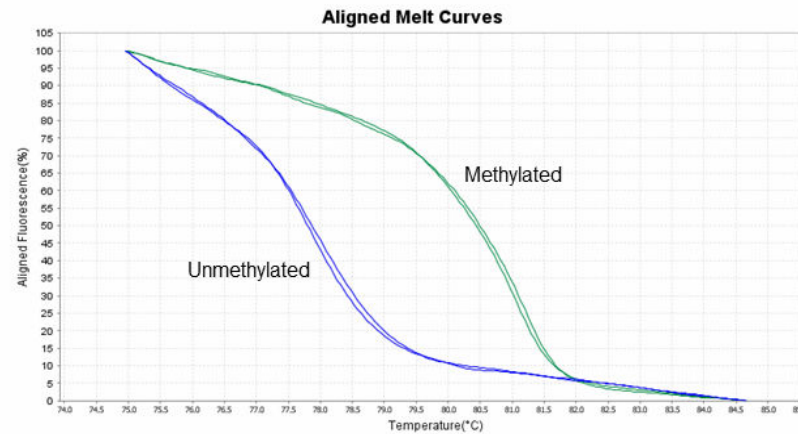
Methylation frequency for *BDNF* and *SLC6A4* gene promoters was 17 (12.2%) for TLE cases and the unmethylated cases was 122 (87.8%). There were no statistical differences between methylation status of the promoters and main features of TLE. Figure 1 shows the methylation patterns used to determine methylation status of each TLE sample. In our study, the TLE patients had a mean age of 44.0 ± 12.0 years. The entire group consists of 90 females and 49 males. The mean duration of epilepsy was 25.7 ± 13.3 years. Table 1 shows the main characteristics of the sample. The Structured Clinical Interview for DSM-IV shows that 59.7% of the patients (group with TLE and psychiatric comorbidity) had a neuropsychiatric disorder and 40.3% showed negative results (group with TLE without psychiatric comorbidity) for this interview. There were no significant differences in age, gender, comorbidities and other features between the methylation status of TLE group (Table 2). The results showed a trend towards mood disorder ($p < 0.07$), but it was not statistically significant (Table 2).



A.



B.



C.

Figure 1. Aligned melt curves representing methylation controls versus patients. (A) *BDNF* promoter I region, (B) *BDNF* promoter IV region and (C) *SLC6A4* promoter region. Each image shows one sample comparing to one control showing the similarity of the aligned curves, the range of unmethylated curve was 0% to 25% and for the methylated status was 75% to 100%.

Table 1. Clinical variables of TLE sample.

Variable	TLE (N=139)
Mean age at epilepsy	
(in years - SD)	44.0 (12.0)
Epilepsy age of onset	
(in years - SD)	18.4 (14.6)
Mean duration of epilepsy	
(in years – SD*)	25.7 (13.3)
Sex	
Male	49 (35.3%)
Female	90 (64.7%)
Family History of epilepsy	
Negative	85 (61.2%)
Positive	54 (38.8%)
Family History of Psychiatric disease	
Negative	84 (60.4%)
Positive	55 (39.6%)
Control of Seizures	
Controlled	60 (43.2%)
Not Controlled	79 (56.8%)
Antiepileptic drugs	
Monotherapy	71 (51.1%)
Polytherapy	68 (48.9%)
Benzodiazepines use	
No	114 (82.0%)
Yes	25 (18.0%)
Psychotropic drugs	
No	111 (79.9%)
Antidepressants	23 (16.5%)
Association	5 (3.6%)

Table 2. Clinical variables and comorbidities results according to *SLC6A4* and *BDNF* promoters methylation status.

Variable	Unmethylated	Methylated	Odds Ratio (95% Confidence Interval)	p value
Mean age at epilepsy (in years - SD)	43.8 (12.4)	44.8 (8.8)	-	0.76
Epilepsy age of onset (in years - SD)	18.05 (14.6)	20.91 (14.9)	-	0.45
Mean duration of epilepsy (in years – SD*)	25.9 (12.8)	24.1 (16.3)	-	0.67
Psychosis				
No	113 (92.6%)	16 (94.1%)		
Yes	9 (7.4%)	1 (5.9%)	0.8 (0.09 – 6.6)	1.00
Mood disorder				
No	62 (50.8%)	13 (76.5%)		
Yes	60 (49.2%)	4 (23.5%)	0.3 (0.09 – 1.0)	0.07
Anxiety disorder				
No	89 (72.9%)	15 (88.2%)		
Yes	33 (27.1%)	2 (11.8%)	0.4 (0.08 – 1.66)	0.24
Alcohol / drug abuse				
No	115 (94.3%)	16 (94.1%)		
Yes	7 (5.7%)	1 (5.9%)	1.0 (0.1 – 8.9)	1.00
SCID				
Negative	47 (38.5%)	9 (52.9%)		
Positive	75 (61.5%)	8 (47.1%)	0.5 (0.2 – 1.5)	0.30

Discussion

The present study investigated the effect of methylation in the promoters I and IV of *BDNF* gene and in the promoter region of *SLC6A4* gene on the clinical variables in patients with temporal lobe epilepsy with or without psychiatric comorbidities associated. We observed a trend of decreased methylation profile in patients with mood disorders (76.5% versus 23.5%), but this was not statistically significant ($p < 0,07$). No association was found between the methylation status and main characteristics of the study, among them gender, age of onset, mean duration and age of epilepsy, family history of epilepsy and psychiatric comorbidities, use of benzoazepines, number of antiepileptic drugs and use of psychotropic drugs.

DNA methylation alterations within *BDNF* promoters of exons are previous related with psychiatric comorbidities, like depression, bipolar disorder, suicidal behavior, and others. Several studies have reported higher levels of DNA methylation in *BDNF* gene related to bipolar disorder, schizophrenia, borderline personality disorder and depression (39, 40, 44-48). Ikegame et al. (2013) found that hypermethylation at promoters I and IV were also detected in patients with borderline personality disorder by using high-resolution melt analysis. There was a significant positive association between depression severity, hopelessness, impulsivity and child trauma and *BDNF* methylation level, however, no association was found between *BDNF* protein levels and DNA methylation levels (40).

Parrish et al. (2013) investigated whether DNA methylation contributes to *Grin2b* and *Bdnf* expression during the epileptogenic process triggered by *status epilepticus* (SE). They found that SE triggered increases in DNA methylation levels at the *Grin2b/Nr2b* promoter and decreased DNA methylation levels at the *Bdnf* promoter with a positive correlation on *Grin2b/Nr2b* and *Bdnf* gene and protein expression levels in the epileptic hippocampus. They believe that DNA methylation may be an early event triggered by SE that persists late into the epileptic hippocampus to contribute to gene expression changes in TLE (49). *SLC6A4* methylation was previously associated with psychiatric disorders such as depression and alcoholism in humans (32, 50) and has been used as a peripheral marker for various neuropsychiatric disorders that involve 5-HT alterations (51-53). Kim et al. (2013) found that higher *SLC6A4* promoter methylation status was independently associated with post stroke depression at 2 weeks and more prominently at 1 year

after stroke, and was significantly associated with the worsening of depressive symptoms over one year. These findings were significant only in the presence of the 5-HTTLPR ss genotype (41). A study conducted by Philbert *et al.*(2008) using samples from the Iowa Adoption Studies cohort provided evidences that increased methylation levels in the CpG island overlapping with the transcriptional start site of *SLC6A4* was associated with decreased levels of *SLC6A4* RNA, and that those with the 5-HTTLPR s allele showed a trend toward higher methylation levels across CpG sites located in this upstream island (50). We were able to detect only 3 patients with methylated status. This low number of patients precludes any further conclusions regarding a role of *SLC6A4* methylation in the genesis of neuropsychiatric comorbidities in patients with temporal lobe epilepsy.

Our study has some limitations which are discussed below. First, measurement of methylation levels is semi-quantitative by its nature, and thus requires validation by other methods. We validated our findings using Sanger's sequencing according to HRM protocol and found smaller variation in general methylation. Second, results from peripheral blood leucocytes may not directly be extrapolated to the human brain. However, Ikegame *et al.* (2013) noted that DNA methylation levels of 4 CpG sites in *BDNF* gene promoter IV were very comparable between brain and blood tissues, which seems to indicate the plausibility of using this biological material in these analyzes (40). Despite of it, the most commonly used source of DNA in *SLC6A4* methylation studies is blood tissue. Third, the relatively small sample size of our study and low methylation levels we observed limited statistical analysis. However our study might be useful for planning further studies evaluating a plausible role of epigenetics in neuropsychiatric comorbidities in epilepsy.

Conclusions

In our study, there was no significant association between methylation status in the *BDNF* and *SLC6A4* gene promoters and clinical characteristics of patients with temporal lobe epilepsy with or without psychiatric comorbidities. Although, based on these results, our work presented some limitations; we can perceive it as a new challenge by pursuing this line of research by increasing the sample size and

including other genes in important pathways in epilepsy which might help us to build a stronger overall evidence base.

Acknowledgments

This study was supported by Research Incentive Fund (FIPE-HCPA), PRONEM/FAPERGS and CNPq. A special thanks for Prof. Dr. Patrícia Ashton-Prolla research group of Genomic Medicine Laboratory for technical support in HRM analysis.

References

1. Engel J (2001) A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*; 42:796–803.
2. World Health Organization (WHO). Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/> Accessed in 23 Jun. 2015.
3. Sundqvist A (2002) Epilepsy: a clinical diagnostic overview. *Eur J Pain*; 6(Suppl A):21-25.
4. Li LM, Sander JW (2003) National demonstration project on epilepsy in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*; 61(1):153-156.
5. Devinsky O (2003) Psychiatric comorbidity in patients with epilepsy: implications for diagnosis and treatment. *Epilepsy and Behavior*; 4:S2–10.
6. Agrawal N, Govender S (2011) Epilepsy and neuropsychiatric comorbidities. *Advances in psychiatric treatment*; (17): 44–53.
7. Gaitatzis A, Trimble MR, Sander JW (2004) The psychiatric comorbidity of epilepsy. *Acta Neurol Scand*; 110:207–220.
8. Gaitatzis A, Sisodiya SM, Sander JW (2012). The somatic comorbidity of epilepsy: a weighty but often unrecognized burden. *Epilepsia*; 53:1282–1293.

9. Bragatti JA, Torres CM, Londero RG, Martin KC, Souza AC, Hidalgo MP, Chaves ML, Bianchin MM (2011) Prevalence of psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy in a Southern Brazilian population. *Arq Neuropsiquiatr*; 69(2A):159-165.
10. Bragatti JA, Bandeira IC, de Carvalho AM, Abujamra AL, Leistner-Segal S, Bianchin MM (2014) Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene polymorphisms and psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*; 32:59-63.
11. Schenkel LC, Bragatti JA, Becker JA, Torres CM, Martin KC, de Souza AC, Manfro GG, Leistner-Segal S, Bianchin MM (2012) Serotonin gene polymorphisms and psychiatry comorbidities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*; 99(3):260-266.
12. Bell GS, Gaitatzis A, Bell CL, Johnson AL, Sander JW. Suicide in people with epilepsy: how great is the risk? *Epilepsia* 2009;50:1933-1942.
13. Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ (2007) Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*; 8(5):355-367.
14. Levenson JM, Sweatt JD (2005) Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci*; 6:108–118.
15. Graff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH (2011) Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev*; 91:603–649.
16. Fargali S, Sadahiro M, Jiang C, Frick AL, Indall T, Cogliani V, Welagen J, Lin WJ, Salton SR (2012) Role of neurotrophins in the development and function of neural circuits that regulate energy homeostasis. *J Mol Neurosci*; 48(3):654–659.
17. Ichim G, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P (2012) Neurotrophins and cell death. *Exp Cell Res*; 318(11):1221–1228.
18. Scharfman HE (2002) Epilepsy as an example of neural plasticity. *Neuroscientist*; 8(2):154–173.
19. Scharfman HE (2005) Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy—a missing link? *Epilepsy Curr*; 5(3):83–88.

20. Kotloski R, McNamara JO (2010) Reduction of TrkB expression de novo in the adult mouse impairs epileptogenesis in the kindling model. *Hippocampus*; 20(6):713–723.
21. Heinrich C, Lähteinen S, Suzuki F, Anne-Marie L, Huber S, Häussler U, Haas C, Larmet Y, Castren E, Depaulis A (2011) Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*; 42(1):35–47.
22. Catalano M (2001) Functionally gene-linked polymorphic regions and genetically controlled neurotransmitters metabolism. *Eur Neuropsychopharmacol*; 11:431–439.
23. Lesch KP (2001) Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol*; 11:457–474.
24. Theodore WH (2003) Does serotonin play a role in epilepsy? *Epilepsy Curr*; 3(5):173–177.
25. Jobe PC (2003) Common pathogenic mechanisms between depression and epilepsy: an experimental perspective. *Epilepsy Behav*; 4(Suppl 3):S14–S24.
26. Jamali S, Bartolomei F, Robaglia-Schlupp A, Massacrier A, Peragut JC, Régis J, Dufour H, Ravid R, Roll P, Pereira S, Royer B, Roedel-Trevisiol N, Fontaine M, Guye M, Boucraut J, Chauvel P, Cau P, Szepetowski P (2006) Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain*; 129:625–641.
27. Manna I, Labate A, Gambardella A, Forabosco P, La Russa A, Le Piane E, Aguglia U, Quattrone A (2007) Serotonin transporter gene (5-HTT): association analysis with temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett*; 421(1):52–56.
28. Stefulj J, Bordukalo-Niksic T, Hecimovic H, Demarin V, Jernej B (2010) Epilepsy and serotonin (5HT): variations of 5HT-related genes in temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett*; 478(1):29–31.

29. Schenkel LC, Bragatti JA, Torres CM, Martin KC, Gus-Manfro G, Leistner-Segal S, Bianchin MM (2011) Serotonin transporter gene (5HTT) polymorphisms and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*; 95(1-2):152-157.
30. Córdoba M, Consalvo D, Moron DG, Kochen S, Kauffman MA (2012) SLC6A4 gene variants and temporal lobe epilepsy susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*; 39(12):10615-10619.
31. Martinez A, Finegersh A, Cannon DM, Dustin I, Nugent A, Herscovitch P, Theodore WH (2013) The 5-HT_{1A} receptor and 5-HT transporter in temporal lobe epilepsy. *Neurology*; 80(16):1465-1471.
32. Devlin AM, Brain U, Austin J, Oberlander TF (2010) Prenatal exposure to maternal depressed mood and the MTHFR C677T variant affect SLC6A4 methylation in infants at birth. *PLoS One* 5: e12201.
33. Beach SR, Brody GH, Todorov AA, Gunter TD, Philibert RA (2010) Methylation at SLC6A4 is linked to family history of child abuse: an examination of the Iowa adoptee sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*; 153B:710–713.
34. Beach SR, Brody GH, Todorov AA, Gunter TD, Philibert RA (2011) Methylation at 5HTT mediates the impact of child sex abuse on women's antisocial behavior: an examination of the Iowa adoptee sample. *Psychosom Med*; 73(1): 83–87.
35. Koenen KC, Uddin M, Chang SC, Aiello AE, Wildman DE, Goldmann E, Galea S. (2011) SLC6A4 methylation modifies the effect of the number of traumatic events on risk for posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety*; 28(8):639–647.
36. Meyer-Lindenberg A (2009) Neural connectivity as an immediate phenotype: brain networks under genetic control. *Hum Brain Mapp*; 30:1938–1946.
37. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*; 51(4):676-685.

38. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
39. D'Addario C, Dell'osso B, Palazzo MC, Benatti B, Lietti L, Cattaneo E, Galimberti D, Fenoglio C, Cortini F, Scarpini E, Arosio B, Di Francesco A, Di Benedetto M, Romualdi P, Candeletti S, Mari D, Bergamaschini L, Bresolin N, Maccarrone M, Altamura AC (2012) Selective DNA Methylation of BDNF Promoter in Bipolar Disorder: Differences Among Patients with BDI and BDII. *Neuropsychopharmacology*; 37(7):1647-1655.
40. Ikegame T, Bundo M, Sunaga F, Asai T, Nishimura F, Yoshikawa A, Kawamura Y, Hibino H, Tochigi M, Kakiuchi C, Sasaki T, Kato T, Kasai K, Iwamoto K (2013) DNA methylation analysis of BDNF gene promoters in peripheral blood cells of schizophrenia patients. *Neurosci Res*; 77(4):208-214.
41. Kim JM, Stewart R, Kang HJ, Kim SY, Kim SW, Shin IS, Park MS, Kim HR, Shin MG, Cho KH, Yoon JS (2013) A longitudinal study of BDNF promoter methylation and genotype with poststroke depression. *J Affect Disord*;149(1-3):93-99.
42. First M, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW (2001) Structured clinical interview for Axis I DSM-IV-TR disorders: non-patient edition. New York State Psychiatric Institute, Biometrics Research Department.
43. American Psychiatric Association (APA) (2000) Diagnostic and statistical manual of mental disorders IV. Washington: American Psychiatric Press.
44. Perroud N, Courtet P, Vincze I, Jausseint I, Jollant F, Bellivier F, Leboyer M, Baud P, Buresi C, Malafosse A (2008) Interaction between BDNF Val66-Met and childhood trauma on adult's violent suicide attempt. *Genes Brain Behav* 7:314–322.
45. Perroud N, Salzmann A, Prada P, Nicastro R, Hoeppli ME, Furrer S, Ardu S, Krejci I, Karege F, Malafosse A (2013) Response to psychotherapy in borderline personality disorder and methylation status of the BDNF gene. *Transl Psychiatry*; 3:e207.
46. Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, Videtic A, Ferraro A, Carli V, Sacchetti S, Lembo F, Angiolillo A, Jovanovic N, Pisanti F, Tomaiuolo R, Monticelli A, Balazic J, Roy A, Marusic A, Coccozza S, Fusco A, Bruni CB, Castaldo G, Chiariotti L (2010)

Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* 67:258–267.

47. Fuchikami M, Morinobu S, Segawa M, Okamoto Y, Yamawaki S, Ozaki N, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T (2011) DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. *PLoS ONE* 6: e23881.

48. Kordi-Tamandani DM, Sahranavard R, Torkamanzehe A (2012) DNA methylation and expression profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and dopamine transporter (DAT1) genes in patients with schizophrenia. *Mol Biol Rep* 39:10889–10893.

49. Ryley Parrish R, Albertson AJ, Buckingham SC, Hablitz JJ, Mascia KL, Davis Haselden W, Lubin FD (2013) Status epilepticus triggers early and late alterations in brain-derived neurotrophic factor and NMDA glutamate receptor *Grin2b* DNA methylation levels in the hippocampus. *Neuroscience*; 248:602-619.

50. Philibert RA, Sandhu H, Hollenbeck N, Gunter T, Adams W, et al. (2008) The relationship of 5HTT (SLC6A4) methylation and genotype on mRNA expression and liability to major depression and alcohol dependence in subjects from the Iowa Adoption Studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 543–549

51. Barkan T, Peled A, Modai I, Barak P, Weizman A, et al. (2006) Serotonin transporter characteristics in lymphocytes and platelets of male aggressive schizophrenia patients compared to non-aggressive schizophrenia patients. *Eur Neuropsychopharmacol* 16: 572–579.

52. Hernández E, Lastra S, Urbina M, Carreira I, Lima L (2002) Serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid and serotonin transporter in blood peripheral lymphocytes of patients with generalized anxiety disorder. *Int Immunopharmacol* 2: 893–900.

53. Marazziti D, Dell’Osso B, Baroni S, Betti L, Catena M, et al. (2006) Common Alterations in the Serotonin Transporter in Platelets and Lymphocytes of Psychotic Patients. *Pharmacopsychiatry* 39: 35–38.

12. Considerações Finais e Perspectivas

A epigenética vem sendo cada vez mais investigada em relação a um amplo espectro de enfermidades. Estudos de modificações epigenéticas na área da epilepsia, tanto em modelos animais quanto em humanos estão fornecendo resultados que contemplam novos conhecimentos sobre a epileptogênese. Além disso, a detecção das modificações epigenéticas observadas em tecido cerebral comparáveis a análise de sangue periférico proporciona um meio de corroborar o uso desse material biológico, o que pode colaborar para ampliar as pesquisas em neurologia. Estudos na área da genética molecular e epigenética podem contribuir de forma ampla neste sentido e também podem dizer algo a respeito de manifestação/progressão das doenças e, mais ainda, podem trazer respostas a respeito de possíveis interferências no tratamento, visando aprimorar a qualidade de vida do paciente e melhorar seu prognóstico.

A atividade neuronal pode modular o seu padrão de metilação do DNA em resposta a estímulos fisiológicos e ambientais. A regulação exata da metilação do DNA é essencial para a função cognitiva normal. Sabe-se que, quando a metilação está alterada como resultado de mutações ou fatores de risco ambientais, como a exposição a drogas e lesão neural, problemas neuropsiquiátricos podem vir a se manifestar como efeito colateral destas alterações. A investigação sobre a metilação do DNA continua mostrando um panorama complexo sobre a regulação epigenética dos genes no SNC e fornece possíveis alvos para o tratamento de diversas enfermidades, dentre elas, os transtornos neuropsiquiátricos.

A perspectiva é seguir as investigações genéticas e epigenéticas em relação a outros marcadores de interesse na área da epilepsia e comorbidades associadas, visando ampliar a caracterização da amostra de pacientes do estudo, que representam uma parcela pequena da população brasileira, mas os resultados obtidos nestas análises podem refletir inferências de cunho mais abrangentes.

13. Anexos

13.1 Anexo 1

Termo de consentimento livre e esclarecido – Casos

Projeto de Pesquisa: Análise do perfil de metilação da região promotora dos genes *BDNF* e *SLC6A4* em pacientes com epilepsia do lobo temporal

Equipe Responsável: Isabel Cristina Bandeira da Silva, Sandra Leistner Segal e Marino Muxfeldt Bianchin

Centro de Pesquisa Experimental, Laboratório BRAIN; Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre - RS Telefone: (51) 3359-8849

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo realizado pelo Laboratório BRAIN do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em colaboração com a UFRGS. Sua participação neste projeto deve-se ao fato de você ter epilepsia, atendendo ao nosso tema de pesquisa. A pesquisa tem por objetivo avaliar mecanismos epigenéticos relacionados a epilepsia. O termo epigenética refere-se a alterações na expressão gênica que não envolvem uma alteração diretamente na seqüência do DNA. A participação nessa pesquisa é voluntária, se você decidir participar, serão coletados dois frascos de 5mL de sangue para extração de DNA e assim a informação genética nela contida será estudada no laboratório unicamente para finalidade de pesquisa. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. Você também deverá responder a algumas questões sobre a sua história clínica, isto levará cerca de 15 minutos. Será realizado um exame físico e neurológico simples, com cerca de 10 minutos de duração.

Você pode concordar ou não com a realização destes procedimentos, sua decisão não afetará o seu atendimento na instituição. Após o término do estudo o material biológico que ainda estiver armazenado poderá ser descartado ou mantido para futuras pesquisas, de acordo com a sua determinação. Nesse caso, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso do material biológico, ao final do estudo, você (marque um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que seja descartado.

Cabe salientar que os resultados desta pesquisa não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou acompanhamento médico, podendo contribuir no futuro, para um diagnóstico mais rápido de pacientes com alteração genética, melhor entendimento das conseqüências e desenvolvimento de terapias para essa situação específica.

Não existe um prazo exato para que você receba os resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis.

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar o pesquisador responsável, Marino Muxfeldt Bianchin, no Laboratório BRAIN do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-8849. Também poderá ser contactado o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA pelo telefone (51) 3359 – 7640.

AUTORIZAÇÃO PARA PERMITIR PESQUISA DOS REGISTROS MÉDICOS

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome não será revelado. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no seu hospital. A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você não será penalizado (a).

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por _____ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de decisão sobre participar ou não do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

Data: ___/___/_____

Paciente: _____

Responsável legal (se for o caso): _____

Assinatura do paciente ou responsável legal: _____

Expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ___/___/_____

Pesquisador que aplica o termo:

Nome: _____

Assinatura: _____

13.2 Anexo 2

Termo de consentimento livre e esclarecido - Controles

Projeto de Pesquisa: Análise do perfil de metilação da região promotora dos genes *BDNF* e *SLC6A4* em pacientes com epilepsia do lobo temporal

Equipe Responsável: Isabel Cristina Bandeira da Silva, Sandra Leistner Segal e Marino Muxfeldt Bianchin

Centro de Pesquisas Experimental, Laboratório BRAIN; Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre - RS Telefone: (51) 3359-8849.

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo realizado pelo Laboratório BRAIN do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em colaboração com a UFRGS. Sua participação neste projeto deve-se ao fato de você não apresentar a enfermidade que é objeto do nosso estudo. A pesquisa tem por objetivo avaliar mecanismos epigenéticos relacionados a epilepsia. O termo epigenética refere-se a alterações na expressão gênica que não envolvem uma alteração diretamente na seqüência do DNA. Como você não apresenta história pessoal de epilepsia estará inserido em um grupo chamado "Controle". A participação nessa pesquisa é voluntária, se você decidir participar, serão coletados dois frascos de 5mL de sangue para extração de DNA e assim a informação genética nela contida será estudada no laboratório unicamente para finalidade de pesquisa. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. Cabe ressaltar que a participação nesta pesquisa não acarretará benefícios diretos aos participantes do grupo controle, porém, contribuirá para as análises comparativas que serão resultado deste estudo.

Você pode concordar ou não com a realização destes procedimentos, sua decisão não afetará o seu atendimento na instituição, caso venha a necessitar. Após o término do estudo o material biológico que ainda estiver armazenado poderá ser descartado ou mantido para futuras pesquisas, de acordo com a sua determinação. Nesse caso, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso do material biológico, ao final do estudo, você (marque um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que seja descartado.

Cabe salientar que os resultados desta pesquisa não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou acompanhamento médico, podendo contribuir no futuro, para um diagnóstico mais rápido de pacientes com alteração genética, melhor entendimento das conseqüências e desenvolvimento de terapias para essa situação específica.

Não existe um prazo exato para que você receba os resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis.

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar o pesquisador responsável, Marino Muxfeldt Bianchin, no Laboratório BRAIN do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-8849. Também poderá ser contactado o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA pelo telefone (51) 3359 – 7640.

AUTORIZAÇÃO PARA PERMITIR PESQUISA DOS REGISTROS MÉDICOS

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome não será revelado. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus

registros médicos a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

Sua participação no estudo é voluntária. **Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada um futuro tratamento no seu hospital.** A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você **não** será penalizado (a).

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por _____ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de decisão sobre participar ou não do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

Data: ___/___/_____

Participante: _____

Expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ___/___/_____

Pesquisador que aplica o termo:

Nome: _____

Assinatura: _____

13.3 Anexo 3

Ficha Clínica – Entrevista Estruturada

Nome: _____ Prontuário: _____
Telefone Contato: _____ Profissão: _____
Idade _____ Sexo _____

Anos de Estudo:

- Primeiro Grau Incompleto Primeiro Grau Completo Segundo Grau Incompleto
 Segundo Grau Completo Grau Superior Completo Grau Superior Incompleto

Estado Civil: solteiro casado separado viúvo/a

Tabagismo:

- Fumante Atual Ex-fumante-parou há mais de seis meses Nunca fumou

Uso Regular de Álcool: Sim Não

Epilepsia :

Tipo de epilepsia: _____

Idade do Início das Crises: _____

Início das Crises antes menarca após menarca

História Familiar de Epilepsia: Sim Não

Frequência de Crises Epilépticas:

- Diárias Semanais Mensais Semestrais Controladas

Drogas Antiepilépticas:

- Carbamazepina ___ Fenitoina ___ Fenobarbital ___ Clobazam ___
 Ácido Valpróico ___ Lamotrigina ___ Topiramato ___
 Outras _____

Tipo de Crise:

- Parcial Simples Parcial Complexa
- Parcial Complexa com generalização secundária
- Ausência

Aura: Sim Não

Sinais Lateralizatórios: Direita Esquerda

Fatores Precipitantes - IPI

- Privação Sono Despertar Ciclo Menstrual Álcool Reflexas

EEG ponta onda direita esquerda bilateral _____

TCC Sim Não _____

RNM Sim Não _____

Doença Psiquiátrica:

História Pessoal de Doença Psiquiátrica:

- Sim Qual doença? _____ Necessitou de Internação psiquiátrica? _____
- Não

História Familiar de DP – depressão, ansiedade, alcoolismo, fobia social, pânico, esquizofrenia, transtorno de humor

Sim Não

História Familiar de Tentativa de Suicídio Sim Não

História Pessoal de Tentativa de Suicídio Sim Não

Medicações Psiquiátricas em Uso

Você se considera uma pessoa ansiosa? Sim Não