



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGIA

“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS I, II, IV
Y VI DEL GEN BDNF EN CORTEZAS DE PACIENTES CON
EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

FERNANDO RODRÍGUEZ PINEDA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. GABRIELA ARIADNA MARTÍNEZ LEVY

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz
Subdirección de Investigaciones Clínicas
Departamento de Genética Psiquiátrica

ASESORA INTERNA:

Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza
Laboratorio de Fisiología Reproductiva





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **RODRÍGUEZ PINEDA FERNANDO**, con número de cuenta **306198258**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **13 de junio de 2017** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

VOCAL Dra. GABRIELA ARIADNA MARTÍNEZ LEVY*

SECRETARIO Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

SUPLENTE Dra. ELIZABETH VIEYRA VALDEZ

SUPLENTE Dra. DEYRA DE LOS ANGELES RAMÍREZ
HERNÁNDEZ

Handwritten signatures of the jury members: Patricia Rosas Saucedo, Gabriela Ariadna Martínez Levy, Leticia Morales Ledesma, Elizabeth Vieyra Valdez, and Deyra de los Angeles Ramírez Hernández.

El título de la tesis que presenta es: **Análisis de la expresión de los transcritos I, II, IV y VI del gen BDNF en cortezas de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 11 de mayo de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

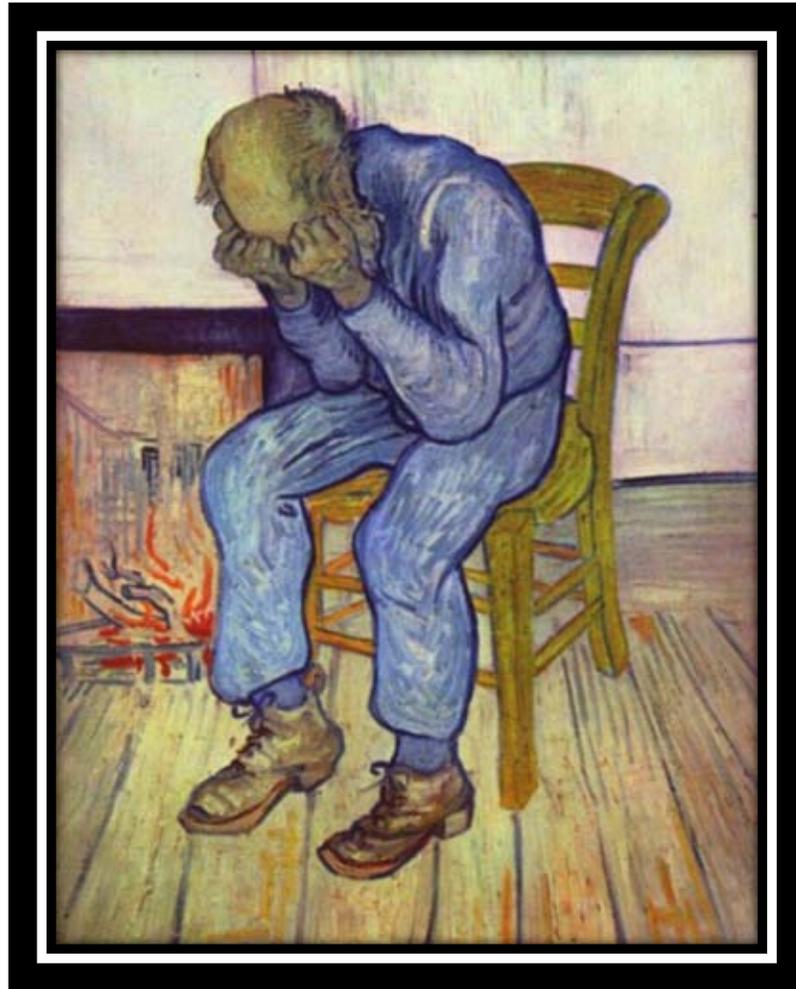
Stamp: DIRECCIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

*Hoy más que nunca debemos luchar por erradicar los prejuicios creados durante siglos alrededor de la palabra **epilepsia**. La falta de conocimientos ocasiona que personas con **epilepsia** sufran discriminación y estigma social. Bien dijo Lennox en 1960: “...**epilepsia** es una palabra profundamente enraizada en la cultura occidental. Sus desagradables implicaciones no se erradicaran por un mandato oficial... un tigre no se vuelve inofensivo llamándolo ‘gatito’, sino quitándole sus garras y colmillos...”*

Vincent Van Gogh – óleo sobre lienzo – 32 x 25 cm 1890
Sorrowing Old Man ('At Eternity's Gate')



Actualmente se ha propuesto que dentro de las múltiples afecciones que padecía Vincent van Gogh se encuentra la **epilepsia del lóbulo temporal**, muchos especialistas sostienen que van Gogh nació con una lesión del cerebro que fue agravada por el uso prolongado de absenta. Solo pintaba cuando su estado era estable, y era muy consciente de que ‘las **alucinaciones y los episodios de agitación confusional**’ podrían volver en cualquier momento, pero resolvió continuar su búsqueda de consuelo a través de la pintura. **Sorrowing Old Man ('At Eternity's Gate')** no solo refleja la **condición epiléptica** de van Gogh, sino impregna y nos muestra el pensamiento más trágico del artista “toda la humanidad vive con la pesadez de la incertidumbre”.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por proveer una educación académica de alto nivel, asimismo al conjunto conformado por la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por ser crucial en mi desarrollo como biólogo.

Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, por el apoyo y las herramientas brindadas en la elaboración de esta tesis.

Particularmente al departamento de genética del área de subdirecciones clínicas, destacando al Dr. Carlos Sabas Cruz Fuentes por haberme permitido trabajar en el laboratorio, además de sus constantes apoyos y palabras, a la Dra. Gabriela Ariadna Martínez Levy por las enseñanzas y por todos los momentos compartidos, al Dr. Rodrigo Arreola Alemon por los consejos sobre las decisiones de un posgrado, al Q.C. Amado Pérez Molina por proveerme de los primeros conocimientos acerca del trabajo de laboratorio, a los técnicos Magdalena Briones Velasco y José Manuel Pérez Luna por todo el apoyo brindado en este tiempo, a la Dra. Yvonne Geraldin Flores Medina por sus bromas y sus gustos hípsters, y al biólogo Andrés Nani. A todas las personas involucradas en este proyecto que culminó con la realización de esta tesis.

Un agradecimiento al departamento de farmacogenética encabezado por la Dra. Beatriz Elena Camarena Medellín, a mi amigo y próximo Dr., Marco Antonio Sanabrais Jiménez, al MBE. Alejandro Aguilar García y a la futura Dra. Sandra Muñoz Hernández.

Agradecimientos a las doctoras del Laboratorio de Fisiología Reproductiva, Leticia Morales Ledesma, Patricia Rosas Saucedo, Elizabeth Vieyra Valdez y Deyra de los Ángeles Ramírez Hernández por los comentarios dados y por aceptar ser parte de mi comité evaluador.

Y finalmente gracias a aquellas personas que se rebelaron a los postulados de este proyecto mediante los cuestionamientos.

Infinitas gratitudes a cada uno de ustedes.

DEDICATORIA

Esta tesis tiene una deuda de afecto y de cariño con dos personas imprescindibles e infinitas en mi vida, mis padres, Bertha Pineda Flores y Gregorio Rodríguez López, que creo han forjado en mí la noción de una persona correcta, agradecida y con valores, día a día trabajo y me esfuerzo en ser al menos la mitad de persona de lo que fueron y son. Los amó infinitamente, y siempre estarán en mis pensamientos a menos que sobrevenga un accidente cerebral.

Otra persona que me permito dedicarle unas palabras es a la Dra. Gabriela Ariadna Martínez Levy, mí querida asesora, marcó una pauta sólida en mi vida académica, mostrándome la seriedad y la agonía que conlleva la vida de un investigador, estoy totalmente agradecido, porque sin tu paciencia, tus consejos, tu comprensión pero sobre todo tus regaños, no estaría escribiendo esto. Te guardo un gran aprecio y cariño. Gracias por nunca dejar de creer en mí.

A mis hermanos, Eréndira, Ricardo y Sonia, por estar siempre ahí... debido a que no tenían otro lugar donde vivir. Los quiero infinitamente y les perdono cualquier daño que me hayan causado.

A mis grandes amigos de la ENP 9, Alberto Hurtado, Brian Castro, Daniel González, Erik Badillo, Juan Hernández, Martin Contreras y Rubén Flores, por todos los momentos que fueron y son.

A mis grandes amigos de la FES Zaragoza, Aarón Chirino, Aldo Iván, Amadeo Zavaleta, Bele Bellido, Diego Córdova, Erika Vértiz, Jossimar Islas, Luis Omar Tapia, Mauricio Antonio, Noé Lagunas, Omar Gutiérrez, Ricardo Rivera, Sebastián Herrera y Verónica Loyo, porque si no fuera por ustedes me hubiera titulado por promedio.

A Jason Becker, Bill Steer, Jorge De Saint, Chuck Schuldiner, Don Mich, Paul Gilbert, Billy Sheehan, Jeff Lynne, Chris Squire, Phil Lynott, Billy Batson, Nuno Bettencourt, Suriel Diaz, Mark Twain, Neil Gaiman, Cristiano Ronaldo dos Santos Aveiro, Estefani Pérez, Kurt Donald Cobain, Acid Madness, Lord Boros, Geddy Lee, Richie Kotzen, Jr., Pepsi Tate, Bob Gray, Tim Bergling y a Dafne Román (gracias por tu amistad y por presentarme a Poison).

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN.....	1
1. ANTECEDENTES	3
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL (ELT).....	4
2.2 ELT Y CORTEZA TEMPORAL	6
2.3 FACTOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) Y EPILEPSIA	9
2.3.1 Efectos pro–epileptogénicos de BDNF	11
2.3.2 Efectos anti–epileptogénicos de BDNF.....	13
2.3.3 Transcritos de BDNF y modelos animales de epilepsia	15
2.3.4 BDNF en pacientes con ELT	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVO GENERAL.....	23
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	23
6. MÉTODO	24
6.2 EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS PACIENTES CON ELT	25
6.2.1 Criterios de inclusión de los pacientes con ELT.....	25
6.2.2 Criterios de exclusión de los pacientes con ELT	26
6.2.3 Características de los pacientes con ELT	26
6.3 EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DEL GRUPO CONTROL	27
6.3.1 Criterios de inclusión del grupo control	27
6.3.2 Criterios de exclusión del grupo control.....	28
6.3.3 Características del grupo control	30
6.4 EXTRACCIÓN DE ARN.....	30

6.5	EVALUACIÓN DE LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL ARN.....	31
6.6	GEL DE INTEGRIDAD.....	31
6.7	RETRO-TRANSCRIPCIÓN	32
6.8	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS DE BDNF.....	33
6.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
7.	RESULTADOS	34
7.1	EXPRESIÓN DE BDNF EN CORTEZAS DE PACIENTES CON ELT.....	34
7.2	EXPRESIÓN DE BDNF EN RELACIÓN A LAS VARIABLES CLÍNICAS	35
8.	DISCUSIÓN.....	38
9.	CONCLUSIONES.....	43
	REFERENCIAS.....	44
	ANEXO 1. ARTÍCULO PUBLICADO.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del lóbulo temporal en el cerebro humano.....	4
Figura 2. Neuroimagen que muestra esclerosis del hipocampo.....	6
Figura 3. Representación esquemática del patrón histológico de las capas de la corteza cerebral y la presencia de displasias corticales.....	8
Figura 4. Categorización en modelos animales de las crisis epilépticas de acuerdo a Racine.....	12
Figura 5. Estructura del gen BDNF.....	16
Figura 6. Esquemización de la distribución espacial de los transcritos de BDNF en una neurona hipocampal.....	18
Figura 7. Gel de electroforesis y niveles de integridad del ARN total de BDNF.....	32
Figura 8. Expresión de los transcritos de BDNF en cortezas de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal.....	34
Figura 9. Expresión de los transcritos de BDNF en relación al uso de carbamazepina (CBZ).....	36
Figura 10. Expresión de los transcritos de BDNF en relación al uso de ácido valproico (AVP).....	36
Figura 11. Expresión de los transcritos de BDNF en relación al uso de fármacos inhibidores de la recaptura de serotonina (ISRS).....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modelos experimentales de epilepsia.....	10
Tabla 2. Expresión de los diferentes transcritos de BDNF en distintas zonas del cerebro ante la inducción de crisis electro-convulsivas agudas o crónicas...	17
Tabla 3. Variables clínicas asociadas a cambios en los niveles de expresión de BDNF.....	20
Tabla 4. Características representativas de los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal.....	29
Tabla 5. Características representativas del grupo control.....	30
Tabla 6. Expresión de BDNF en relación a variables clínicas de interés.....	35

ABREVIATURAS

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero;

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro;

BDNF-I: Transcrito que contiene al exón I del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro;

BDNF-VI: Transcrito que contiene al exón VI del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro;

CA1: *Cornu Ammonis 1*, designa una parte del hipocampo;

CA3: *Cornu Ammonis 3*, designa una parte del hipocampo;

CA4: *Cornu Ammonis 4*, designa una parte del hipocampo;

CE: Crisis epilépticas;

ELT: Epilepsia del lóbulo temporal;

Escala de Racine: Categorización en modelos animales de las crisis epilépticas que van de la fase 0 a la 5;

ENGEL: Escala utilizada para clasificar los resultados postquirúrgicos de la epilepsia (Clase I: Libre de crisis, Clase II: Rara ocurrencia de crisis, Clase III: Mejoría significativa de las crisis y Clase IV: No hay mejoría de las crisis);

IBE: Oficina Internacional para la Epilepsia (International Bureau for Epilepsy, por sus siglas en inglés);

ILAE: Liga Internacional contra la Epilepsia (International League Against Epilepsy, por sus siglas en inglés)

INNMVS: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez;

INPRFM: Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz;

ISRS: Fármacos antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina;

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con retro-transcripción;

TCE: Trauma cráneo-encefálico;

TrkB: Receptor de tirosina kinasa B.

RESUMEN

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) se caracteriza por la presencia de alteraciones histológicas en el lóbulo temporal asociadas a anomalías en el crecimiento, proliferación, diferenciación y migración neuronal. Estos procesos son regulados, entre otros elementos, por el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina que ha mostrado cambios en su expresión en el tejido nervioso de pacientes con ELT y ante la presencia de variables clínicas como la comorbilidad con otros trastornos psiquiátricos y/o tratamientos farmacológicos particulares. Es importante mencionar que a partir del gen BDNF se sintetizan diversos transcritos que migran a compartimentos particulares en la neurona y se ha sugerido un efecto diferencial de cada una de estas isoformas dependiendo de su disposición espacial. Los transcritos más estudiados son los que contienen a los exones I, II, IV y VI, que recientemente analizamos en hipocampo de pacientes con ELT, en donde observamos solamente incrementado a BDNF-VI.

Nuestro objetivo fue analizar la expresión de los transcritos I, II, IV y VI de BDNF en cortezas de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con retro-transcripción, esto en relación a un grupo control y a variables clínicas de interés como el género, la edad, la duración de la epilepsia, la lateralidad de la resección, la edad de inicio de la epilepsia, los posibles factores precipitantes y/o el uso de diversos tratamientos farmacológicos.

Se colectó una muestra de corteza temporal y datos clínicos de 19 pacientes fármaco-resistentes con diagnóstico de ELT en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía ‘Manuel Velasco Suárez’ (INNMVS), así como de 8 autopsias de individuos en los que la causa de muerte fue ajena a un trastorno neurológico o psiquiátrico, estos últimos fueron obtenidos del servicio médico forense (SEMEFO). Se analizaron los niveles de expresión mediante RT-PCR en tiempo real de los transcritos mencionados y se utilizó como gen endógeno a la proteína de unión a cajas TATA (TBP).

Observamos incremento en la expresión de BDNF-I ($p=0.045$) y BDNF-VI ($p=0.016$) en las cortezas de pacientes con ELT en relación al grupo control, este efecto fue más evidente en pacientes que utilizaron carbamazepina (BDNF-I $p=0.034$; BDNF-VI $p=0.013$), mientras que los pacientes que NO tomaron ácido valproico mostraron la misma tendencia (BDNF-I $p=0.026$; BDNF-VI $p=0.004$). Por otro lado, el empleo de medicamentos antidepresivos se asoció al aumento de BDNF-VI ($p=0.009$).

El uso de carbamazepina y de antidepresivos parece explicar el incremento de BDNF-VI en pacientes con ELT. Por otro lado, la administración de ácido valproico se asoció con niveles de expresión análogos al grupo control, similar a lo documentado en un estudio que se hizo en cultivos neuronales de pacientes con ELT donde se mostró que el uso de valproato disminuía los niveles proteicos de BDNF.

De acuerdo a la literatura los aumentos de BDNF-I y BDNF-VI podrían estar dando lugar al desarrollo de la arborización dendrítica basal y apical de la neurona, intentando recuperar la estructura y función de la corteza temporal, sin lograr un efecto antiepiléptico, ya que estos pacientes siguen presentando CE recurrentes.

Palabras clave: BDNF, corteza, epilepsia, fármacos, transcritos.

1. ANTECEDENTES

La **epilepsia** es una afección neurológica que afecta aproximadamente al 2 % de la población mundial, particularmente en México se ha estimado una prevalencia del 2 – 4 % (López-Hernández y Solís, 2012). En el 2010 la International League Against Epilepsy (ILAE, por sus siglas en inglés) y la International Bureau for Epilepsy (IBE, por sus siglas en inglés), la definieron como un trastorno del sistema nervioso central en el que se presentan **crisis epilépticas (CE)** recurrentes y espontáneas (Engel, 2001), las cuáles se caracterizan por la actividad anormal y excesiva de un grupo de neuronas que producen descargas eléctricas sincrónicas (Salas-Puig y Gil-Nagel, 2004).

La clasificación de la ILAE respecto al tipo de CE reconoce dos grupos principales: 1) Las CE focales, aquellas en que las descargas eléctricas están limitadas a un solo hemisferio cerebral y 2) las CE generalizadas, que se describen por una activación simultánea y sincrónica de ambos hemisferios cerebrales (Engel, 2001). Las CE focales representan aproximadamente el 60 % de todos los tipos de CE, siendo la **epilepsia del lóbulo temporal (ELT)** el subtipo más común, representando al 70 % de estos casos (Fernández y Micheli, 2010; Consalvo *et al.*, 2012).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Epilepsia del lóbulo temporal (ELT)

La ELT, como su nombre lo indica afecta a estructuras pertenecientes a esta región cerebral, principalmente las zonas temporales mediales como el hipocampo y la amígdala (ver figura 1) (Campos y Kanner, 2004; Fernández y Micheli, 2010). Las CE de estos pacientes se caracterizan por la sensación de malestar epigástrico, cambios en el estado de la conciencia (agitación, desorientación, confusión, amnesia), automatismos oro-alimentarios, sensación de temor con activación autonómica manifestado por palidez de piel y mucosas, midriasis, taquicardia y taquipnea (Volcy-Gómez, 2004; Sánchez *et al.*, 2009).

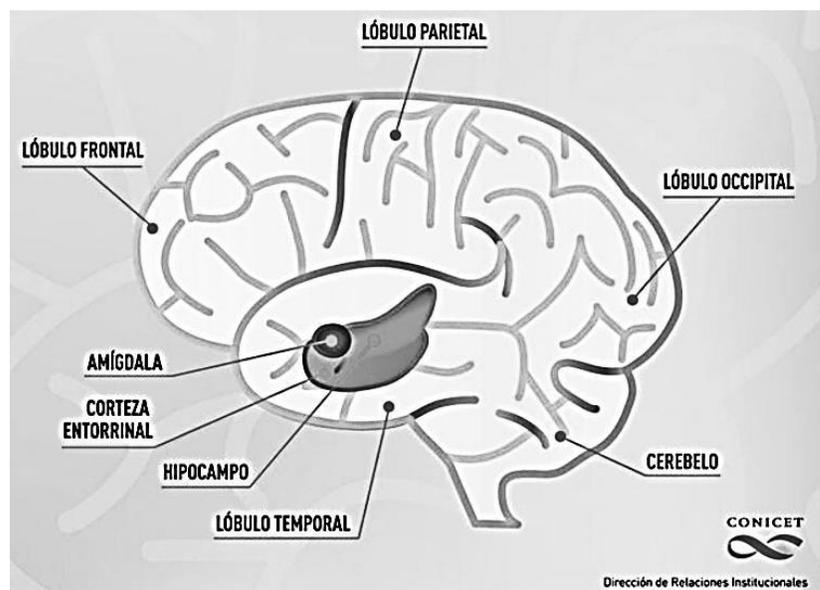


Figura 1. Localización del lóbulo temporal en el cerebro humano. Fuente: <http://cienciaaldia.com®>

Se ha descrito que alrededor del 30 % de los pacientes con ELT presentan gliomas de baja malignidad (grado I y II), displasias corticales, malformaciones arteriovenosas, angiomas cavernosos, entre otros. Sin embargo la lesión más común es la esclerosis del hipocampo que está presente en el 60 – 75 % de los casos (Harvey *et al.*, 1997; Sinclair *et al.*, 2001; González de la Aleja Tejera *et al.*, 2008; López y Pomposo-Gaztelu, 2010), y se asocia muy frecuentemente a intratabilidad farmacológica (70 %) (Raybaud *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2003).

Un paciente se considera fármaco-resistente cuando después del tratamiento con dos o más fármacos antiepilépticos en dosis óptimas, sigue presentado una o más CE en un período de al menos 18 meses (Wiebe *et al.*, 2001); en la mayoría de estos casos, la recomendación del neurólogo es la resección del foco epileptogénico mediante cirugía (Engel *et al.*, 2003; Vázquez, 2008).

La esclerosis del hipocampo se distingue por presentar pérdida de la densidad neuronal y gliosis del tejido que se ve reflejada por estudios de resonancia magnética como disminución del volumen hipocampal (ver figura 2); asimismo, se ha observado que esta lesión en pacientes con ELT también se asocia a daños en estructuras extrahipocampales como el subículo, la amígdala, la corteza temporal, el tálamo, la corteza cingulada posterior o el cerebelo (Uscátegui e Izquierdo, 2003; Cormack *et al.*, 2005; Consalvo *et al.*, 2012).

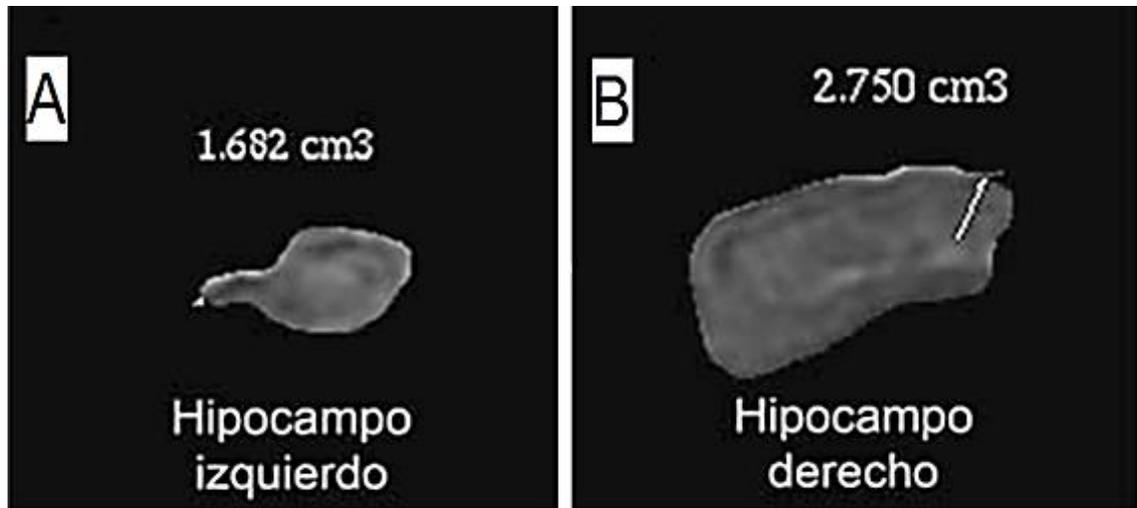


Figura 2. Neuro-imagen que muestra esclerosis del hipocampo. Comparación del volumen entre un hipocampo con esclerosis (A) y un hipocampo sin alteraciones (B) del mismo paciente. Fuente: <https://www.imaios.com®>

2.2 ELT y corteza temporal

En pacientes con ELT, estudios realizados con resonancia magnética han mostrado disminución generalizada del volumen del lóbulo temporal (Bernasconi *et al.*, 2003), en donde además del hipocampo se ve afectada la zona temporopolar (Consalvo *et al.*, 2012), los giros temporales superior e inferior (Moran *et al.*, 2001) y las áreas perirrinal y entorrinal (Jutila *et al.*, 2001) (ver figura 1).

Asimismo, un análisis comparativo realizado con tomografía computarizada de emisión monofotónica interictal y tomografía por emisión de positrones, mostró disminución del flujo sanguíneo y baja absorción de la glucosa en la corteza lateral ipsilateral a la zona epileptogénica, lo que se asoció a la disminución en el volumen de esta estructura medido con resonancia magnética (Nagata *et al.*, 1995). Por otro lado, en un estudio

donde se inyectó vía intravenosa el trazador fluorodesoxiglucosa y con ayuda de la tomografía por emisión de positrones, se observó un hipo-metabolismo de la glucosa no solamente en la zona mesial donde se localiza el hipocampo, sino en toda la corteza temporal ipsilateral a la zona epileptogénica al compararlo con su contralateral, se ha sugerido que este efecto puede deberse a una desaferenciación de las proyecciones del hipocampo, resultado en el hipo-metabolismo más extendido a sitios distantes (Diehl *et al.*, 2003).

A nivel histológico, se ha observado alta prevalencia de displasias corticales en la corteza cerebral de pacientes con ELT (Tassi *et al.*, 2002; Fauser *et al.*, 2004; Fauser y Schulze-Bonhage, 2006) y su presencia se ha asociado en un 76 % de los casos con epilepsia farmacorresistente (Gálvez *et al.*, 2009). Las displasias corticales corresponden a alteraciones en la corticogénesis (Colombo *et al.*, 2003; Palmini *et al.*, 2004; Abdel *et al.*, 2009) que en individuos con ELT se refleja en pérdida de la estructura y la organización de todas las capas de la corteza temporal inferior y del giro fusiforme (Blumcke *et al.*, 2011), muerte neuronal apoptótica en la capa IV de la neocorteza (Lorigados-Pedre *et al.*, 2008), migración inadecuada de las células piramidales de Betz, que normalmente se encuentran en la capa V, se detectan en la capa I (Taylor *et al.*, 1971), así como afectación en los procesos de crecimiento y diferenciación neuronal que se manifiestan por la presencia de células *balloon* de Taylor (células excesivamente grandes con una gran cantidad de citoplasma) (Ver figura 3) (Taylor *et al.*, 1971; Emery *et al.*, 1997; Palmini *et al.*, 2004).

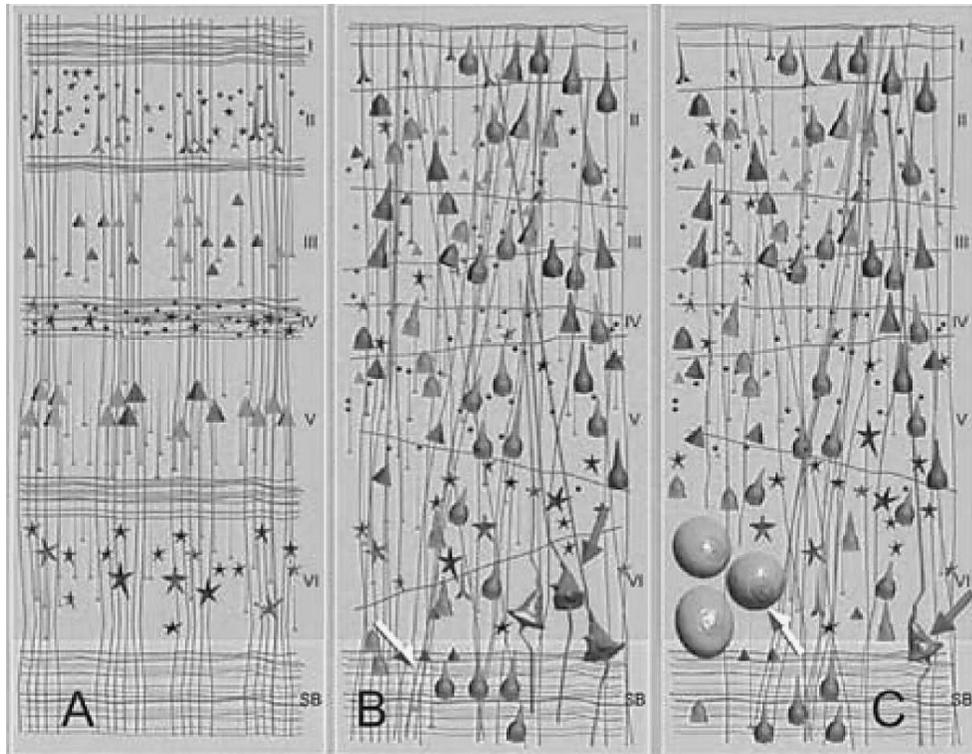


Figura 3. Representación esquemática del patrón histológico de las capas de la corteza cerebral y la presencia de displasias corticales. (A) En el cerebro normal la corteza presenta una estructura organizada en 6 capas. (B) En la displasia cortical tipo IIA, se observa una pérdida de la estructura y presencia de células dismórficas anormales (flechas), en la unión entre la sustancia gris y la sustancia blanca que produce borrosidad en sus límites. (C) En la displasia cortical tipo IIB se observa la presencia de células *balloon* de Taylor. Fuente: Gálvez, M., Rojas, G. C., Cordovez, J. M., Ladrón de Guevara, D., Campos, M. P., e Isabel-López, I. S. (2009). «Displasias corticales como causa de epilepsia y sus representaciones en las imágenes». *Rev Chil Radiol.* 15(1):25-38.

Como se puede deducir de los estudios de neuro-imagen e histopatológicos, la corteza de pacientes con ELT presenta alteraciones que se asocian con el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la migración neuronal, todos estos procesos están regulados, entre otros elementos, por el **Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF, por sus siglas en inglés)** (Kornblum *et al.*, 1995; Tolwani *et al.*, 2002; Zigova *et al.*, 2002; Gottmann *et al.*, 2009; Waterhouse *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Vedunova *et al.*, 2015), por lo que consideramos importante conocer cómo se expresa en corteza temporal de pacientes con ELT.

2.3 Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y epilepsia

El **BDNF** forma parte de la familia de las neurotrofinas y participa en el desarrollo y la fisiología del sistema nervioso central. Esta neurotrofina se expresa abundantemente en el cerebro, preponderantemente en el lóbulo temporal (Hofer *et al.*, 1990; Webster *et al.*, 2002; Pruunsild *et al.*, 2007). Efectúa su función a través de dos clases de receptores transmembranales: tirosina quinasa B (TrkB) y p75 (Arévalo y Wu, 2006; Armas-Castañeda *et al.*, 2010; McNamara y Scharfman, 2012). Asimismo, se han descrito incrementos y/o disminuciones en la expresión de BDNF en modelos animales de epilepsia (Binder *et al.*, 2001; Saarelainen *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2010; Zagrebelsky *et al.*, 2014).

Los dos modelos animales más usados para estudiar la ELT son el **kindling** y el **modelo del status epilepticus** (Tabla 1). En ambos casos, se presentan tres fases, primero se induce hiper-excitabilidad en el sistema nervioso central que culmina con la aparición de CE tónico-clónico generalizadas, que se caracteriza por la presencia de rigidez corporal alternada con movimientos bruscos (**fase aguda**); tras esta lesión, se sigue una **fase de latencia** que se caracteriza por la ausencia de CE, durante la cual ocurren una serie de cambios histopatológicos y/o funcionales que culminan en la aparición de CE recurrentes y espontáneas, a esta última etapa se le conoce como **fase crónica**, y refleja el estado en el que se encuentran los pacientes con ELT (Lähteinen, 2004; Pastor *et al.*, 2006; Garcia-Garcia *et al.*, 2010).

Status epilepticus	Kindling
En este modelo mediante una inyección sistémica o intra-cerebral, se aplican diferentes agentes convulsivos como el ácido kaínico y/o la pilocarpina .	Consiste en la estimulación repetida, generalmente eléctrica, en diversas estructuras del sistema límbico (habitualmente amígdala, corteza e hipocampo) de modo que con el paso del tiempo hay aumento de la excitabilidad y las neuronas se transforman en "neuronas patológicas" capaces de generar crisis epilépticas.

Tabla 1. Modelos experimentales de epilepsia. Fuente: Adaptado de Garcia-Garcia, M. E., García, I. M., y Matias, J. G. (2010). «Modelos experimentales en Epilepsia». *Neurología*. 25(3):181-188.

En diversos estudios donde se utilizó el modelo de kindling, tras la primera estimulación eléctrica en el hipocampo, se observó aumento de los niveles de ARNm de BDNF en las células granulares del giro dentado (Ernfors *et al.*, 1991; Bengzon *et al.*, 1993; Kokaia *et al.*, 1996). Kokaia *et al.*, (1996) documentaron incremento similar en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo dos horas después de la estimulación. Respecto al uso de los modelos del status epilepticus, se observó que a las 4 horas de su inducción con ácido kaínico, el ARNm de BDNF aumentó 10 veces más en la capa granular del giro dentado, mientras que las capas piramidales de las regiones CA1, CA3 y CA4 del hipocampo exhibieron incrementos de dos a seis veces respecto al grupo control (Dugich-Djordjevic *et al.*, 1992).

Por otro lado, fuera del hipocampo también se han observado cambios en la expresión de BDNF. Por ejemplo, utilizando kindling en la amígdala, se incrementaron 5 veces los niveles de ARNm de esta neurotrofina en la corteza entorrinal, comparado con un grupo control, lo cual fue evaluado durante la etapa aguda del proceso epileptogénico (Sato *et al.*, 1996).

En resumen, un incremento de los niveles de BDNF en el hipocampo y áreas extra-hipocampales se han descrito en modelos animales de epilepsia; en este sentido, diversos autores han propuesto que estos cambios podrían participar en el desarrollo y perpetuación de este trastorno, mostrando efectos pro-epileptogénicos (Chiaruttini *et al.*, 2008); sin embargo, esta propuesta ha sido motivo de controversia, pues otros estudios han observado que BDNF influye en la prevención de la epileptogénesis, considerándolo anti-epileptogénico (Gall, 1993; Binder *et al.*, 2001; Koyama e Ikeagaya, 2005).

2.3.1 Efectos pro-epileptogénicos de BDNF

Entre las observaciones que apoyan a BDNF como detonante de efectos pro-epileptogénicos, se encuentra un estudio realizado por Scharfman *et al.*, (1999) en el que observaron que la exposición *in vitro* a una solución de BDNF (200 ng/mL) sobre rebanadas de hipocampo obtenidas de ratas tratadas con pilocarpina, indujo incremento en la excitabilidad de las células granulares; en este mismo sentido Croll *et al.*, (1999) registraron hiper-excitabilidad en la corteza y el hipocampo de ratones transgénicos diseñados para sobre-expresar BDNF y que previamente habían sido tratados con ácido kaínico. Proponiendo así, que BDNF incrementa la excitabilidad en áreas hipocampales y extra-hipocampales.

Por otro lado, en ratas a las que se les realizó estimulación eléctrica por 11 días y que recibieron micro-inyecciones hipocampales de BDNF (0.5 µg) los días 1, 5 y 9,

requirieron menos estimulaciones eléctricas para alcanzar la fase 1 de acuerdo a la escala de Racine (ver figura 4) (Racine, 1972) al compararlas con ratas a las que no se les administró esta neurotrofina (Xu *et al.*, 2004). De la misma forma, se tiene registrado de mayor severidad de las CE en un modelo de ratones transgénicos diseñados para sobre-expresar BDNF y que fueron tratados con ácido kaínico (Croll *et al.*, 1999).

Fases	Características
0	Ausencia de comportamientos anormales
1 y 2	Se asocian a actividad facial y oral, incluye cierre de ojos ipsilateral y parpadeo, seguido de agitación de cabeza y babeo.
3	Contracción y relajación de extremidades anteriores.
4	Las convulsiones se generalizan, presentan contracciones y relajaciones más fuertes y comienzan a levantarse.
5	Levantamiento dramático y caída. Aparición de convulsiones tónico-clónicas generalizadas que incluyen las 4 extremidades.

Figura 4. Categorización en modelos animales de las crisis epilépticas de acuerdo a Racine. Los estadios convulsivos se clasifican de la fase 0 a la fase 5. Fuente: Racine, R. J. (1972). «Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure». *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 32(3):281-294.

Asimismo, en ratones diseñados para disminuir la expresión de BDNF (+/-) se observó retraso en la aparición de las CE originadas por el modelo de kindling (Kokaia *et al.*, 1995; He *et al.*, 2004). Más aún, en un estudio donde se disminuyó la funcionalidad de BDNF utilizando ratones transgénicos que sobre-expresan TrkB-T1 (un receptor inactivo de BDNF), se describió una disminución de las CE después del tratamiento con ácido kaínico (Lähteinen *et al.*, 2002). Además se tiene evidencia que en ratas, la inyección hipocampal de altas dosis de BDNF (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por 14 días) induce la aparición de CE (Scharfman *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que en modelos animales de

epilepsia la neurotrofina puede acelerar e incluso inducir la aparición de CE, además de incrementar la gravedad de las CE.

El BDNF también se ha asociado a la presencia de alteraciones histológicas presentes en la ELT. Por ejemplo, se ha observado que la exposición *in vitro* a una solución de BDNF (200 ng/mL) sobre rebanadas de hipocampo obtenidas de ratas tratadas con pilocarpina, presentan migración inadecuada de la fibras musgosas (Scharfman *et al.*, 1999), igualmente se ha observado que en ratas tratadas con ácido kaínico, la administración intra-hipocampal de BDNF (12 µg por día) provoca muerte neuronal de la región CA3 (Rudge *et al.*, 1998).

La información descrita en los párrafos anteriores lleva a proponer a BDNF como un agente pro-epileptogénico; sin embargo, y como se mencionó anteriormente, otros grupos de investigación han observado que BDNF podría tener un efecto protector en la epileptogénesis (Simonato *et al.*, 2006; Simonato y Zucchini, 2010).

2.3.2 Efectos anti-epileptogénicos de BDNF

Dentro de los trabajos que proponen a BDNF como molécula anti-epileptogénica y neuro-protectora encontramos el realizado por Xu *et al.*, (2004) quienes estimularon eléctricamente el hipocampo de ratas dos veces diarias durante 11 días, periodo en el que también se infundió BDNF mediante bombas osmóticas [12 µg/día], lo que redujo

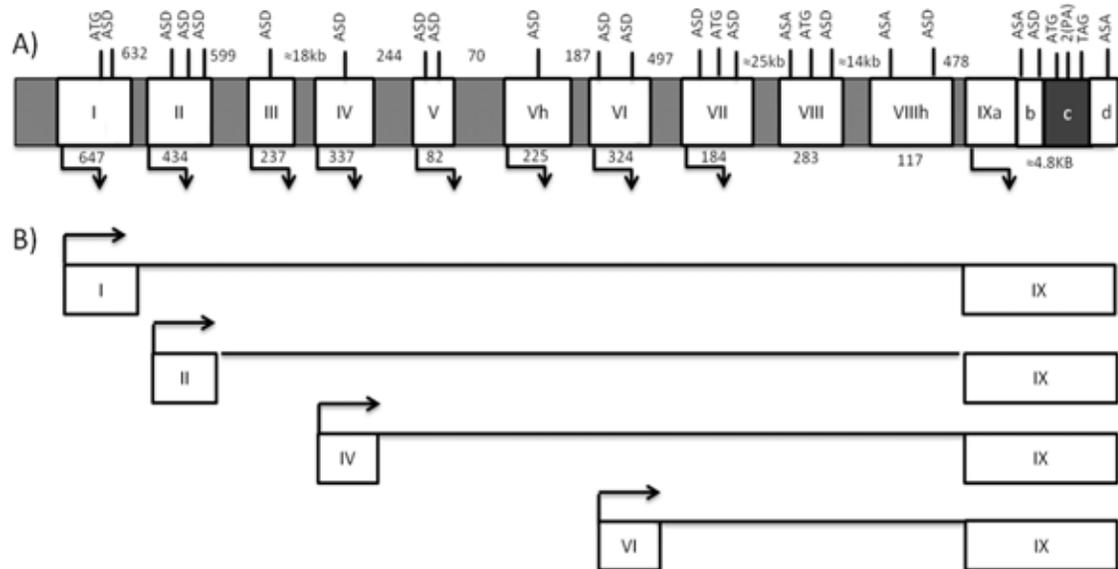
significativamente la aparición de las CE. Por otra parte, Reibel *et al.*, (2000) observaron que las ratas a las que se les administró BDNF (6 o 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) intrahipocampal (unilateral o bilateral), requirieron más estimulaciones eléctricas para alcanzar las etapas 2, 3 y 4 de acuerdo a la escala de Racine, en comparación con sus controles; más aún, la infusión de un oligonucleótido anti-sentido (12 nmol/día) que redujo la expresión de BDNF, exacerbó las CE producidas por kindling. Asimismo, la inyección de diferentes dosis de BDNF (1 de 10 μL [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] y 4 de 2.5 μL [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$]) vía hipocampal a ratas tratadas con pilocarpina durante el periodo de latencia, retraso la aparición de las CE espontáneas (Eftekhari *et al.*, 2014); en este mismo modelo, la inoculación hipocampal de un vector que contiene a BDNF y al factor de crecimiento para fibroblastos-2 disminuyó la severidad de las CE de acuerdo a la escala de Racine y el número de CE por día (Simonato *et al.*, 2006; Paradiso *et al.*, 2009 Bovolenta *et al.*, 2010). Los resultados anteriores indican que la administración de BDNF puede asociarse a la disminución de las CE, además de la reducción en la severidad de las mismas.

Los estudios descritos en el párrafo anterior también describen que la inoculación hipocampal del vector BDNF/factor de crecimiento para fibroblastos-2, tres días después de inducido el status epilepticus, redujo la pérdida neuronal en el hipocampo, además de disminuir la astrocitosis (Simonato *et al.*, 2006; Paradiso *et al.*, 2009), indicando que esta neurotrofina también puede revertir los cambios histológicos asociados a la epilepsia.

Los efectos opuestos de BDNF en los distintos modelos animales de epilepsia podrían deberse a que la expresión de esta neurotrofina no ésta circunscrita a un solo ARNm, ya que se tiene registros de la presencia de múltiples transcritos (Pruunsild *et al.*, 2007, Martínez-Levy y Cruz Fuentes, 2014) y como se explicará en la siguiente sección, se ha propuesto que cada uno de ellos podrían tener funciones diversas (Simonato *et al.*, 2006; Aliaga *et al.*, 2009) que pudieran ayudar a explicar los efectos contrastantes de esta neurotrofina en relación a la epilepsia.

2.3.3 Transcritos de BDNF y modelos animales de epilepsia

En el humano, el gen *BDNF* se localiza en el cromosoma 11 (11p13), consta de 11 exones y 9 promotores funcionales que regulan la transcripción de por lo menos 17 ARNm distintos, a partir de los cuales se traduce solamente una proteína madura (ver figura 5) (Maisonpierre *et al.*, 1991; Ozcelik *et al.*, 1991; Pruunsild *et al.*, 2007; Martínez-Levy y Cruz-Fuentes, 2014).



Pruunsild et al., 2007, Boule et al., 2011

Figura 5. Estructura del gen humano de BDNF. A) Las cajas blancas indican los exones, los números en la parte superior los pares de bases que los conforman. Los espacios en gris indican los intrones y los números en la parte inferior los pares de bases que los constituyen. Las flechas indican sitios de inicio de la transcripción, las marcas ASD son sitios en los que puede ocurrir splicing alternativo, mientras que las marcas ATG son los sitios de inicio de la traducción y las marcas (PA) corresponden a sitios alternativos de poli-adenilación de los transcritos. Es importante destacar que en la región 5' de los exones I, II, III, IV, V, Vh, VI, VII y IX presenta promotores independientes que regulan la expresión de cada transcrito. Finalmente, la región c del exón IX marcada con gris oscuro corresponde a la región codificante de proBDNF. B) Los transcritos mejor caracterizados hasta el momento son los que contienen los exones I, II, IV y VI, todos ellos se sintetizan por mecanismos de splicing alternativo junto con el exón IX (Modificado de Martínez-Levy y Cruz-Fuentes, 2014).

En condiciones basales, Aid *et al.*, (2007) mostraron que los transcritos I, II, IV y VI de BDNF muestran una expresión diferente a lo largo de distintas regiones del cerebro, similar a lo documentado en modelos de epilepsia. Por ejemplo, Dias *et al.*, (2003) observaron que el uso de kindling aumenta los niveles de expresión de los transcritos de BDNF de manera heterogénea a lo largo de las diferentes estructuras analizadas (ver tabla 2), por otro lado, se documentó que después de la administración de ácido kaínico, hubo aumento generalizado de los niveles de expresión de los transcritos I, II, IV y VI

de BDNF en corteza e hipocampo, sin embargo se mostró una marcada diferencia cuando se evaluaron otras estructuras, BDNF-I incremento en el tálamo, BDNF-II y BDNF-IV fueron detectados en el cerebelo y BDNF-VI en el núcleo estriado (Timmusk *et al.*, 1993).

Modelo	BDNF-I	BDNF-II	BDNF-IV	BDNF-VI
Agudo	AMG, CM, CP y GD	AMG, CM, CP y GD	GD	GD
Crónico	CA4, CM y capas del córtex	AMG, CA3, CA4, CM, GD, y capas del córtex	GD	GD

Tabla 2. Expresión de los diferentes transcritos de BDNF en distintas zonas del cerebro ante la inducción de crisis electro-convulsivas agudas o crónicas. Abreviaturas: AMG: Amígdala; CA3: Cuerno de Amón 3; CA4: Cuerno de Amón 4; CM: Corteza motora; CP: Corteza piriforme; GD: Giro dentado. Fuente: Adaptado de Dias, B. G., *et al.* (2003). «Differential regulation of Brian Neurotrophic Factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain». *Neuropharmacology*. 45(4):553-563.

Asimismo, los transcritos (I, II, IV y VI) de BDNF **no presentan** el mismo patrón de expresión a lo largo de una neurona. Por ejemplo, en cultivos neuronales de corteza e hipotálamo de rata, se observó que los transcritos I y IV se sitúan preferentemente en el soma neural, mientras que los transcritos II y VI están localizados en mayor medida en las dendritas apicales (Pattabiraman *et al.*, 2005; Marmigère *et al.*, 2001; Aliaga *et al.*, 2009), resultados similares se registraron en modelos animales después de administrar agentes convulsivos (Chiaruttini *et al.*, 2008).

Sobre esta evidencia, Baj *et al.*, (2013) propusieron que la segregación de los distintos ARNm a lo largo del cuerpo neuronal representa un código para dirigir la proteína ya sea en el soma o en las dendritas basales y apicales, y así producir efectos locales. En este

sentido, se tiene documentado que BDNF-I y BDNF-IV que se encuentran en el soma neural estarían favoreciendo la arborización dendrítica basal, promoviendo la reconexión de las neuronas GABAérgicas en cultivos de neuronas hipocampales (Baj *et al.*, 2011). Por otro lado, BDNF-II y BDNF-VI que se localizan en las dendritas apicales, se han asociado con el desarrollo y proliferación de los contactos sinápticos en esta región celular (Tongiorgi *et al.*, 2006; Chiaruttini *et al.*, 2008) (ver figura 6), y se ha sugerido que un aumento de estos ARNm en la región CA3 del hipocampo pareciera mejorar la conexión de esta estructura con el giro dentado (Baj *et al.*, 2012). Esto apunta que la segregación espacial de los transcritos I, II, IV y VI de BDNF estarían promoviendo efectos selectivos en diferentes regiones neuronales.

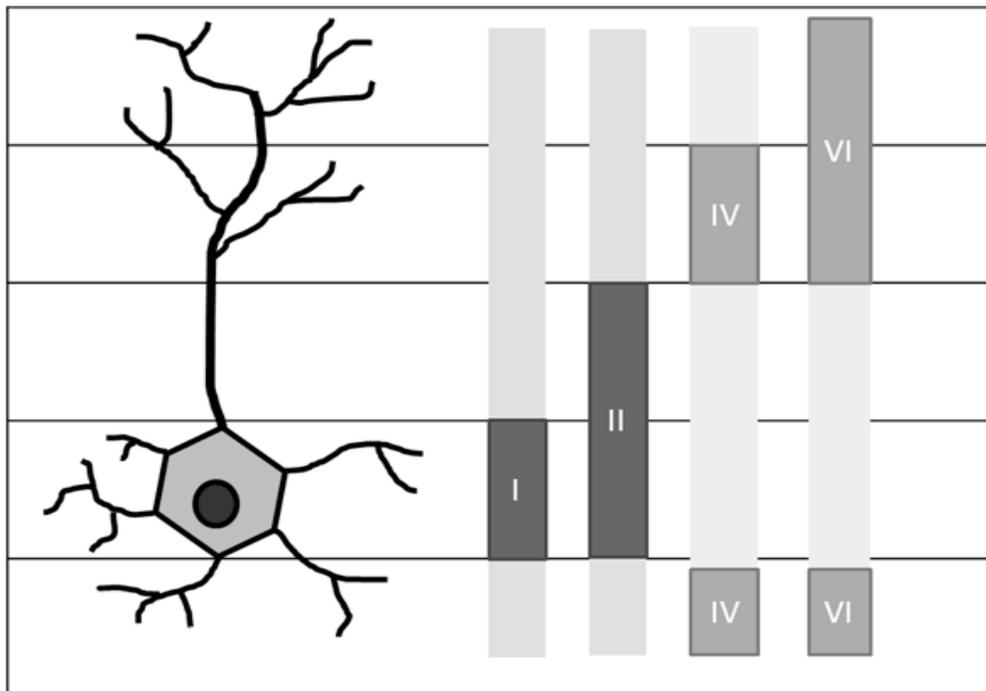


Figura 6. Esquematación de la distribución espacial de los transcritos de BDNF en una neurona hipocámpal. Fuente: Adaptado de Baj, G., *et al.* (2011). «Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(40):16813–16818.

2.3.4 BDNF en pacientes con ELT

Han sido contados los estudios que han evaluado como se expresa el gen BDNF en tejido epiléptico humano. Se ha observado incremento significativo de ARNm para BDNF en el hipocampo (Murray *et al.*, 2000), en particular, en la capa granular del giro dentado de pacientes con ELT en comparación con un grupo control (Mathern *et al.*, 1997).

Por otro lado, en la corteza cerebral se registró mayor expresión del receptor TrkB en el soma de las neuronas corticales (Kim *et al.*, 2002), y aumento de la proteína de BDNF en la corteza temporal comparado con muestras de autopsias de sujetos sin antecedentes de trastornos neurológicos (Takahashi *et al.*, 1999). Estos resultados indican que la expresión de BDNF y su receptor incrementan en hipocampo y corteza temporal de pacientes con ELT, similar a lo descrito en los estudios en modelos animales de epilepsia (Lähteinen *et al.*, 2002). También se han evidenciado cambios en la expresión de BDNF en relación a variables clínicas como la presencia de esclerosis del hipocampo, la comorbilidad o el uso de fármacos como el ácido valproico o la Sertralina (ver tabla 3).

Finalmente, el grupo de investigación con el que desarrolle este trabajo, fue pionero en evaluar la expresión de distintos transcritos de BDNF en pacientes con ELT en relación a un grupo control (Martínez-Levy *et al.*, 2016), mostrando sólo incremento en la

expresión del transcrito VI en muestras de hipocampo. Sin embargo, no hay estudios que evalúen la expresión de los transcritos más estudiados (I, II, IV y VI) en corteza temporal, una zona que ha mostrado evidentes alteraciones en pacientes con ELT (Taylor *et al.*, 1971; Hardiman *et al.*, 1988; Salanova *et al.*, 2004; Lerner *et al.*, 2009; Blumcke *et al.*, 2011; Hauptman y Mathern, 2012; Pascual-Castroviejo *et al.*, 2012; Palmiini y Holthausen, 2013).

Referencia	Variables clínicas analizadas	Cambios en los niveles de BDNF	Tejido
Mathern <i>et al.</i> , 1997	EH	↑ ARNm	Hipocampo
Brunoni <i>et al.</i> , 2008	Depresión	↓ proteína	Suero
Matrisciano <i>et al.</i> , 2009	SRT	↓ ARNm	Suero
Hou <i>et al.</i> , 2010	EH + AVP	↓ proteína	Hipocampo
D'Addario <i>et al.</i> , 2013	Depresión	↓ proteína	Sangre periférica
Kandratavicius <i>et al.</i> , 2013	Depresión	↓ proteína	Hipocampo
Kandratavicius <i>et al.</i> , 2013	Depresión + FLX	↑ proteína	Hipocampo
Kandratavicius <i>et al.</i> , 2013	Psicosis + HAL	↓ proteína	Hipocampo
Dwivedi, 2014	Depresión	↓ proteína	Suero y plasma
Martínez-Levy <i>et al.</i> , 2016	ELT	↑ BDNF-VI	Hipocampo
Martínez-Levy <i>et al.</i> , 2016	SRT	↑ BDNF-VI	Hipocampo
Martínez-Levy <i>et al.</i> , 2016	TPM	↓ BDNF-VI	Hipocampo

Tabla 3. Variables clínicas asociadas a cambios en los niveles de expresión de BDNF. Abreviaturas: ↓: Disminución; ↑: Aumento; AVP: Ácido valproico; BDNF-VI: Transcrito que contiene al exón VI del factor neurotrófico derivado del cerebro; EH: Esclerosis del hipocampo; ELT: Epilepsia del lóbulo temporal; FLX: Fluoxetina; HAL: Haloperidol; SRT: Sertralina TPM: Topiramato.

3. JUSTIFICACIÓN

Recientemente, en hipocampo de pacientes con ELT observamos incremento del transcrito con el exón VI de BDNF (sin mostrar cambios significativos en los transcritos con los exones I, II y IV), efecto que fue más evidente en aquellos pacientes que usaron sertralina. Varios estudios han mostrado que la corteza temporal de pacientes con ELT también muestra alteraciones funcionales y estructurales asociadas a las funciones de BDNF; sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado la expresión de los 4 transcritos mencionados en la corteza temporal de pacientes con ELT en relación a un grupo control y en relación a diversas variables clínicas de interés como el tratamiento farmacológico usado previo a la cirugía.

4. HIPÓTESIS

- Si en el hipocampo de pacientes con ELT y el tratamiento farmacológico previó a la cirugía se asocia a aumento en los niveles de expresión de BDNF-VI entonces en la corteza temporal de estos mismos pacientes esperamos observar un incremento similar.

5. OBJETIVO GENERAL

- Analizar la expresión de los transcritos I, II, IV y VI de BDNF en corteza de pacientes con ELT.

5.1 Objetivos particulares

- Evaluar los niveles de expresión de los transcritos I, II, IV y VI de BDNF en relación a variables clínicas de interés como el género, la edad, la duración de la epilepsia, la lateralidad de la resección, la edad de inicio de la epilepsia, los posibles factores precipitantes, las comorbilidades con otros trastornos psiquiátricos (ansiedad y/o depresión) y/o el uso de diversos tratamientos farmacológicos.

6. MÉTODO

6.1 Diseño: Observacional, comparativo y transversal

Al momento de iniciar este proyecto, las muestras de corteza temporal ya habían sido colectadas, el procedimiento consistió en una amigdalohipocampectomía lateral que incluyó la micro-cirugía del hipocampo y la corteza temporal (San Juan *et al.*, 2011). Todos los procedimientos se llevaron a cabo con la aprobación del comité de ética institucional del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNNMVS) en la Ciudad de México. Los pacientes fueron sometidos a una evaluación de antecedentes médicos, y se les realizaron estudios de video-electroencefalografía para hacer el diagnóstico por la presencia de actividad convulsiva electrográfica. La resonancia magnética de alta resolución de 3 teslas con antena multicanal se utilizó para identificar y definir la esclerosis del hipocampo con base en una señal hiper-intensa en T2.

Para detectar la presencia de depresión y ansiedad en los pacientes, se utilizó la escala hospitalaria de ansiedad y depresión (Herrero *et al.*, 2003, Gómez-Arias *et al.*, 2011). Los diagnósticos fueron confirmados por el manual diagnóstico estadístico IV (DSM-IV) (First *et al.*, 2002) aplicada por un psiquiatra.

Las variables clínicas que se tomaron en cuenta, incluyeron: la edad de los sujetos en el momento de la cirugía, la presencia de esclerosis del hipocampo, la lateralidad de la resección, los posibles factores precipitantes, el género, la fecha de inicio de la epilepsia, la duración de la epilepsia, las comorbilidades con otros trastornos psiquiátricos (ansiedad y/o depresión) y los tratamientos farmacológicos correspondientes. Estos datos fueron obtenidos del historial clínico de los pacientes en el INNNMVS.

6.2 Evaluación y selección de los pacientes con ELT

Los sujetos que ingresaron a este protocolo fueron pacientes del INNNMVS. Se identificaron a los pacientes con diagnóstico de ELT y refractarios a tratamiento farmacológico. Cada uno de ellos firmó una carta de consentimiento informado donde aceptan participar en el protocolo de investigación clínica mediante la donación de un fragmento de corteza temporal obtenida de la cirugía que se realizara como alternativa en el control de las crisis epilépticas intratables.

6.2.1 Criterios de inclusión de los pacientes con ELT

- Candidatos a cirugía de epilepsia por diagnóstico de ELT.
- Tanto del sexo masculino como femenino.

6.2.2 Criterios de exclusión de los pacientes con ELT

- Padecimiento de enfermedades sistémicas graves que contra-indiquen una neuro-cirugía mayor.
- Pacientes con diagnóstico de enfermedad neuro-degenerativa.
- Falta de cooperación con el tratamiento.
- Presencia de implantes, prótesis metálicas y claustrofobia.

Las muestras de corteza temporal fueron obtenidas mediante una técnica quirúrgica denominada amigdalohipocampectomía lateral, y posteriormente almacenadas en solución salina de Ringer (pH 7.2) preparada con dietilpirocarbonato (DEPC) (evitando así la degradación del ARN). Posteriormente las muestras fueron trasladadas al departamento de genética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM) para la extracción del ARN ese mismo día.

6.2.3 Características de los pacientes con ELT

Se colectaron 19 muestras de corteza temporal de pacientes del INNNMVS diagnosticados con ELT, de los cuales el 54.9 % eran hombres. La edad promedio fue de 42.8 ± 11.5 años, el 54.9 % de los pacientes reportaron una lesión inicial como factor precipitante (componente que causa o que contribuye a la generación de una enfermedad, en este caso, de la epilepsia). La lateralidad de la resección fue del lado izquierdo en el 54.9 % de los casos. El tratamiento farmacológico más usado

corresponde a carbamazepina (68.4 %) seguido de ácido valproico (42.1 %), fenitoína (26.3 %), lamotrigina (15.8 %), clonazepam (10.5 %), fenobarbital (10.5 %), topiramato y levetiracetam (5.3 %). Asimismo, 26.3 % de los pacientes utilizaron antidepresivos ISRS como citalopram (n=1) o sertralina (n=4) para tratar la comorbilidad con síntomas de ansiedad y depresión. Las características más representativas fueron obtenidas de los registros clínicos y se ilustran en el tabla 4.

6.3 Evaluación y selección del grupo control

Las muestras que se analizaron en este protocolo fueron proporcionadas por el servicio médico forense (SEMEFO). Para la obtención de estas, un familiar cercano al individuo firmó una carta de consentimiento informado donde acceden a la donación de un fragmento de corteza temporal de su familiar fallecido.

6.3.1 Criterios de inclusión del grupo control

- Individuos que fallecieron y fueron trasladados al SEMEFO.
- Tanto del sexo masculino como femenino.

6.3.2 Criterios de exclusión del grupo control

- Que el individuo haya fallecido por afección neurológica o psiquiátrica.
- Que el tiempo post-mortem sea mayor a 18 horas al momento de la obtención de la muestra.

Las muestras de corteza temporal fueron almacenadas a -70°C después de la autopsia (evitando así la degradación del ARN), y trasladadas al departamento de genética del INPRFM para la extracción del ARN.

Muestra	EH*	Otras lesiones*	Género	Edad (años)	Duración de la epilepsia (años)	Número de crisis al mes	Lateralidad de la resección	Edad de inicio de la epilepsia (años)	Factores precipitantes	FAE	Otros fármacos	ENGEL
275	Si	-	Femenino	23	10	1	Izquierda	13	AHF	CBZ, LEV	-	III
276	Si	-	Masculino	54	41	15	Derecha	13	AHF, TCE	CBZ, LMG	-	I
282	Si	DCF	Masculino	37	28	2	Derecha	9	HIP	AVP, CBZ	SRT	I
283	Si	-	Masculino	30	16	5	Izquierda	14	-	AVP, CBZ	-	I
286	Si	DCF	Femenino	33	21	7	Derecha	12	AHF	AVP, FNB	-	I
289	Si	-	Masculino	37	32	3	Derecha	5	TCE, CF	CBZ	-	I
290	Si	-	Femenino	24	23	5	Derecha	1	TCE	AVP, CBZ	-	I
291	No	DCF	Masculino	34	4	60	Izquierda	30	-	CBZ	SRT	I
292	Si	-	Femenino	42	38	10	Izquierda	4	-	CBZ, LMG	-	I
293	Si	-	Masculino	23	13	5	Derecha	10	TCE	PHE, AVP	-	I
295	Si	-	Masculino	43	16	8	Derecha	27	-	AVP, PMD	-	I
296	Si	-	Femenino	38	8	4	Izquierda	30	-	AVP	-	I
301	Si	-	Masculino	56	45	12	Derecha	11	-	PHE	-	I
305	Si	-	Femenino	21	7	4	Izquierda	14	AHF, TCE	PHE	-	I
309	No	CYS	Masculino	49	35	30	Izquierda	14	-	CBZ, LC	SRT	I
355	Si	-	Masculino	60	52	2	Izquierda	8	TCE	AVP, CBZ, CNZ	RSP, BP	I
359	Si	-	Femenino	33	6	30	Izquierda	27	CF	PHE, CBZ, TPM	-	I
362	Si	-	Femenino	31	16	4	Izquierda	15	-	CNZ, CBZ	CTP	-
392	Si	-	Masculino	41	39	8	Izquierda	2	CF, AHF	PHE, CBZ, LMG	SRT	I

Tabla 4. Características representativas de los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal.

Abreviaturas: AHF: Antecedentes heredo-familiares; AVP: Ácido valproico (suspendido una semana antes de la cirugía); CBZ: Carbamazepina; CF: Crisis febriles; CNZ: Clonazepam; CTP: Citalopram; CYS: Cisticercosis; DCF: Displasia cortical focal; EH: Esclerosis del hipocampo; ELT: Epilepsia del lóbulo temporal; ENGEL: Escala utilizada para clasificar los resultados post-quirúrgicos de la epilepsia (Clase I: Libre de crisis, Clase II: Rara ocurrencia de crisis, Clase III: Meritoria mejoría de las crisis y Clase IV: No hay mejoría de las crisis); FAE: Fármacos antiepilépticos; FNB: Fenobarbital; HIP: Hipoxia; LC: Lacosamida; LEV: Levetiracetam; LTG: Lamotrigina; PHT: Fenitoína; PRM: Primidona; RSP: Risperidona; SRT: Sertralina; TCE: Trauma craneo-encefálico y TPM: Topiramato.

*Los estudios histopatológicos de esclerosis del hipocampo y de otras lesiones fueron verificados mediante resonancia magnética.

6.3.3 Características del grupo control

Se colectó un fragmento de corteza temporal de 8 individuos en el SEMEFO, los cuales tenían una edad promedio de 36.8 ± 16.9 años y seis de ellos fueron hombres (75.0%). En el 62.5 % de los casos la causa de muerte fue arma de fuego, en el 12.5% neumonía, trauma toracoabdominal o asfixia (12.5%). En todos los casos el tiempo post-mortem para la recolección de la muestra fue menor a 18 horas. Estas características se ilustran en la tabla 5.

Muestra	Género	Lateralidad de la resección	Edad (años)	Causa de muerte	Tiempo post-mortem (horas)
1	Masculino	Derecha	33	Arma de fuego	8-10
2	Masculino	Izquierda	37	Arma de fuego	2-5
3	Masculino	Izquierda	30	Arma de fuego	10-12
4	Masculino	Izquierda	73	Neumonía	10-12
5	Masculino	Izquierdo	36	Arma de fuego	10-12
6	Femenino	Izquierda	22	Trauma toracoabdominal	10-12
7	Femenino	Izquierda	18	Asfixia	12-14
8	Masculino	Izquierda	45	Asfixia	16-18

Tabla 5. Características representativas del grupo control.

6.4 Extracción de ARN

En un tubo de 1.5 mL se tomó una muestra de 500 μ g de corteza temporal, posteriormente para la homogenización del tejido se añadió 0.5 mL de solución D (tiocianato de guanidina + β mercapto-etanol). La técnica reportada por Chomczynski y Sacchi (1987) fue la empleada para la extracción del ARN.

6.5 Evaluación de la cantidad y calidad del ARN

La cuantificación del ARN extraído en cada muestra de corteza temporal de pacientes con ELT y de los controles se llevó a cabo midiendo la absorbancia con el espectrofotómetro *Nanodrop* (Thermo Scientific). Los siguientes parámetros se utilizaron para definir que las muestras tienen buena calidad y cantidad:

- Tener una concentración de 500 ng/ μ L o más.
- A260/A280 (pureza) entre 1.8 y 2.2 (No hay proteínas ni ADN detectables).
- A260/A230 entre 1.8 y 2.2 (Indica que no hay contaminación por fenoles).
- Si el valor A260/230 fue menor a 1.8 se realizó un relavado de la muestra.

6.6 Gel de integridad

La calidad del ARN se evaluó en geles de agarosa al 1% + formaldehído. Se corrieron en el gel 500 ng por muestra. Se consideró al ARN degradado cuando no se lograron distinguir nítidamente las bandas correspondientes al ARN ribosomal 28S y 18S, en este caso las muestra fueron descartadas del protocolo. Una imagen representativa muestra la aparición de las bandas en el gel de integridad (ver figura 7).

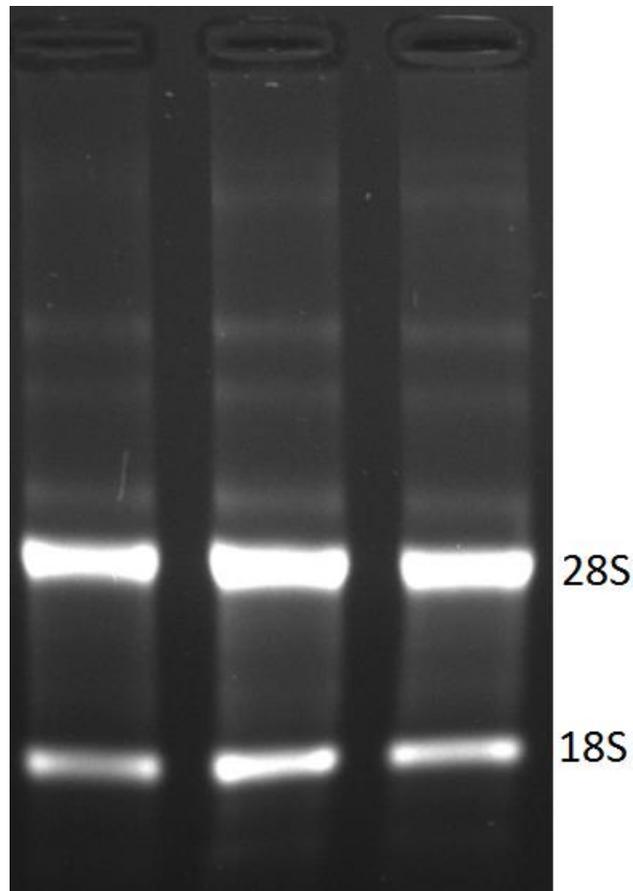


Figura 7. Gel de electroforesis que muestra la integridad del ARN total. Cada banda representa a un ARN ribosomal (28S y 18S, respectivamente).

6.7 Retro-transcripción

La transcripción reversa (RT) es una técnica que permite sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARNm, usa para ello la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (M-MLV TR (200 U/ μ L)); Oligo de Timinas (OdT) (0.1 mM); desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP) (100 mM) y 5X First Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂; Ditiotretitol (DTT) (100mM)] de Invitrogen.

6.8 Análisis de expresión de los transcritos de BDNF

Analizamos la expresión de los transcritos de BDNF en termociclador 7500 Real Time PCR System (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés), para ellos utilizamos las sondas Taqman: BDNF I-IX: hs00538277-m1, BDNF II-IX: hs00538278-m1, BDNF IV-IX: hs00380947-m1, BDNF VI-IX: hs00156058-m1 y como gen endógeno a la proteína de unión a cajas TATA (TBP).

6.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos del termociclador 7500 Real Time PCR System fueron transformados según la fórmula $2^{-\Delta CT}$ para la comparación de dos muestras independientes y $2^{-\Delta\Delta CT}$ para conocer la tasa de cambio de expresión de los transcritos de BDNF entre casos y control. Usamos T de Student o U de Mann-Whitney (según el comportamiento de los datos) para comparar los cambios en los niveles de expresión entre los grupos de estudio analizados (casos vs. control); para el análisis de las variables clínicas utilizamos la prueba de ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis (según el comportamiento de los casos) y para la comparación de posibles correlaciones usamos regresión lineal o coeficiente de correlación de Spearman (según el comportamiento de los casos). Todo lo anterior se realizó utilizando los programas estadísticos IBM® SPSS Statistics 20 y SigmaPlot - Scientific Data Analysis and Graphing Software. En todos los casos sólo se considerara como significativo los resultados cuyo probabilidad fue igual o menos al 0.05 ($P \leq 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1 Expresión de BDNF en cortezas de pacientes con ELT

Observamos incremento de BDNF-I ($p = 0.045$) y BDNF-VI ($p = 0.016$) en las cortezas de pacientes con ELT, estos transcritos aumentaron 2.4 y 1.9 veces, respectivamente, cuando fueron comparados con un grupo control (ver figura 8).

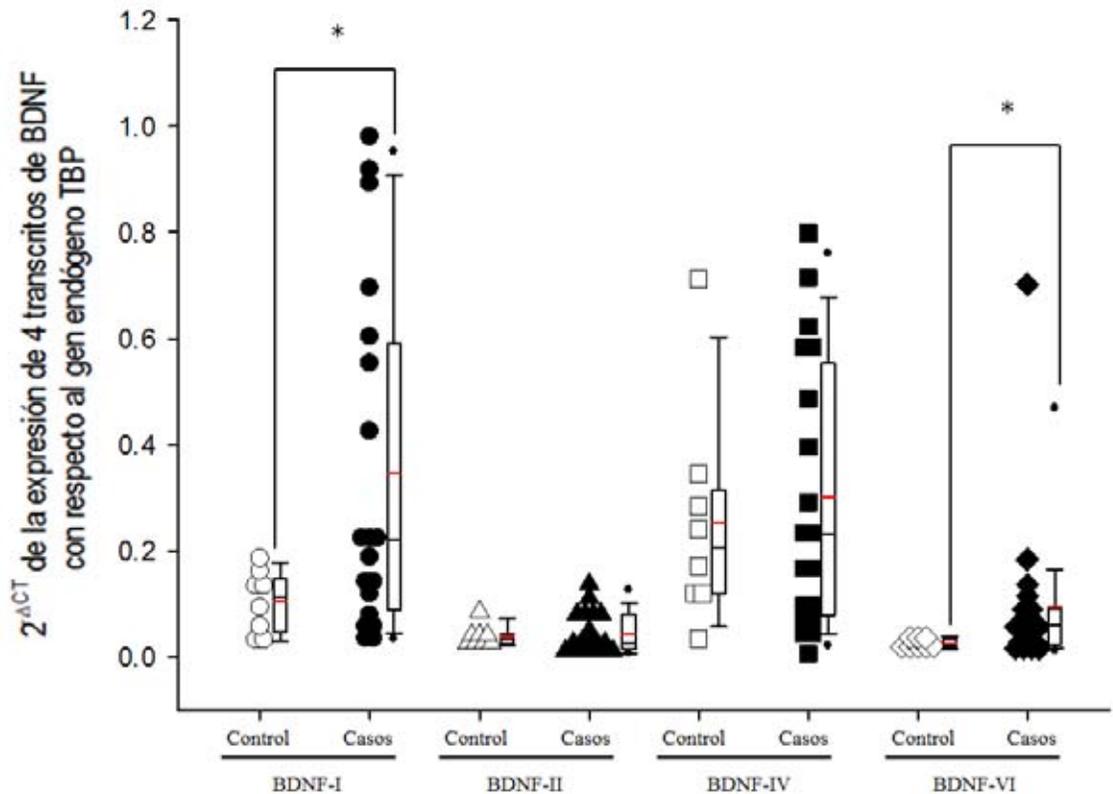


Figura 8. Expresión de los transcritos de BDNF en corteza de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. Los resultados muestran la media \pm la desviación estándar. Las figuras en blanco representan al grupo control y las figuras negras a los casos. Los círculos indican BDNF-I, los triángulos BDNF-II, los cuadrados BDNF-IV y los rombos BDNF-VI. * valores significativos $p \leq 0.05$ vs. grupo control (U de Mann-Whitney).

7.2 Expresión de BDNF en relación a las variables clínicas

Cuando analizamos las variables de edad (años), edad de inicio de la epilepsia (años), género, lateralidad de la resección, presencia de esclerosis del hipocampo y número de crisis al mes **no detectamos** cambios en los niveles de expresión de los transcritos de BDNF (ver tabla 6). Por otro lado, cuando evaluamos el efecto de los fármacos antiepilépticos en relación a un grupo control, observamos que el consumo de **carbamazepina** se asoció al incremento de los niveles de expresión de BDNF-I $p = 0.034$ (3.3 veces) y BDNF-VI $p = 0.013$ (2.8 veces) (ver figura 9), en relación al uso de **ácido valproico**, se observó aumento en aquellos pacientes que **no usaron** este fármaco (BDNF-I $p = 0.026$, 3.6 veces y BDNF-VI $p = 0.004$, 3.3 veces) (ver figura 10). Finalmente el consumo de fármacos antidepressivos del tipo inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) (**sertralina y citalopram**) se asociaron al incremento de 4.4 veces en los niveles de expresión de BDNF-VI ($p = 0.009$) (ver figura 11).

Variables clínicas	n	BDNF-I	BDNF-II	BDNF-IV	BDNF-VI
Género	Femenino = 8	U = 39,500	U = 36,500	t = -0,670	U = 43,000
	Masculino = 11	P ≥ 0.05	P ≥ 0.05	P ≥ 0.05	P ≥ 0.05
Lateralidad de la resección	Izquierdo = 11	U = 41,000	U = 42,500	U = 38,500	U = 41,000
	Derecho = 8	P ≥ 0.05	P ≥ 0.05	P ≥ 0.05	P ≥ 0.05
Esclerosis del hipocampo	Si = 17	U = 16,000	U = 12,500	U = 8,000	U = 13,000
	No = 2	P ≥ 0.05	P ≥ 0.05	P ≥ 0.05	P ≥ 0.05
Edad (años)	-	rho = -0,243 P ≥ 0.05	rho = 0,0822 P ≥ 0.05	F = 0,949 P ≥ 0.05	rho = 0,0376 P ≥ 0.05
Edad de inicio de la epilepsia (años)	-	rho = -0,413 P ≥ 0.05	rho = -0,505 P ≥ 0.05	rho = -0,362 P ≥ 0.05	rho = -0,202 P ≥ 0.05
Número de crisis al mes	-	rho = -0,357 P ≥ 0.05	rho = -0,348 P ≥ 0.05	rho = -0,202 P ≥ 0.05	rho = -0,0546 P ≥ 0.05

Tabla 6. Expresión de BDNF en relación a variables clínicas de interés. t: t de Student o U: U de Mann Whitney. Ninguna comparación resultó significativa. F: Regresión lineal o rho: Correlación de Spearman. Ninguna comparación resultó significativa.

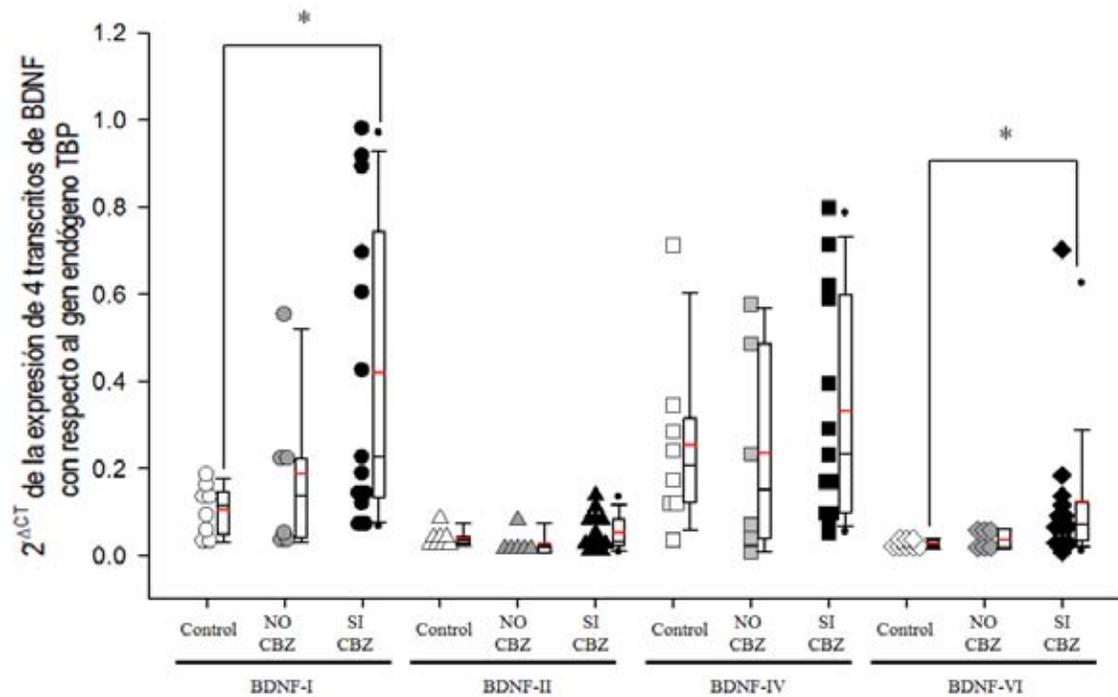


Figura 9. Expresión de los transcritos de BDNF en relación al uso de carbamazepina (CBZ). Se indican los grupos a comparar: **figuras blancas:** grupo control; **grises:** no uso el fármaco y **negras:** uso el fármaco. Los círculos indican BDNF-I, los triángulos BDNF-II, los cuadrados BDNF-IV y los rombos BDNF-VI. *valores significativos $p \leq 0.05$ vs. grupo control. (Kruskal-Wallis).

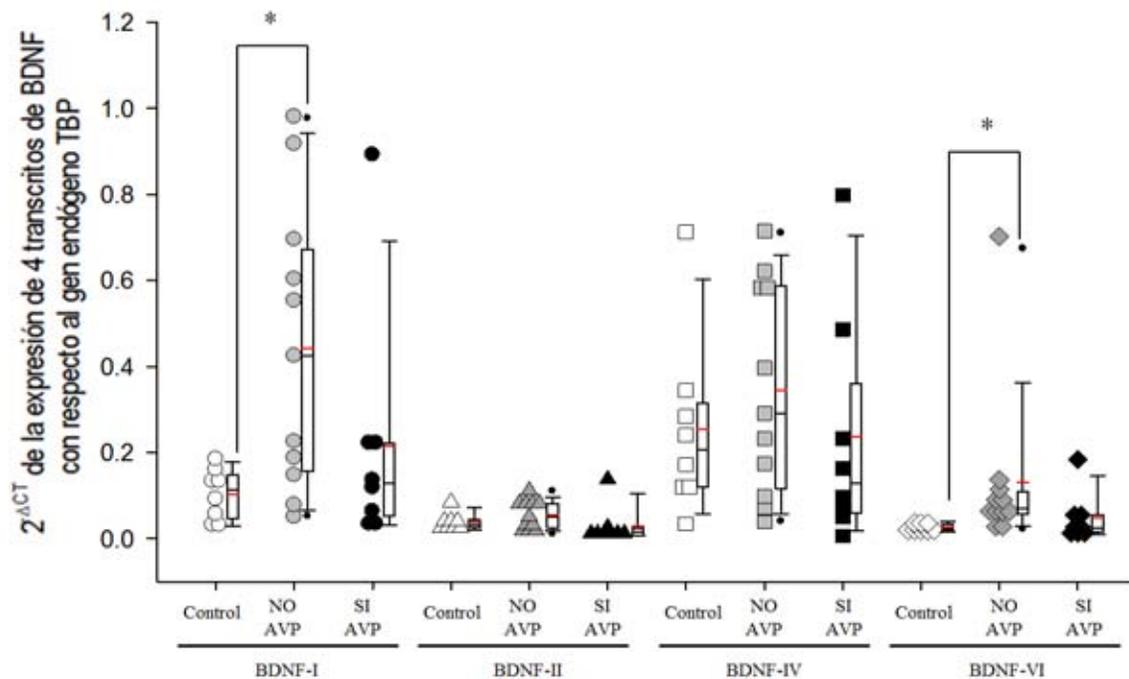


Figura 10. Expresión de los transcritos de BDNF en relación al uso de ácido valproico (AVP). Se indican los grupos a comparar: **figuras blancas:** grupo control; **grises:** no uso el fármaco y **negras:** uso el fármaco. Los círculos indican BDNF-I, los triángulos BDNF-II, los cuadrados BDNF-IV y los rombos BDNF-VI. *valores significativos $p \leq 0.05$ vs. grupo control. Kruskal-Wallis.

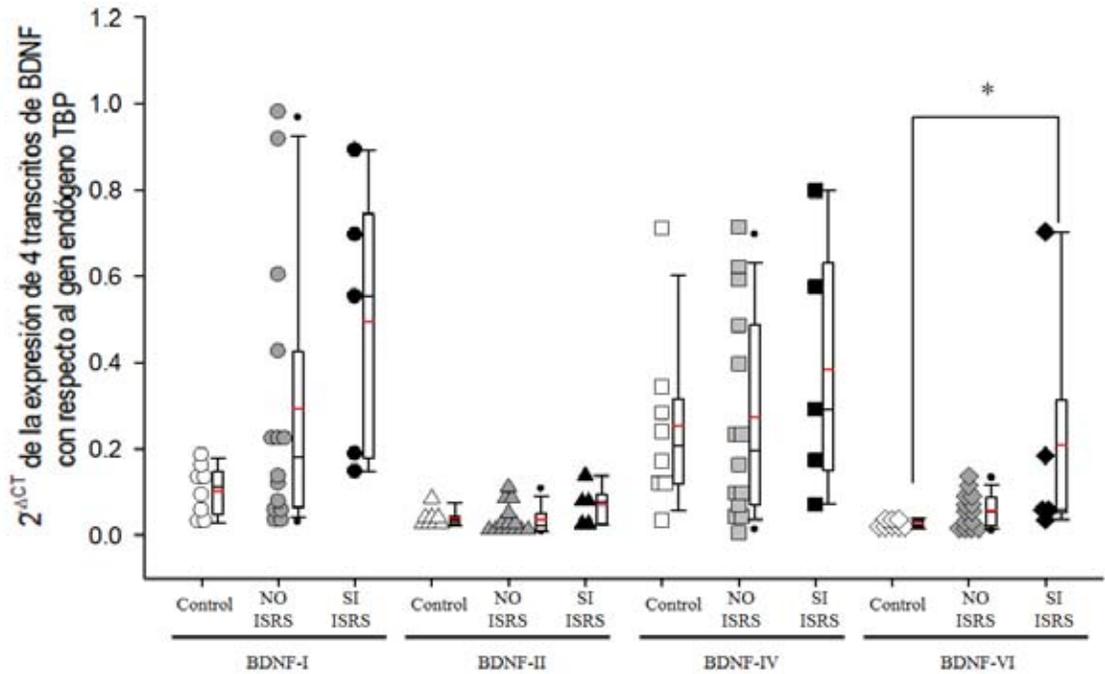


Figura 11. Expresión de los transcritos de BDNF en relación al uso de fármacos inhibidores de la recaptura de serotonina (ISRS). Se indican los grupos a comparar: **figuras blancas:** grupo control; **grises:** no uso el fármaco y **negras:** uso el fármaco. Los círculos indican BDNF-I, los triángulos BDNF-II, los cuadrados BDNF-IV y los rombos BDNF-VI. *valores significativos $p \leq 0.05$ vs. grupo control (Kruskal-Wallis).

8. DISCUSIÓN

Diversos estudios han mostrado aumento en los niveles globales de BDNF de tejido epiléptico humano (Mathern *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1999). Sin embargo, como mencionamos anteriormente, a partir de este gen se sintetizan múltiples transcritos y aunque todos ellos codifican para una proteína madura, presentan una distribución diferencial a lo largo de la neurona (Pattabiraman *et al.*, 2005; Tongiorgi *et al.*, 2006; Aid *et al.*, 2007; Aliaga *et al.*, 2009), esto ha llevado a sugerir que cada uno de ellos cumple funciones distintas dependiendo de su localización en las células nerviosas (Martínez-Levy y Cruz-Fuentes, 2014).

En este sentido, nuestro grupo de investigación fue pionero en registrar aumento en la expresión de BDNF-VI en el hipocampo de sujetos con ELT (Martínez-Levy *et al.*, 2016). Como en la corteza temporal de estos pacientes también se han documentado alteraciones en el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la migración neuronal, procesos regulados, entre otros elementos, por el BDNF (Kornblum *et al.*, 1995; Tolwani *et al.*, 2002; Zigova *et al.*, 2002; Gottmann *et al.*, 2009; Waterhouse *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Vedunova *et al.*, 2015), nos resultó de gran interés conocer la expresión particular de los transcritos mejor caracterizados (I, II, IV y VI) de esta neurotrofina.

En el presente estudio observamos que la corteza de pacientes con ELT muestra incremento en los niveles de expresión de los transcritos que contienen a los exones I y VI de BDNF en relación a un grupo control, lo que concuerda con el aumento observado en el hipocampo de estos pacientes. Respecto al incremento de BDNF-I, aunque el efecto no fue significativo en los hipocampos, si se observó tendencia ($p = 0.06$) (Martínez-Levy *et al.*, 2016). Los aumentos proteicos de BDNF previamente documentados en la corteza de pacientes epilépticos (Takahashi *et al.*, 1999) podrían entonces asociarse al incremento en la expresión de los transcritos que contienen a los exones I y VI de esta neurotrofina.

Estudios en modelos animales, *in vivo* e *in vitro* indican que BDNF-I se localiza principalmente en el soma y las dendritas basales, por lo que su incremento podría asociarse al desarrollo de la arborización dendrítica basal (Baj *et al.*, 2011). Respecto al incremento de BDNF-VI, este se localiza principalmente en las dendritas apicales donde se ha asociado con incremento en la arborización dendrítica en esta región celular y podría implicar una mejora en la comunicación sináptica entre diferentes estructuras cerebrales (Baj *et al.*, 2011; Baj *et al.*, 2012).

Con respecto al tratamiento farmacológico se observó que los pacientes que **no utilizaron** ácido valproico ($n = 11$, 57.9%, de los cuáles 9 utilizaron carbamazepina) mostraron incremento en la expresión de BDNF-I y BDNF-VI y los pacientes que usaron ácido valproico ($n=8$, 42.1%) mostraron resultados similares al grupo control.

Independientemente de que la mayoría de los trabajos en modelos animales indican que el uso del valproato se asocia al incremento en la expresión de BDNF (Chen *et al.*, 2006; Fukuchi *et al.*, 2009; Yasuda *et al.*, 2009; Varela *et al.*, 2015), el único estudio en el que se analizó BDNF en cultivos hipocampales de pacientes fármaco-resistentes con ELT, observó que el uso del ácido valproico *in vitro* está asociado con la disminución de los niveles proteicos de esta neurotrofina, mostrando resultados similares (Hou *et al.*, 2010), lo que concuerda con lo registrado en el presente trabajo. Es importante destacar que todos los pacientes de este estudio fueron refractarios a tratamiento farmacológico, por lo que la ausencia de cambios en la expresión de BDNF-I y BDNF-VI en pacientes que usaron AVP, no fue indicativo de un efecto anti-epileptogénico, más aún esta variable tampoco se asoció a una disminución en el número de crisis epilépticas previas a la cirugía.

Por otro lado, con respecto a la carbamazepina, observamos aumento en los niveles de expresión de BDNF-I y BDNF-VI en la corteza de estos pacientes; es de destacarse que este fármaco fue usado por la mayoría de nuestros casos (68.4 %). En este sentido, estudios previos han registrado que la administración de carbamazepina contrarrestó el crecimiento exacerbado del cerebro y del tamaño de las neuronas, así como indujo un incremento en la expresión de BDNF en un modelo de megacefalia (Lavebratt *et al.*, 2006), además en un modelo de citotoxicidad el uso de este fármaco evitó que disminuyeran los niveles proteicos de BDNF (Park *et al.*, 2015), y su administración en corteza frontal de roedores se ha asociado con aumento en los niveles de ARNm y de proteína de BDNF en relación a su grupo control (Chang *et al.*, 2009). Con respecto a

estudios en humanos, observamos que el uso de carbamazepina durante 4 semanas en pacientes diagnosticados con trastorno bipolar mostraron aumento en los niveles séricos de BDNF comparados con su grupo control (Maiti *et al.*, 2016). La CBZ fue el medicamento más utilizado en nuestro grupo de estudio y los resultados que observamos respecto al uso de este fármaco fueron similares a lo registrado en relación a presencia de ELT, por lo que este efecto podría deberse principalmente al uso de CBZ. Como mencionamos en el apartado anterior de esta tesis, el incremento observado de BDNF-I y BDNF-VI puede implicar un incremento en la sobrevivencia neuronal y arborización dendrítica mejorando la comunicación neuronal, nuevamente sin lograr un efecto anti-epileptogénico, ya que estos pacientes siguen presentando CE y su uso no se asoció a una disminución en las CE previas a la cirugía.

En relación al uso de fármacos antidepresivos (citalopram y sertralina) replicamos lo observado en el hipocampo de pacientes con ELT donde se mostró incremento de BDNF-VI ante el uso de sertralina (Martinez-Levy *et al.*, 2016), de igual forma en el hipocampo de pacientes epilépticos se observó aumento en los niveles proteicos de BDNF en relación al uso de fluoxetina (Kandratavicius *et al.*, 2013). Por otro lado, los estudios que han evaluado el efecto crónico de estos fármacos han mostrado incremento en los niveles de ARNm y proteína de BDNF en roedores que fueron sujetos a crisis electro-convulsivas (Nibuya *et al.*, 1996). En particular el aumento de BDNF-VI en relación al uso de los fármacos anti-depresivos en ratones estresados, se ha asociado con una mejora en tareas relacionadas a la memoria y aprendizaje (Gumuslu *et al.*, 2013); asimismo, Baj *et al.*, (2012) observan, al igual que nosotros, el incremento particular de

BDNF-VI en relación al uso de este tipo de fármacos en un modelo animal y estos autores proponen que este aumento podría estar actuando como un agente neuroprotector, además de ser participe en la neo-génesis dendrítica, como lo hemos venido discutiendo en la presente tesis.

Dada la naturaleza descriptiva de la presente investigación es difícil poder identificar los efectos biológicos de los cambios observados en la expresión de BDNF y lo que proponemos son hipótesis que deberán ser confirmadas por futuros estudios *in vitro* y en modelos animales.

9. CONCLUSIONES

En la corteza temporal de pacientes con ELT incrementaron los niveles de expresión de BDNF-I y BDNF-VI en relación a un grupo control.

En la corteza temporal de pacientes con ELT la administración de ácido valproico se asoció con los niveles de expresión análogos al grupo control, asimismo aquellos pacientes que no hicieron uso de este fármaco mostraron mayores niveles de expresión de BDNF-I y BDNF-VI

En la corteza temporal de pacientes con ELT el uso de carbamazepina incrementó los niveles de expresión de BDNF-I y BDNF-VI, mientras que el uso de antidepresivos del tipo ISRS aumentó solo los niveles de BDNF-VI.

REFERENCIAS

- Abdel, A., Kandell, A., Elsorogy, L., Elmongy, A., y Basett, A. (2009). «Disorders of cortical formation: MR imaging features». *AJNR Am J Neuroradiol.* 30(1):4-11.
- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., y Timmusk, T. (2007). «Mouse and Rat BDNF structure and expression revisited». *J Neurosci Res.* 85(3):525–535.
- Aliaga, E. E., Mendoza, I., y Tapia-Arancibia, L. (2009). «Distinct subcellular localization of BDNF transcripts in cultured hypothalamic neurons and modification by neuronal activation». *J Neural Transm (Vienna).* 116(1):23-32.
- Arévalo, J. C., y Wu, S. H. (2006). «Neurotrophin signaling: many exciting surprises!» *Cell. Mol. Life Sci.* 63(13):1523-1537.
- Armas-Castañeda, G., Pezoa-Jares, R. E., y Vásquez-Medina, J. E. (2010). «Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro». *El Residente.* 5(1):19-21.
- Baj, G., Leone, E., Chao, M. V., y Tongiorgi, E. (2011). «Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(40):16813–16818.
- Baj, G., D'Alessandro, V., Musazzi, L., Mallei, A., Sartori, C. R., Sciancalepore, M., Tardito, D. (2012). «Physical exercise and antidepressants enhance BDNF targeting in hippocampal CA3 dendrites: further evidence of a spatial code for BDNF splice variants». *Neuropsychopharmacology.* 37(7):1600–1611.
- Baj, G., Del Turco, D., Schlaudraff, J., Torelli, L., Deller, T., y Tongiorgi, E. (2013). «Regulation of the spatial code for BDNF mRNA isoforms in the rat hippocampus following pilocarpine-treatment: a systematic analysis using laser microdissection and quantitative real-time PCR». *Hippocampus.* 23(5):413-423.
- Bengzon, J., Kokaia, Z., Ernfors, P., Kokaia, M., Leanza, G., Nilsson, O. G., Persson, H. (1993). «Regulation of neurotrophin and trkA, trkB and trkC tyrosine kinase receptor messenger RNA expression in kindling». *Neuroscience.* 53(2):433-446.
- Bernasconi, N., Andermann, F., Arnold, D. L., y Bernasconi, A. (2003). «Entorhinal cortex MRI assessment in temporal, extratemporal, and idiopathic generalized epilepsy». *Epilepsia.* 44(8):1070-1074.

- Binder, D. K., Croll, S. D., Gall, C. M., y Scharfman, H. E. (2001). «BDNF and epilepsy: too much of a good thing?». *Trends Neurosci.* 24(1):47-53.
- Blumcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D., Vinters, H. V., Palmini, A., Jacques, T. S. (2011). «The clinico-pathological spectrum of Focal Cortical Dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission». *Epilepsia.* 52(1):158–174.
- Boulle, F., van den Hove, D. L., Jakob, S. B., Rutten, B. P., Hamon, M., van Os, J., Lesch, K. P. (2011) «Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders». *Mol Psychiatry.* 17(6):584-596.
- Bovolenta, R., Zucchini, S., Paradiso, B., Rodi, D., Merigo, F., Mora, G. N., Osculati, F., (2010). «Hippocampal FGF-2 and BDNF overexpression attenuates epileptogenesis-associated neuroinflammation and reduces spontaneous recurrent seizures». *Journal of Neuroinflammation.* 7:81.
- Brunoni, A. R., Lopes, M., y Fregni, F. (2008). «A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression». *Int J Neuropsychopharmacol.* 11(8):1169-1180.
- Campos, M. G., y Kanner, A. M. (2004). «Epilepsias diagnóstico y tratamiento». *Rev. chil. neuro-psiquiatr.* 41(4):252-268.
- Chang, Y. C., Rapoport, S. I., y Rao, J. S. (2009). «Chronic administration of mood stabilizers upregulates BDNF and bcl-2 expression levels in rat frontal cortex». *Neurochem Res.* 34 (3):536-541.
- Chen, P. S., Peng, G. S., Li, G., Yang, S., Wu, X., Wang, C. C., Wilson, B. (2006) «Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes». *Mol Psychiatry.* 11(12):1116-1125.
- Chen, S. Q., Cai, Q., Shen, Y. Y., Cai, X. Y., y Lei, H. Y. (2014). «Combined use of NGF/BDNF/bFGF promotes proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro». *Int J Devp Neuroscience.* 38():74-78.
- Chiaruttini, C., Sonogo, M., Baj, G., Simonato, M., y Tongiorgi, E. (2008). «BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae». *Mol Cell Neurosci.* 37(1):11-19.

- Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). «Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction». *Anal Biochem.* 162(1):156-159.
- Cohen I., Navarro V., Le Duigou C., y Miles R. (2003). «Mesial temporal lobe epilepsy: a pathological replay of development mechanism?» *Biol Cell.* 95:329-333.
- Colombo, N., Tassi, L., Galli, C., Citterio, A., Lo Russo, G., Scialfa, G., y Spreafico, R. (2003). «Focal cortical dysplasias: MR imaging, histopathologic, and clinical correlations in surgically treated patients with epilepsy». *AJNR Am J Neuroradiol.* 24(4):724-733.
- Consalvo, D. E., Kauffman, M. A., Oddo, S. A., Rey, R. C., Kochen, S. S. (2012). «Alteraciones extrahipocámpicas en epilepsia temporal mesial con esclerosis del hipocampo». *Neurología Argentina.* 4(2):53-58.
- Cormack, F., Gadian, D. G., Vargha K. F., Cross, J. H., Connelly, A., y Baldeweg, T. (2005). «Extra-hippocampal grey matter density abnormalities in paediatric mesial temporal sclerosis» *Neuroimage.* 27(3):635-643.
- Croll, S. D., Suri, C., Compton, D. L., Simmons, M. V., Yancopoulos, G. D., Lindsay, R. M., Wiegand, S. J. (1999). «Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex». *Neuroscience.* 93(4):1491-1506.
- D'Addario, C., Dell'Osso, B., Galimberti, D., Palazzo, M. C., Benatti, B., Di Francesco, A., Scarpini, E. (2013). «Epigenetic modulation of BDNF gene in patients with major depressive disorder». *Biol. Psychiatry.* 73(2):e6–e7.
- Dias, B. G., Banerjee, S. B., Duman, R. S., y Vaidya, V. A. (2003). «Differential regulation of Brian Neurotrophic Factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain». *Neuropharmacology.* 45(4):553-563.
- Diehl B, LaPresto E, Najm I, Raja S, Rona S, Babb T, Ying Z, Bingaman W, Lüders HO, Ruggieri P. (2003). «Neocortical temporal FDG-PET hypometabolism correlates with temporal lobe atrophy in hippocampal sclerosis associated with microscopic cortical dysplasia». *Epilepsia.* 44(4):559-564.

- Dugich-Djordjevic, M. M., Tocco, G., Lapchak, P. A., Pasinetti, G. M., Najm, I., Baudry, M., y Hefti, F. (1992). «Regionally specific and rapid increases in brain-derived neurotrophic factor messenger RNA in the adult rat brain following seizures induced by systemic administration of kainic acid». *Neuroscience*. 47(2):303-315.
- Dwivedi, Y. (2014). «Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Late-Life Depression». *Am J Geriatr Psychiatry*. 21(5):433-449.
- Eftekhari, S., Hehrabi, S., Soleimani, M., Gholamreza, H., Shahrokhi, A., Mostafavi, H., Hayat, P. (2014). «BDNF modifies hippocampal KCC2 and NKCC1 expression in a temporal lobe epilepsy model». *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 74(3):276-287.
- Emery, J. A., Roper, S. N., y Rojiani, A. M. (1997). «White matter neuronal heterotopia in temporal lobe epilepsy: a morphometric and immunohistochemical study». *J Neuropathol Exp Neurol*. 56(12):1276-1282.
- Engel, J. Jr. e International League Against Epilepsy (ILAE). (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(6):796-803.
- Engel, J. Jr., Wiebe, S., French, J., Sperling, M., Williamson, P., Spencer, D., Gumnit, R. (2003). «Practice parameter: temporal lobe and localized neocortical resections for epilepsy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, in association with the American Epilepsy Society and the American Association of Neurological Surgeons». *Neurology*. 25(60):538–547.
- Ernfors, R., Bengzon, J., Kokaia, Z., Persson, H., y Lindvall, O. (1991). «Increased levels of messengers RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis». *Neuron*. 7(1):165-176.
- Fauser, S., Schulze-Bonhage, A., Honegger, J., Carmona, H., Huppertz HJ, Pantazis, G., Rona, S. (2004). «Focal cortical dysplasias: surgical outcome in 67 patients in relation to histological subtypes and dual pathology». *Brain*. 127(11):2406-2418.
- Fauser, S., y Schulze-Bonhage, A. (2006). «Epileptogenicity of cortical dysplasia in temporal lobe dual pathology: an electrophysiological study with invasive recordings». *Brain*. 129(1):82-95.

- Fernández, P. M., y Micheli, F. (2010). «Neurología». Editorial Panamericana. 2da edición-Buenos Aires.
- First, M. B., Spitzer, R. L., Gibbon, M., y Williams, J. B. W. (2002). «Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Research Version, Patient Edition». (SCID-I/P) New York:Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute.
- Fukuchi, M., Nii, T., Ishimaru, N., Minamino, A., Hara, D., Takasaki, I., Tabuchi, A. (2009). «Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions». *Neurosci Res.* 65(1):35-43.
- Gall, C. M. (1993). «Seizure-induced changes in neurotrophin expression: implications for epilepsy». *Exp.Neurol.* 124(1):150-166.
- Gálvez, M., Rojas, G. C., Cordovez, J. M., Ladrón de Guevara, D., Campos, M. P., e Isabel-López, I. S. (2009). «Displasias corticales como causa de epilepsia y sus representaciones en las imágenes». *Rev Chil Radiol.* 15(1):25-38.
- García-García, M. E., García, I. M., y Matías, J. G. (2010). «Modelos experimentales en Epilepsia». *Neurología.* 25(3):181-188.
- Gómez-Arias, J. M., Naranjo-Guzmán, L. Y., y Olarte-Briñez, E. J. (2011). «Identificación de los niveles de ansiedad y depresión en pacientes con insuficiencia renal crónica de una unidad de hemodiálisis de la ciudad de Armenia – Quindío». *Poiésis.* 21():1-11.
- González de la Aleja Tejera, J., Sepúlveda-Sánchez, J. M., Simón de las Heras, R., Muñoz-González, R. A., Saiz-Díaz, R. A., Peña-Marín, M. R., Camacho-Salas, A. (2008). «Epilepsia del lóbulo temporal. Clasificación etiológica en 61 pacientes en edad pediátrica». *An Pediatr.* 69(3):227-231.
- Gottmann, K., Mittmann, T., y Lessmann, V. (2009). «BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses». *Exp. Brain Res.* 199(3-4):203-234.
- Gumuslu, E., Mutlu, O., Sunnecti, D., Ulak, G., Celikyurt I. K., Cine, N., y Akar, F. (2013). « The Effects of Tianeptine, Olanzapine and Fluoxetine on the Cognitive

- Behaviors of Unpredictable Chronic Mild Stress-exposed Mice». *Drug Res (Stuttg)*. 63(10):532-539.
- Hardiman, O., Burke, T., Phillips, J., Murphy, S., O'Moore, B., Staunton, H., y Farrell, M. A. (1988). «Microdysgenesis in resected temporal neocortex: incidence and clinical significance in focal epilepsy». *Neurology*. 38(7):1041-1047.
- Harvey, A. S., Berkovic, S. F., Wrennall, J. A., y Hopkins, I. J. (1997). «Temporal lobe epilepsy in childhood: Clinical, EEG, and neuroimaging findings and syndrome classification in a cohort with new-onset seizures». *Neurology*. 49(4):960-968.
- Hauptman, J. S., y Mathern, G. W. (2012). «Surgical treatment of epilepsy associated with cortical displasia». *Epilepsia*. 53(S4):98-104.
- He, X. P., Kotloski, R., Nef, S., Luikart, B. W., Parada, L. F., y McNamara, J. O. (2004). «Conditional deletion of *trkB* but not BDNF prevents epileptogenesis in the kindling model». *Neuron*. 43(1):31-42.
- Herrero, M. J., Blanch, J., Peri, J. M., De Pablo, L., Pintor, A., y Bulbena, A. (2003). «A validation study of the Hospital anxiety and depression scale (HADS) in a Spanish population». *Gen Hosp Psychiatry*. 25(4):277-283.
- Hofer, M., Pagliusi, S. R., Hohn, A., Leibrock, J., y Barde, Y. (1990). «Regional distribution of brain-derived Neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain». *EMBO J*. 9(8):2459–2464.
- Hou, X., Wang, X., y Zhang, L. (2010). «Conditional downregulation of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B blocks epileptogenesis in the human temporal lobe epilepsy hippocampus». *Neurol India*. 58(1):29-34.
- Jutila, L., Ylinen, A., Partanen, K., Alafuzoff, I., Mervaala, E., Partanen, J., Vapalahti, M. (2001). «MR volumetry of the entorhinal, perirhinal, and temporopolar cortices in drug-refractory temporal lobe epilepsy». *AJNR Am J Neuroradiol*. 22(8):1490-501.
- Kandratavicius, L., Monteiro, M. R., Assirati, J. A. Jr., Carlotti, C. G. Jr., Hallak, J. E., y Leite, J. P. (2013). «Neurotrophins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities». *J Neuropathol Exp Neurol*. 72(11):1029-1042.
- Kim, J. Y., Roh, J. K., Lee, S. K., y Chung, C. K. (2002). «Neurotrophin receptor immunoreactivity in severe cerebral cortical dysplasia». *Epilepsia*. 43(5):220-226.

- Kokaia, M., Ernfors, P., Kokaia, Z., Elmer, E., Jaenisch, R., y Lindvall, O. (1995). «Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice». *Exp. Neurol.* 133(2):215-224.
- Kokaia, Z., Kelly, M. E., Elmer, E., Kokaia, M., McIntyre, D. C., y Lindvall, O. (1996). «Seizure-induced differential expression of messenger RNAs for neurotrophins and their receptors in genetically fast and slow kindling rats». *Neuroscience.* 75(1):197-207.
- Kornblum, H. I., Sankar, R., Shin, D. H., Wasterlain, C. G., y Gall, C. M. (1997). «Induction of brain derived neurotrophic factor mRNA by seizures in neonatal and juvenile rat brain». *Brain Res Mol Brain Res.* 44(2):219-228.
- Koyama, R., y Ikegaya, Y. (2005). «To BDNF or Not to BDNF: That Is the Epileptic Hippocampus». *Neuroscientist.* 11(4):282-287.
- Lähteinen, S., Pitkänen, A., Saarelainen, T., Nissinen, J., Koponen, E., y Castren, E. (2002). «Decreased BDNF signalling in transgenic mice reduces epileptogenesis». *Eur. J. Neurosci.* 15(4):721-734.
- Lähteinen, S. (2004). «Brain-derived neurotrophic factor in the development of epilepsy». Doctorado. University of Kuopio.
- Lerner, J. T., Salamon, N., Hauptman, J. S., Velasco, T. R., Hemb, M., Wu, J. Y., Sankar, R. (2009). «Assessment and surgical outcomes for mild type I and severe type II cortical dysplasia: a critical review and the UCLA experience». *Epilepsia.* 50(6):1310-1335.
- López, J. I., y Pomposo-Gaztelu, I. (2010). «Patología quirúrgica de la epilepsia». *Rev Neurol.* 50():616-622.
- López-Hernández, E., y Solís, H. (2012). «Epilepsia del lóbulo temporal y las neuronas hipocámpales de las áreas CA1 y CA3». *Rev de la Fac de Med UNAM.* 55(5):16-25.
- Lorigados-Pedre, L., Orozco-Suárez, S., Morales-Chacón, L., García-Maeso, I., Estupiñan-Díaz, B., Bender del Busto, J. E., Pavón-Fuentes, N. (2008). «Neuronal death in the neocortex of drug resistant temporal lobe epilepsy patients». *Neurología.* 23(9):555-565.

- Maiti, R., Mishra, B. R., Jowhar, J., Mohapatra, D., Parida, S., Bisoi, D. (2016) «Effect of oxcarbazepine on serum brain derived neurotrophic factor in bipolar mania: An exploratory study». *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*.
- McNamara, J. O., y Scharfman, H. E. (2012). «Temporal Lobe Epilepsy and the BDNF Receptor, TrkB». In: *Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. SourceJasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.*
- Maisonpierre, P. C., Le Beau, M. M., Espinosa, R., Ip, N. Y., Belluscio, L., de la Monte, S. M., Squinto, S. (1991). «Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations». *Genomics*. 10(3):558-568.
- Marmigère, F., Rage, F., y Tapia-Arancibia, L. (2001). «Regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts by neuronal activation in rat hypothalamic neurons». *J Neurosci Res*. 66(3):377-389.
- Martínez-Levy, G. A., y Cruz-Fuentes, C. S. (2014). «Genetic and Epigenetic Regulation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Central Nervous System». *Yale J Biol Med*. 87(2):173–186.
- Martínez-Levy, G. A., Rocha, L., Lubin, F. D., Alonso-Vanegas, M. A., Nani, A., Buentello-García, R. M., Pérez-Molina, R. (2016). «Increased expression of BDNF transcript with exon VI in hippocampi of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy». *Neuroscience*. 314():12-21.
- Mathern, G. W., Babb, T. L., Micevych, P. E., Blanco, C. E., y Pretorius, J. K. (1997). «Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neurons losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus». *Mol Chem Neuropathol*. 30(1-2):53-76.
- Matrisciano, F., Bonaccorso, S., Ricciardi, A., Scaccianoce, S., Panaccione, I., Wang, L., Ruberto, A. (2009). «Changes in BDNF serum levels in patients with major depression disorder (MDD) after 6 months treatment with sertraline, escitalopram, or venlafaxine». *J Psychiatr Res*. 43(3):247-254.

- Moran, N. F., Lemieux, L., Kitchen, N. D., Fish, D. R., y Shorvon, S. D. (2001). «Extrahippocampal temporal lobe atrophy in temporal lobe epilepsy and mesial temporal sclerosis». *Brain*. 124(1):167-175.
- Murray, K. D., Isackson, P. J., Eskin, T. A., King, M. A., Montesinos, S. P., Abraham, L. A., y Roper, S. N. (2000). «Altered mRNA expression for brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in the hippocampus of patients with intractable temporal lobe temporal». *J. Comp. Neurol.* 418(4):411-422.
- Nagata, T., Tanaka, F., Yonekura, Y., Ikeda, A., Nishizawa, S., Ishizu, K., Okazawa, H. (1995). «Limited value of interictal brain perfusion SPECT for detection of epileptic foci: high resolution SPECT studies in comparison with FDG-PET». *Ann Nucl Med.* 9(2):59-63.
- Nibuya, M., Nestler, E. J., y Duman, R. S. (1996). «Chronic antidepressant administration increases the expression of camp response element binding protein (CREB) in rat hippocampus». *J Neurosci.* 16(7):2365-2372.
- Ozcelik, T., Rosenthal, A., y Francke, U. (1991). «Chromosomal mapping of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 genes in man and mouse». *Genomics.* 10(3):569–575.
- Palmini, A., Najm, I., Avanzini, G., Babb, T., Guerrini, R., Foldvary-Schaefer, N., Jackson, G. (2004). «Terminology and classification of the cortical dysplasias». *Neurology.* 62(6 Suppl 3):S2-8.
- Palmini, A., y Holthausen, H. (2013). «Focal malformations of cortical development: a most relevant etiology of epilepsy in children». *Handb Clin Neurol.* 111():549-653.
- Paradiso, B., Marconi, P., Zucchini, S., Berto, E., Binaschi, A., Bozac, A., Buzzi, A. (2009). «Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model». *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(17):7191-7196.
- Park, S. W., Lee, J. G., Seo, M. K., Cho, H. Y., Lee, C. H., Lee, J. H., Lee, B. J. (2014). «Effects of mood-stabilizing drugs on dendritic outgrowth and synaptic protein levels in primary hippocampal neurons». *Bipolar Disord.* 17(3):278-290.

- Pascual-Castroviejo, I., Hernández-Moneo, J. L., Gutiérrez-Molina, M. L., Viaño, J., Pascual-Pascual, S. I., Velazquez-Fragua, R., Morales, C. (2012). «Displasia cortical focal. Correlaciones clínico-radiológicas-patológicas». *Neurología*. 27(8):472-480.
- Pastor, J., Uzcátegui, Y. G., Gal-Iglesias, B., Ortega, G. J., Sola, R. G., y Menéndez de la Prida, L. (2006). «Bases fisiopatológicas de la epilepsia del lóbulo temporal: estudios en humanos y animales». *REV NEUROL*. 42(11):663-673.
- Pattabiraman, P. P., Tropea, D., Chiaruttini, C., Tongiorgi, E., Cattaneo, A., y Domenici, L. (2005). «Neuronal activity regulates the developmental expression and subcellular localization of cortical BDNF mRNA isoforms in vivo». *Mol Cell Neurosci*. 28(3):556-570.
- Pruunsild, P., Kazantseva, A., Aid, T., Palm, K., y Timmusk, T. (2007). «Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing and multiple promoters». *Genomics*. 90(3):397-406.
- Racine, R. J. (1972). «Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure». *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 32(3):281-294.
- Raybaud, C. A., Guye, M. y Le Fur, Y. (2001). «1HMRSI and depth electrodes recording correlates in temporal lobe epilepsy». 39th Annual meeting of the American Society of *Neuroradiology*.
- Reibel, S., Larmet, Y., Le, B. T., Carnahan, J., Marescaux, C., y Depaulis, A. (2000). «Brain-derived neurotrophic factor delays hippocampal kindling in the rat». *Neuroscience*. 100(4):777-788.
- Rudge, J. S., Mather, P. E., Pasnikowski, E. M., Cai, N., Cocoran, T., Acheson, A., Anderson, K. (1998). «Endogenous BDNF protein is increased in adult rat hippocampus after a kainic acid induced excitotoxic insult but exogenous BDNF is not neuroprotective». *Exp Neurol*. 149(2):398-410.
- Saarelainen, T., Vaittinen, S., y Castrén, E. (2001). «trkB-receptor activation contributes to the kainate-induced increase in BDNF mRNA synthesis». *Cell Mol Neurobiol*. 21(4):429-435.
- Salanova, V., Markand, O., y Worth, R. (2004). «Temporal lobe epilepsy: analysis of patients with dual pathology». *Acta Neurol Scand*. 109(2):126-131.

- Salas-Puig, J., y Gil-Nagel, A. (2004). «La clasificación de las crisis y síndromes epilépticos: nuevas propuestas». *Neurologí.* 19(2):59-66.
- San-Juan, D., Calcaneo, J de D., Gonzalez-Aragon, M. F., Bermudez-Maldonado, L., Avellan, A. M., Argumosa E. V. (2011). «Transcranial direct current stimulation in adolescent and adult Rasmussen's encephalitis». *Epilepsy Behav.* 20(1):126-131.
- Sánchez, J., Centanaro, M., Solís, J., y Valle, C. (2009). «Estudio de 20 pacientes con epilepsia del lóbulo temporal medial con esclerosis del hipocampo». *Revista Ecuatoriana de Neurología.* 18(1-2):
- Sato, K., Kashihara, K., Morimoto, K., y Hayabara, T. (1996). «Regional increases in brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNAs during amygdaloid kindling, but not in acidic and basist growth factor mRNAs». *Epilepsia.* 37(1):6-14.
- Scharfman, H. E., Goodman, J. H., y Sollas, A. L. (1999). «Actions of brain-derived neurotrophic factor in slices from rats with spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the dentate gyrus». *J Neurosci.* 19(13):5619-5631.
- Scharfman, H. E., Goodman, J. H., Sollas, A. L., y Croll, S. D. (2002). «Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor». *Exp Neurol.* 174(2):201-214.
- Sen, S., Duman, R., y Sanacora, G. (2008). «Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications». *Biol Psychiatry.* 64(6):527-532.
- Shi, X. I., Wang, J. W., Cui, H., Li, B. M., Lei, G. F., y Sun, R. P. (2010). «Effects of antiepileptic drugs on mRNA levels of BDNF and NT-3 and cell neogenesis in the developing rat brain». *Brain Dev.* 32(3):229-235.
- Simonato, M., Tongiorgi, E., y Kokaia, M. (2006). «Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy». *Trends Pharmacol Sci.* 27(12):631-638.
- Simonato, M., y Zucchini, S. (2010). «Are the neurotrophic factors a suitable therapeutic target for the prevention of epileptogenesis?» *Epilepsia.* 51(3):48-51.
- Sinclair, D. B., Wheatley, M., Aronyk, K., Hao, C., Snyder, T., Colmers, W., y McKean, J. D. (2001). « Pathology and neuroimaging in pediatric temporal lobectomy for intractable epilepsy». *Pediatr Neurosurg.* 35(5):239-246

- Takahashi, M., Hayashi, S., Kakita, A., Wakabayashi, K., Fukuda, M., Kameyama, S., Tanaka, R. (1999). «Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y». *Brain Res.* 818(2):579-582.
- Tassi, L., Colombo, N., Garbelli, R., Francione, S., Lo Russo, G., Mai, R., Cardinale, F. (2002). «Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome». *Brain.* 125(8):1719-1732.
- Taylor, D. C., Falconer, M. A., Bruton, C. J., y Corsellis, J. A. (1971). «Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy». *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 34(4):369–387.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., y Persson, H. (1993). «Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene». *Neuron.* 10(3):475-489.
- Tolwani, R. J., Buckmaster, P. S., Varma, S., Cosgaya, J. M., Wu, Y., Suri, C., y Shooter, E. M. (2002). «BDNF overexpression increases dendrite complexity in hippocampal dentate gyrus». *Neuroscience.* 114(3):795-805.
- Tongiorgi, E., Domenici, L., y Simonato, M. (2006). «What is the biological significance of BDNF mRNA targeting in the dendrites? Clues from epilepsy and cortical development». *Mol Neurobiol.* 33(1):17-32.
- Uscátegui, A. M., e Izquierdo, A. (2003). «Esclerosis mesial temporal». *Acta Neurol Colomb.* 19(4):203-208.
- Varela, R. B., Valvassori, S. S., Lopes-Borges, J., Mariot, E., Dal-Pont, G. C., Amboni, R. T., Bianchini, G. (2015). «Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats». *J Psychiatr Res.* 61():114-121.
- Vázquez, C. (2008). «Esclerosis temporal mesial: Paradigma de la epilepsia de resolución quirúrgica». *Rev. argent. Neurocir.* 22(2):1-10.
- Vedunova, M. V., Mishchenko, T. A., Mitroshina, E. V., y Mukhina, I. V. (2015). «TrkB-Mediated Neuroprotective and Antihypoxic Properties of Brain-Derived Neurotrophic Factor». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2015():1-9.

- Volcy-Gómez, M. (2004). «Epilepsia del lóbulo temporal mesial: fisiopatología, características clínicas, tratamiento y pronóstico». *REV NEUROL*. 38(7):663-667.
- Waterhouse, E. G., An, J. J., Orefice, L. L., Baydyuk, M., Liao, G. Y., Zheng, K., Lu, B. (2012). «BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission». *J Neurosci*. 32(41):14318-14330.
- Webster, M. J., Shannon, W. C., Herman, M. M., y Kleinman, J. E. (2002). «BDNF mRNA expression during postnatal development, maturation and aging of the human prefrontal cortex». *Developmental Brain Research*. 139(2):139-150.
- Wiebe, S., Blume, W. T., Girvin, J. P., y Eliasziw, M. (2001). «A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy». *N Engl J Med*. 345(5):311-318.
- Xu, B., Michalski, B., Racine, R. J., y Fahnstock, M. (2004). «The effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration on kindling induction, Trk expression and seizure-related morphological changes». *Neuroscience*. 126(3):521-531.
- Yasuda, S., Liang, M. H., Marinova, Z., Yahyavi, A., y Chuang, D. M. (2009). «The mood stabilizers lithium and valproate selectively activate the promoter IV of brain-derived neurotrophic factor in neurons». *Mol Psychiatry*. 14(1):51-59.
- Zagrebelsky, M., y Korte, M. (2014). «Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses». *Neuropharmacology*. 76(C):628-638.
- Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S. J., y Luskin, M. B. (1998). «Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb». *Mol Cell Neurosci*. 11(4):234-245.

ANEXO 1. ARTÍCULO PUBLICADO

Increased Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcripts I and VI, cAMP Response Element Binding, and Glucocorticoid Receptor in the Cortex of Patients with Temporal Lobe Epilepsy

G. A. Martínez-Levy¹ · L. Rocha² · F. Rodríguez-Pineda¹ · M. A. Alonso-Vanegas³ · A. Nani¹ · R. M. Buentello-García³ · M. Briones-Velasco¹ · D. San-Juan⁴ · J. Cienfuegos³ · C. S. Cruz-Fuentes¹

Received: 23 February 2017 / Accepted: 3 May 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract A body of evidence supports a relevant role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in temporal lobe epilepsy (TLE). Magnetic resonance data reveal that the cerebral atrophy extends to regions that are functionally and anatomically connected with the hippocampus, especially the temporal cortex. We previously reported an increased expression of BDNF messenger for the exon VI in the hippocampus of temporal lobe epilepsy patients compared to an autopsy control group. Altered levels of this particular transcript were also associated with pre-surgical use of certain psychotropic. We extended here our analysis of transcripts I, II, IV, and VI to the temporal cortex since this cerebral region holds intrinsic communication with the hippocampus and is structurally affected in patients with TLE. We also assayed the cyclic adenosine monophosphate response element-binding (CREB) and glucocorticoid receptor (GR) genes as there is experimental evidence of changes in their expression associated with BDNF and epilepsy. TLE and pre-surgical pharmacological treatment were considered as the primary clinical independent variables.

Transcripts BDNF I and BDNF VI increased in the temporal cortex of patients with pharmacoresistant TLE. The expression of CREB and GR expression follow the same direction. Pre-surgical use of selective serotonin reuptake inhibitors, carbamazepine (CBZ) and valproate (VPA), was associated with the differential expression of specific BDNF transcripts and CREB and GR genes. These changes could have functional implication in the plasticity mechanisms related to temporal lobe epilepsy.

Keywords Pharmacoresistant epilepsy · Temporal cortex · BDNF · CREB · GR

Introduction

Epilepsy affects 1% of the worldwide population. Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most prevalent clinical presentation [1, 2]. Since many TLE cases are refractory to pharmacological treatment, surgery is frequently indicated [3].

Electroencephalogram (EEG), positron emission tomography (PET), and magnetic resonance imaging (MRI) studies show that rather than a circumscribed temporal lobe structure, a broader neuronal network is affected in TLE [4]. In particular, MRI data reveal that the cerebral atrophy extends to regions that are functionally and anatomically connected with the hippocampus, particularly the temporal cortex and limbic regions [5–8]. It has been speculated that the onset and progression of atrophy can be associated with loss of hippocampal efferent fibers, decreasing connectivity between these brain regions [9].

Diverse experimental models support a relevant role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in epilepsy. Both

✉ C. S. Cruz-Fuentes
cruz@imp.edu.mx

¹ Department of Genetics, National Institute of Psychiatry “Ramón de la Fuente Muñiz” (INPRFM), Mexico City, Mexico

² Department of Pharmacobiology, Center for Research and Advanced Studies, CINVESTAV, Mexico City, Mexico

³ Neurosurgery Section, National Institute of Neurology and Neurosurgery “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS), Mexico City, Mexico

⁴ Clinical Research Department, National Institute of Neurology and Neurosurgery “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS), Mexico City, Mexico

pro-epileptogenic [10–12] and antiepileptogenic data have been reported [13–15]. Moreover, studies show increased levels of BDNF in the hippocampus [16] and cerebral cortex of patients with TLE [17]. Also, high levels of messenger RNA (mRNA) are present in the hippocampus of affected individuals [18].

It has also been reported that expression of BDNF is affected by hippocampal sclerosis (HS) [19, 20], by duration and severity of seizures [21], by fluoxetine treatment in patients with comorbid depression [22], and by antiepileptic drugs [16]. Therefore, these variables warrant further consideration when the expression of this neurotrophin is being assessed.

However, BDNF gene expression is not limited to a single transcript [23]; so, the different mRNAs identified could have differential impact on the epileptogenic process [24]. Recently, we detected an increased expression of BDNF VI in the hippocampus of patients with TLE, particularly related with the use of sertraline in patients with psychiatric comorbidity [25].

It worth noting that BDNF and other molecules like cAMP response element-binding protein (CREB) and glucocorticoid receptor (GR) have converging and homeostatic effects in the nervous system [26–28]. It is suggested that the disruption of their interplay may lead to diverse neurological disorders including TLE [29].

In the first instance, several CREB binding sites have been identified in promoters 1, 2, 4, and 6 of the BDNF rat gene [30]. In this regard, Ser133-phosphorylated CREB protein acts as a transcription factor promoting the expression of various genes (including BDNF) and regulates processes such as differentiation, survival, and neuronal plasticity that appear to be involved in the development of seizures [31]. Moreover, it has been recently shown that suppressed binding of the phosphorylated CREB protein to BDNF promoters 2, 4, and 6 in the ventral tegmental area resulted in a decreased expression of their corresponding transcripts [30].

Concerning epilepsy, studies in transgenic animal models have reported that inactivation of CREB suppresses or decreases the development of seizures [32]. Additionally, increased levels of the phosphorylated and non-phosphorylated CREB have been reported in brain tissue of TLE patients [33, 34]. We, therefore, hypothesized to observe parallel changes in the expression of both BDNF and CREB genes in the affected samples.

On the other hand, BDNF-dependent phosphorylation of GR modulates downstream transcriptional mechanisms, indicating a converging effect of these molecules [29]. In genetically modified mice underexpressing GR, the hippocampal BDNF protein content is downregulated [35]; on the contrary, mice over-expressing GR show increased BDNF levels in hippocampus, amygdala, and piriform cortex [36]. This interesting but still unclear relation between BDNF and GR could be linked to the

recent finding of a specific GR-binding DNA region upstream to BDNF exon IV [37].

Even though the relationship between GR gene and epilepsy has not been extensively explored, it has been reported increased cortisol levels in patients with TLE compared to healthy subjects [38]. Additionally, induced stress exacerbates seizures [39, 40]. Ultimately, since we had previously reported that the pre-surgical use of antidepressants was associated with the specific elevation of BDNF VI transcript in the hippocampus of TLE patients [25] and that certain antidepressant drugs increase the glucocorticoid receptor gene expression (reviewed in [41, 42]), we raised the question about a similar effect for GR in our cortical preparation.

In synthesis, we hypothesized that the samples of temporal cortex of TLE patients would show an increment in the expression levels of the different transcripts analyzed (i.e., BDNF mRNAs I, II, IV, and VI as well as CREB and GR) in comparison to control brain autopsies. Moreover, based on our previous report, we expect that this effect is going to be associated with specific pharmacological treatments.

Experimental Procedures

Subjects

All experiments were approved by the Ethics Committee of the National Institute of Neurology and Neurosurgery “Manuel Velasco Suarez” (INNNMVS) in Mexico City (project 70/12). Participants signed an informed consent. Patients ($n = 19$) met diagnostic criteria for TLE and were refractory to pharmacological treatment. They underwent a detailed medical history, video EEG recordings, and MRI studies. The presence of hippocampus atrophy and a hyper-intense signal on T2-weighted MRI (General Electric 3T unit) defined HS.

The presence of depression and anxiety disorders was assessed employing the Hospital and Anxiety Depression Scale (HADS; Spanish version) [43, 44]. Diagnoses were confirmed by applying the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) [45] by a psychiatrist who was blind to the epilepsy diagnosis.

Relevant clinical data evaluated included the following: age at the moment of surgery, gender, date of epilepsy onset, illness duration, date of surgery, precipitating factors of epilepsy, other diseases/diagnoses, treatments associated with epilepsy or with other comorbidities, and surgical outcome. Table 1 shows clinical data and side of resection for each patient.

Surgeries were performed between February 2012 and June 2013. The surgery procedure in patients with HS was carried out using the T2 or T3 trans-temporal approach guided by electrocorticographic (ECoG) (4 × 8 electrode-gird, Ad-

Table 1 Demographic and clinical data of TLE patients and autopsies

Sample	Gender	Years old	Lesions verified by MRI	Precipitation factors	Seizure onset age (years)	Epilepsy duration (years)	Laterality of resection	Antiepileptic drugs	Other drugs	Engel
275	Female	23	HS	FH	13	10	Left	CBZ, LVT	–	3
276	Male	54	HS	FH, CET	13	41	Right	CBZ, LMG	–	1
282	Male	37	HS/FCD	HYPOXIA	9	28	Right	VPA, CBZ	SRT	1
283	Male	30	HS	–	14	16	Left	VPA, CBZ	–	1
286	Female	33	HS/FCD	FH	12	21	Right	VPA, PHB	–	1
289	Male	37	HS	CET, FS	5	32	Right	CBZ	–	1
290	Female	24	HS	CET	1	23	Right	VPA, CBZ	–	1
291	Male	34	FCD	–	30	4	Left	CBZ	SRT	1
292	Female	44	HS	–	4	40	Left	CBZ, LMG	–	1
293	Male	23	HS	CET	10	13	Right	PHE, VPA	–	1
295	Male	43	HS	–	27	16	Right	VPA, PMD	–	1
296	Female	38	HS	–	30	8	Left	VPA	–	1
301	Male	56	HS	–	11	45	Right	PHE	–	1
305	Female	21	HS	FH	14	7	Left	PHE	–	1
309	Male	49	CYS	–	14	35	Left	CBZ, LC	SRT	1
355	Male	60	HS	CET	8	52	Left	VPA, CBZ, CNZ	RSP, BP	1
359	Female	33	HS	FS	27	6	Left	PHE, CBZ, TPM	–	1
362	Female	31	HS	FH	15	16	Left	CNZ, CBZ	CTP	NA
392	Male	41	HS	FS, FH	2	39	Left	PHE, CBZ, LMG	SRT	1
Sample	Gender	Age	Laterality of resection		Postmortem interval (h)			Cause of death		
C1	Male	33	Right		8–10			Fire arm missile		
C2	Male	37	Left		2–5			Fire arm missile		
C3	Male	30	Left		10–12			Fire arm missile		
C4	Male	73	Left		10–12			Pneumonia		
C5	Male	36	Left		10–12			Fire arm missile		
C6	Female	22	Left		12–14			Suffocation		
C7	Female	18	Left		16–18			Suffocation		
C8	Male	45	Left		16–18			Suffocation		

HS hippocampal sclerosis, FCD focal cortical dysplasia, Cys cysticercosis, FH family history, CET cranioccephalic trauma, FS febrile seizures, CBZ carbamazepine, LVT levetiracetam, LMG lamotrigine, VPA valproic acid, PHE phenytoin sodium, PMD pyrimidone, LC lacosamide, CNZ clonazepam, TPM topiramate, SRT sertraline, RSP risperidone, BP biperiden, CTP citalopram, Engel 1 free of disabling seizure, 3 worthwhile improvement, NA not available

Tech, Racine, WI). The procedure consisted of unilateral amygdalo-hippocampectomy, which includes microsurgical excision of the head of the anterior body of the hippocampus, amygdala, portions of the uncus, and the parahippocampal gyrus, followed by tailored resection of the temporal neocortex [46].

After resection, all TLE samples were stored in an ice-cooled Ringer solution (pH 7) containing diethylpyrocarbonate (DEPC), and transported within a maximum of 2 h to the laboratory, where RNA extraction was performed.

The temporal cortex of eight individuals (frozen immediately after autopsy at -70°C), with cause of death unrelated to neurological or psychiatric disorders, was used as a control sample (Table 1).

Demographic Data of the Sample

The autopsy group included six males and two females (mean age at time of death 37 ± 17 years old), with a postmortem interval <18 h. The left temporal cortex was analyzed in all but one of the samples.

Patients with TLE were 11 males and eight females with a mean age of 37 ± 12 years old. The male/female ratio and mean age were not statistically different between comparison groups.

The main clinical features were as follows: age at seizure onset, 14 ± 9 years old, and years with epilepsy, 24 ± 13 . The antiepileptic drugs most commonly used were as follows: carbamazepine (63.2%), valproate (42.1%), phenytoin (26.3%), and lamotrigine (25.8%). Use of valproate was suspended 2 weeks before surgery to prevent risk of perioperative bleeding.

From five cases that received pharmacological adjuvant treatment for ameliorating anxiety and depression symptoms, four used sertraline and one citalopram.

The postoperative outcome evaluated 1 year after surgery indicated that in most cases (17/19) seizure freedom (Engel class 1) was achieved; a worthwhile improvement (Engel class 3) was displayed in a single case, and no information was available in another patient.

Extraction of Nucleic Acids

Temporal cortex pieces (100 mg) were homogenized in 1 ml of guanidine isothiocyanate solution, and RNA extraction was developed as described in Chomczynski and Sacchi [47].

In order to assure appropriate comparisons between-groups, all RNA samples were checked for parameters of quantity and purity with a Nano Drop spectrophotometer; even more, integrity was evaluated with a denaturing agarose gel electrophoresis. No differences were detected in these variables between cortex of cases and autopsies.

Since samples of temporal cortex from patients with TLE and those of autopsies were not obtained under strictly similar conditions, the following assay was performed: 12 rats were euthanized by decapitation and their skulls left at room temperature for different postmortem intervals: 0 h ($N = 4$), 4 h ($N = 2$), 8 h ($N = 2$), 16 h ($N = 2$), and 24 h ($N = 2$). At the end of each period, the cerebrum was removed and the brain cortex dissected. Two samples of the experimental condition 0 h were stored for 2 h on ice in a Ringer solution (pH 7) containing DEPC while the remaining were stored at -70°C for 24 h. Total RNA was then extracted as described above. Even though the amount of RNA recovered was inversely related to the postmortem interval, this variable did not affect the integrity and purity, as well as the expression of the rat BDNF IV. Similarly, we found no significant differences between the samples stored in Ringer/DEPC solution as compared to those from postmortem intervals of 18 h. These results imply that different collecting methods did not exert important effects on the results obtained from the analysis of the human BDNF gene.

Expression Analysis

Reverse transcription reactions were set up using 4 μg of total RNA, and 200 U of the Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; catalog 28025-013). The complementary DNA (cDNA) was stored until further use at -20°C .

We assayed BDNF expression using the following ABI probes: BDNF I (catalog hs00538277-m1), BDNF II (catalog hs00538278-m1), BDNF IV (catalog hs00380947-m1), BDNF VI (catalog hs00156058-m1), GR (Hs00353740_m1), and CREB (Hs01081733_m1).

TATA-binding protein (TBP) (catalog 4333769F) was used as the endogenous control probe.

Each 25 μl PCR reaction contained 100 ng of cDNA, 1.25 μl of probe, and 12.5 μl of Taqman Universal PCR master mix, no-ampersase UNG (catalog 4324018). We included no-template controls in each experiment. Samples were run in duplicate. SDS software (version 2.0; Applied Biosystems) was used for obtaining the Ct values.

All sample showed detectable levels of expression for the different transcripts assayed.

Statistical Analyses

Expression levels are represented in graphs as $2^{-\Delta\text{CT}}$ values. The $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ formula, as described in Schmittgen and Livak [48], was used to calculate the fold of change between experimental groups. The results are presented in the graphs as mean \pm two standard deviations (SD) and were considered significant when $P \leq 0.05$.

We carried out statistical analyses with IBM SPSS Statistic v.20. *T* test for independent samples was used to evaluate differences between cases and autopsies, while the effect of specific clinical variables was evaluated using ANOVA and Dunnett's T3 posthoc test. A non-parametric Mann-Whitney *U* statistic test or the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks was performed when necessary.

Results and Discussion

Changes of BDNF Gene Expression in Relation to TLE

A substantial body of research show that experimental seizure activity is associated with the increased expression of BDNF mRNA levels in areas involved in limbic seizures, primarily in hippocampus [49], and also in other regions vulnerable to TLE, including some cortical areas [50, 51]. Similarly, an increase in BDNF mRNA levels has been described in hippocampal tissue obtained from patients with TLE undergoing surgery [18]. We recently showed that this elevation was particularly associated with the transcript with exon VI BDNF [25]. In this study we extended the analysis to the cortex of these same TLE patients, showing a statistically significant increase of both BDNF transcripts I (fold change 2.4, $H = 4.0$; $P \leq 0.05$) and VI (fold change 1.9, $H = 5.9$; $P \leq 0.05$) as compared to the group of autopsies (Fig. 1a). This result is in agreement with a significant rise of the corresponding BDNF protein (2.6-fold; $P < 0.01$) documented previously in the cortex of epileptic patients [17].

To define the role of these changes observed in the cortical brain epileptic tissue is challenging, as much as the relevant information has come from the study of hippocampus.

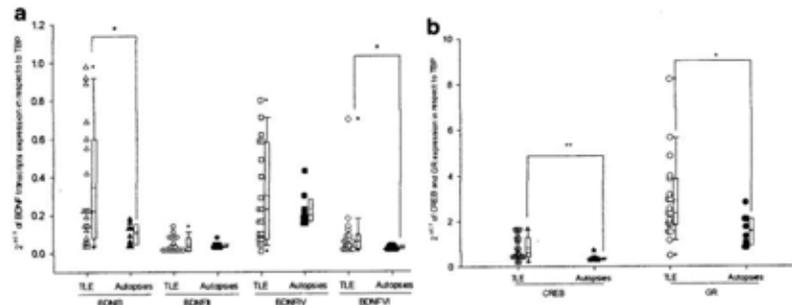


Fig. 1 **a** Expression of four BDNF transcripts in the temporal cortex of TLE patients and autopsies. **b** Expression of CREB and GR in the temporal cortex of TLE patients and autopsies. TLE temporal lobe epilepsy. Each symbol corresponds to one subject. **a** Triangles represent the expression of BDNF I, circles BDNF II, square BDNF IV, and

diamonds BDNF VI. **b** Stars account for the expression of CREB and pentagons of GR. Open symbols represent TLE cases, while black symbols correspond to autopsies. The box plots describe mean and 95% confidence intervals. Statistical significance was determined using an unpaired, two-tailed *t* test; **P* < 0.05, ***P* < 0.01

Nonetheless, remarkable features of the BDNF transcripts here reported deserve our consideration. For example, the depolarization-induced secretion of this neurotrophin is higher in AT120 cells transfected with the BDNF I messenger as compared to cells transfected with the most common isoform (i.e., those translated from the start codon in exon IX) [52]. Interestingly, the transcript with exon I also contains an alternative in-frame ATG codon translational start site, leading to a longer N-termini pre-proBDNF [23]. In PC12 cells and cultured cortical neurons, this feature has been linked to a more efficient synthesis and to an increased steady-state level of their corresponding isoform protein [53].

Moreover, a distinct trafficking and intraneuronal compartmentalization for the diverse transcripts has been recognized [54, 55]: for example, while the BDNF exon I and IV transcripts are mostly directed to the soma and proximal dendrites, those coding from exon II and VI isoforms are preferentially transported in an activity-dependent manner to distal dendrites [54–56]. This differential targeting of the BDNF mRNA splice variants is proposed to represent a “spatial code” mechanism [24, 54] intended to “tune up” the local translation and production of the neurotrophin to distinctive neural compartments (i.e., proximal vs distal dendrites). Importantly, this differential targeting is altered by pilocarpine-induced epileptogenesis [57] and by stimuli like the physical exercise or antidepressants [58]. In any case, the release of the mature protein and the subsequent activation of the TrkB receptor in these local compartments may serve (through various mechanisms like an increased neuronal survival, dendritogenesis or dendrite arborization) to remodel specific synapses. In this regard, for example, Baj et al. [58] put forward a model for the neurotrophic effect of antidepressants in the modeling of the DG-CA3 interaction, where the outcome is explained mostly through the action of the transcript with exon VI. On

the other hand, analyzing of behavioral and cellular responses of mice in which the function from its principal promoters was selectively disrupted, Maynard et al., provide significant evidence showing that absence of BDNF transcripts for exon VI has a negative impact not only on the complexity of apical and basal dendrites of CA1 and CA3 neurons but also on the size of distinct spine populations of apical dendrites of CA1 cells. Interestingly, in these transgenic animals, the effects were associated with a downregulation of various GABAergic interneuron markers [59]. Additionally, compared to wild-type male individuals, the BDNF-exon 1 and -2 mutant animals display a heightened aggressive behavior, in parallel with an increased expression of specific genes associated with serotonin signaling. Additionally, this study also provides evidence of a differential regional specific contribution to the total BDNF levels from the different transcripts [59].

In summary, these data underscore the significant biological role and the putative functional role of the sophisticated genetic transcription mechanism of BDNF. Consequently, and similar to what is proposed for the case of the hippocampus, it is tempting to suggest that the transcript expression changes detected in the damaged cerebral cortex tissue of TLE individuals could be related to the demand of plastic readjustments required to attempt to recover from the structural and functional damage imposed from seizures.

Changes of CREB and GR Gene Expression in Relation to TLE

Samples of TLE patients showed an increased expression of CREB gene (fold change 1.9; *U* = 25.5; *P* ≤ 0.01) as compared to control autopsies (Fig. 1b).

Several promoters of the rat and human BDNF genes, including those associated with the different transcripts assayed

here, contain CREB binding sites [30, 60, 61]. The differential expression of specific BDNF transcripts, through the binding of phosphorylated-CREB to specific promoters, could be linked to a variety of normal and abnormal neural phenotypes. For example, in rat cultured cortical neurons, a rapid reduction of BDNF transcripts I, IV, and VI was observed after incubation with phencyclidine. This non-competitive antagonist for NMDA receptor also reduced the phosphorylated CREB/total CREB ratio, an inhibitory effect also generated through the blocking of the calcium/calmodulin kinase II (CaMKII) [62]. These data support the role of CREB as a key contributor of the regulated expression of specific BDNF transcripts, through the participation of selected neural-activated CREB signaling systems, with potential relevance to several neuropsychiatric disorders, including TLE.

To our knowledge, this is the first description of an increment in CREB mRNA expression associated to pharmaco-resistant TLE. Experimental animal models and human brain tissue analysis support the involvement of CREB playing a relevant role in epilepsy. For example, an increased CREB phosphorylation is observed following seizure activity in both the hippocampus and the cortex of rodents [63]. In the same way, genetic-deficient CREB mice show a 50% reduction in spontaneous seizures following pilocarpine-induced status epilepticus (SE) and require more electrical stimulation to be fully kindled [64]. It has also been reported augmented protein levels of CREB-IR and phosphorylated CREB (pCREB) in the nucleus of hippocampal proliferating reactive astrocytes of patients with mesial temporal lobe epilepsy [33], as well as in neurons of TLE pharmaco-resistant patients [34]. Similarly, an increased pCREB activation is seen in nuclei of neurons located in layers II and IV of pediatric patients with neocortical epilepsy [65]. Interestingly, a genome-wide transcriptome analysis of human epileptic neocortex shows that

those brain regions prone to seizures manifest a persistent mitogen-activated protein kinase (MAPK) gene pathway-dependent transcription and CREB activation [66].

Since this transcription factor binds and regulates human BDNF exons I, IV, and IX expression [60] as well as the transcript VI in the rat gene [30], it is feasible to propose that deregulation of CREB could impinge in TLE and BDNF transcript expression.

Higher levels of GR gene expression were also seen in the cortex of pharmaco-resistant TLE patients (fold change 1.6; $U = 35.5$; $P \leq 0.05$) (Fig. 1b). The role of GR in epilepsy has been explored only in animal models, and no clear picture has emerged. For instance, Bao et al. [67], reported a decrement of the mRNA GR expression in the hippocampus of basolateral amygdala electrical kindled rats, 24 h after the last stimulation. Also, reduced GR protein levels were detected in the cerebral cortex of juvenile rats subjected to flurothyl-induced neonatal recurrent seizures [20] and GR immunoreactivity decreased in the CA1 region after seizure onset in seizure-sensitive gerbils [68]. On the contrary in amygdala-kindled rats, the levels of GR mRNA in the dentate gyrus was increased 4 h after stimulation, returning to normal levels after 4 days [69], probably emulating the enhanced responsiveness to cortisol after initial seizures. Also, in the semi-chronic model of epilepsy produced by injecting kainic acid bilaterally in the dorsal and ventral hippocampus (an animal model more closely related to TLE), the number of glucocorticoid receptor sites increased in the hippocampus 2 weeks after the lesion [70].

Influence of the Pre-surgery Pharmacological Treatment on the Genetic Expression of BDNF, GR, and CREB

As described in Table 2, different clinical variables did not correlate with the expression of any of the messengers

Table 2 Effect of different clinical variables on the expression of the analyzed genes

Clinical variables	Number	BDNF I	BDNF II	BDNF IV	BDNF VI	CREB	GR
Gender	Females = 8	$U = 39.50$	$U = 36.50$	$t = -0.67$	$U = 43.00$	$U = 35.00$	$U = 35.00$
	Males = 11	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$
Laterality of resection	Left = 11	$U = 41.00$	$U = 42.50$	$U = 38.50$	$U = 41.00$	$U = 41.00$	$U = 38.00$
	Right = 8	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$
Hippocampal sclerosis	Yes = 2	$U = 16.00$	$U = 12.50$	$U = 8.00$	$U = 13.00$	$U = 12.00$	$U = 10.00$
	No = 17	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$
Age at the moment of surgery	19	$\rho = -0.24$	$\rho = 0.08$	$F = 0.95$	$\rho = 0.037$	$\rho = 0.24$	$\rho = 0.10$
		$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$
Seizure onset age	19	$\rho = -0.41$	$\rho = -0.50$	$\rho = -0.36$	$\rho = -0.20$	$F = 5.64$	$\rho = -0.40$
		$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$
Number of seizure in the last month	19	$\rho = -0.36$	$\rho = -0.35$	$\rho = -0.20$	$\rho = -0.05$	$F = 0.09$	$\rho = 0.07$
		$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$	$P \geq 0.05$

U refers to the statistic of Mann-Whitney analysis, t the statistic of t student, F the statistic of linear regression, and ρ the statistic of Spearman's coefficient

analyzed. Nonetheless, compared to control autopsies, the pre-surgical use of certain psychotropic medications was associated with an increased expression of the transcripts mentioned above.

For example, the four patients that used either sertraline or citalopram showed increased levels of BDNF VI, GR, and CREB (Table 3). The expression of the later was also higher in comparison to those subjects that did not receive antidepressant/anxiolytic treatment. We previously report an increment of the BDNF VI messenger in the hippocampus of these same patients, associated with their use of SSRIs. In a similar way, BDNF VI variant increase in the apical dendrites of CA3 neurons in mice exposed to an antidepressive treatment or voluntary exercise [58], a response that seems to be linked to the hippocampal functional restructuration [71].

On the other hand, as we previously described, carbamazepine (CBZ; 68.4%) followed by valproic acid (VPA; 42.1%) were the antiepileptic drugs most commonly used in the clinical sample studied (Table 1). It has been reported that addition of valproic acid or carbamazepine prevents or reverses the decrease of BDNF gene expression or protein levels in a variety of experimental brain insults [72–78]. Moreover, in cultured rat cortical neurons, the BDNF I transcript was up-regulated after VPA administration [79]. Additionally, administration of VPA to pregnant mice (an animal model for autism) transiently increased BDNF exons I, IV, and VI and BDNF protein in the fetal brain of the offspring [80]. These data suggest an excitatory effect of these antiepileptic/mood-stabilizing drugs on BDNF production.

In this sense, in comparison to autopsy controls, we observed increased levels of transcripts BDNF I, BDNF VI, and CREB messenger in those cortex samples obtained from the 13 patients that used CBZ (Table 3). However, aside from a small but statistically significant reduction of BDNF II expression, the eight subjects that used VPA group were not different from autopsies; instead, their levels were patently lower from those that used an antiepileptic drug other than VPA (mostly using CBZ ($n = 9$ of 11)). Interestingly with only one exception (sample 282), the levels of expression of the different transcripts evaluated in the VPA group were similar with those that used CBZ concomitantly and different from those that took other antiepileptic drugs (Fig. 2). The relevance of these data to clinical epilepsy is uncertain; although, it is worth noting that Hou et al. [16] observed that the *in vitro* addition of VPA to human hippocampus slices obtained from pharmacoresistant TLE patients induced a downregulated effect on the protein levels of the IR-brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B.

However, it is worth to note that some of the effects that we previously observed in the hippocampus associated with the pre-surgical use of these prescribed drugs were not

Table 3 Effect of pharmacological treatment on the expression of BDNF, CREB, and GR

Drug	Number	BDNF I	BDNF II	BDNF IV	BDNF VI	CREB	GR
SSRIs	5	$H = 5.9; P \geq 0.05$	$H = 4.4; P \geq 0.05$	$H = 1.1; P \geq 0.05$	$H = 9.4; P \leq 0.01$	$F = 11.3; P \leq 0.001$	$H = 9.0; P \geq 0.05$
Posthoc analysis							
SSRIs vs AUT					4.4-fold change	3.1-fold change	2.3-fold change
SSRIs vs NO SSRIs	13	$H = 6.8; P \leq 0.05$	$H = 3.5; P \geq 0.05$	$H = 0.9; P \geq 0.05$	–	1.9-fold change	–
CBZ					$H = 8.7; P \leq 0.05$	$H = 7.5; P \leq 0.05$	$H = 3.0; P \geq 0.05$
Posthoc analysis							
CBZ vs AUT		3.3-fold change			2.8-fold change	2.1-fold change	
CBZ vs NO CBZ	8	–			–	–	
VPA		$H = 8.7; P \leq 0.05$	$H = 9.8; P \leq 0.01$	$H = 3.7; P \geq 0.05$	$H = 13.3; P \leq 0.01$	$H = 14.8; P \leq 0.01$	$H = 14.0; P \leq 0.01$
Posthoc analysis							
VPA vs AUT		3.6-fold change	0.4-fold change		3.3-fold change	2.7-fold change	2.3-fold change
VPA vs NO VPA		–	0.3-fold change		0.3-fold change	0.4-fold change	0.4-fold change

F indicates statistic of ANOVA analysis while H indicates statistic of Kruskal-Wallis analysis. The fold of change between experimental groups is described only when posthoc analyses show statistical differences

SSRIs selective serotonin reuptake inhibitors, CBZ carbamazepine, VPA valproic acid, AUT autopsies

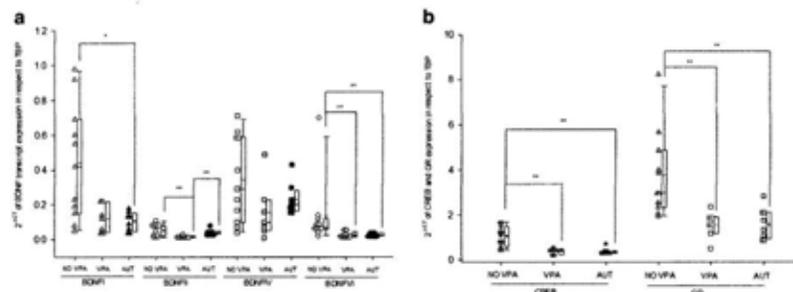


Fig. 2 **a** Effect of the pre-surgical use of valproic acid (VPA) as an antiepileptic drug on the expression of the four BDNF transcripts. **b** Effect of the pre-surgical use of valproic acid (VPA) as an antiepileptic drug on the expression of CREB and GR. *NO VPA* no use of valproic acid, *VPA* use of valproic acid, *AUT* autopsies. Each symbol corresponds to one subject. **a** *Triangles* represent the expression of BDNF I, *circles*

BDNF II, *squares* BDNF IV, and *diamonds* BDNF VI. *Stars* account for the expression of CREB and pentagons of GR. The box plots describe mean and 95% confidence intervals. Statistical significance was determined using a one-way ANOVA followed by T3 Dunnett's multiple comparison tests. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

equivalent in the cortical tissue. This might be due to the more extensive histological deterioration described in the hippocampus of TLE patients [81], as compared to the damage reported in temporal cortex of individuals with same clinical condition [82, 83].

To our knowledge, there are no published reports concerning the use of TLE-related antiepileptic drugs and CREB genetic expression. However, an increased phosphorylation of this transcription factor in response to VPA or CBZ has been detected in different experimental models of neuropsychiatric disorders [84–89].

Finally, data on the effect of antiepileptic drugs on GR are limited and inconclusive. In particular, in vitro studies do not disclose any effect of CBZ on GR mRNA expression nor protein levels [90, 91]. For VPA, both stimulatory as inhibitory effects on transcriptional activation have been described in different experimental cells models [90, 92].

Conclusions

We report here the altered expression of BDNF I and BDNF VI in the temporal cortex of patients with pharmacoresistant TLE. This effect together with our previous report in the hippocampus of these patients might imply an increase in neuronal survival, in dendrites, in arborization, and in the secretion of this neurotrophin. Nonetheless, its impact in epileptic seizures requires further in vitro and chronic animal model studies.

Our results indicate that CREB and GR expression is affected in the same direction as BDNF in the temporal cortex of patients with pharmacoresistant epilepsy. This statement is in agreement with recent evidence suggesting that these molecules have converging effects in the nervous system [26, 27]

and disruption of their homeostasis may be involved in neurological disorders [29] as TLE.

Pre-surgical pharmacological treatment was associated with differential expression of specific BDNF transcripts as well as CREB and GR. The increased expression of these transcripts in TLE patients seems to be associated with the use of ISSRs and CBZ.

Patients using VPA showed a decrement in the expression of these transcripts as compared to those that used an antiepileptic drug other than VPA indicating that VPA could reduce the expression of these mRNA, but the effect is not enough to prevent seizures in these patients.

Because of the limited size of samples evaluated and particularly those related to the analysis of pharmacological treatment, results should be cautiously considered. Reports with increased sample size, devoted to analyzing the effect of these variables in independent samples, are warranted. Moreover, in vitro and animal model studies are necessary to better understand the implications of specific pharmacological treatment in the expression of these genes and how these changes could be related to the epileptic phenotype.

Acknowledgements This article constitutes a partial requisite to obtain the Ph.D. grade in the postgraduate program of Biological Sciences at the National Autonomous University of Mexico (UNAM) for GAM-L. This study was supported the research fund of the National Institute of Psychiatry "Ramón de la Fuente Muñiz" Project IC142040.0. We would like to thank Jose Perez Luna for his technical help.

Compliance with Ethical Standards All experiments were approved by the Ethics Committee of the National Institute of Neurology and Neurosurgery "Manuel Velasco Suárez" (INNNMVS) in Mexico City (project 70/12). Participants signed an informed consent.

References

- Engel J, Williamson PD, Wieser H-G (1997) Chapter 231: mesial temporal lobe epilepsy in epilepsy: a comprehensive text book edited by Engel J., Pedley TA. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 2417–2424
- Goldenberg MM (2010) Overview of drugs used for epilepsy and seizures. *P&T A-peer Rev J Formulary Manag* 35(7):392–415
- Jardim AP, Neves RS, Caboclo LO et al (2012) Temporal lobe epilepsy with mesial temporal sclerosis: hippocampal neuronal loss as a predictor of surgical outcome. *Arq Neuropsiquiatr* 70(5):319–324
- Riederer F, Lanzenberger R, Kaya M et al (2008) Network atrophy in temporal lobe epilepsy: a voxel-based morphometry study. *Neurology* 71(6):419–425
- Bonilha L, Kobayashi E, Rorden C et al (2003) Medial temporal lobe atrophy in patients with refractory temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(12):1627–1630
- Bonilha L, Rorden C, Castellano G et al (2004) Voxel-based morphometry reveals gray matter network atrophy in refractory medial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 61(9):1379–1384
- Mueller SG, Laxer KD, Cashdollar N et al (2006) Voxel-based optimized morphometry (VBM) of gray and white matter in temporal lobe epilepsy (TLE) with and without mesial temporal sclerosis. *Epilepsia* 47(5):900–907
- Bonilha L, Elm JJ, Edwards JC et al (2010) How common is brain atrophy in patients with medial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia* 51(9):1774–1779
- Sutula TP, Hagen J, Pitkanen A (2003) Do epileptic seizures damage the brain? *Curr Opin Neurol* 16(2):189–195
- Croll SD, Suri C, Compton DL et al (1999) Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience* 93(4):1491–1506
- Xu B, Michalski B, Racine RJ et al (2004) The effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration on kindling induction, Trk expression and seizure-related morphological changes. *Neuroscience* 126(3):521–531
- Liu G, Gu B, He XP et al (2013) Transient inhibition of TrkB kinase after status epilepticus prevents development of temporal lobe epilepsy. *Neuron* 79(1):31–38
- Paradiso B, Marconi P, Zucchini S et al (2009) Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(17):7191–7196
- Paradiso B, Zucchini S, Su T et al (2011) Localized overexpression of FGF-2 and BDNF in hippocampus reduces mossy fiber sprouting and spontaneous seizures up to 4 weeks after pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsia* 52(3):572–578
- Simonato M, Tongiorgi E, Kokaia M (2006) Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 27(12):631–638
- Hou X, Wang X, Zhang L (2010) Conditional downregulation of brain derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B blocks epileptogenesis in the human temporal lobe epilepsy hippocampus. *Neurol India* 58(1):29–34
- Takahashi M, Hayashi S, Kakita A et al (1999) Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain Res* 818(2):579–582
- Murray KD, Isackson PJ, Eskin TA et al (2000) Altered mRNA expression for brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in the hippocampus of patients with intractable temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 418(4):411–422
- Mathem GW, Babb TL, Micevych PE et al (1997) Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Mol Chem Neuropathol* 30(1–2):53–76
- Wang L, Zhou C, Zhu Q et al (2010) Up-regulation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 in the brain tissue of human and experimental epilepsy. *Neurochem Int* 57(8):899–905
- Hong Z, Li W, Qu B et al (2014) Serum brain-derived neurotrophic factor levels in epilepsy. *Eur J Neurol* 21(1):57–64
- Kandravicius L, Monteiro MR, Assirati JA Jr et al (2013) Neurotrophins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities. *J Neuropathol Exp Neurol* 72(11):1029–1042
- Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T et al (2007) Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing and multiple promoters. *Genomics* 90(3):397–406
- Tongiorgi E, Domenici L, Simonato M (2006) What is the biological significance of BDNF mRNA targeting in the dendrites? Clues from epilepsy and cortical development. *Mol Neurobiol* 33(1):17–32
- Martinez-Levy GA, Rocha L, Lubin FD et al (2016) Increased expression of BDNF transcript with exon VI in hippocampi of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 314:12–21
- Jeannotte F, Chao MV (2013) Are BDNF and glucocorticoid activities calibrated? *Neuroscience* 239:173–195
- Numakawa T, Adachi N, Richards M et al (2013) Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids: reciprocal influence on the central nervous system. *Neuroscience* 239:157–172
- Suri D, Valdivia VA (2013) Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neuroscience* 239:196–213
- Lambert WM, Xu CF, Neubert TA et al (2013) Brain-derived neurotrophic factor signaling rewrites the glucocorticoid transcriptome via glucocorticoid receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol* 33(18):3700–3714
- Koo JW, Mazei-Robison MS, LaPlant Q et al (2015) Epigenetic basis of opiate suppression of Bdnf gene expression in the ventral tegmental area. *Nat Neurosci* 18(3):415–422
- Tanis KQ, Duman RS, Newton SS (2008) CREB binding and activity in brain: regional specificity and induction by electroconvulsive seizure. *Biol Psychiatry* 63(7):710–720
- Zhu X, Dubey D, Bermudez C et al (2015) Suppressing cAMP response element-binding protein transcription shortens the duration of status epilepticus and decreases the number of spontaneous seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsia* 56(12):1870–1878
- Park SA, Kim TS, Choi KS et al (2003) Chronic activation of CREB and p90RSK in human epileptic hippocampus. *Exp Mol Med* 35(5):365–370
- Guo J, Wang H, Wang Q et al (2014) Expression of p-CREB and activity-dependent miR-132 in temporal lobe epilepsy. *Int J Clin Exp Med* 7(5):1297–1306
- Ridder S, Chourbaji S, Hellweg R et al (2005) Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J Neurosci* 25(26):6243–6250
- Schulte-Herbrüggen O, Chourbaji S, Ridder S et al (2006) Stress-resistant mice overexpressing glucocorticoid receptors display enhanced BDNF in the amygdala and hippocampus with unchanged NGF and serotonergic function. *Psychoneuroendocrinology* 31(10):1266–1277
- Chen H, Lombès M, Le Menuet D (2017) Glucocorticoid receptor represses brain-derived neurotrophic factor expression in neuron-like cells. *Mol Brain* 10(1):12

38. Galimberti CA, Magri F, Copello F et al (2005) Seizure frequency and cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) levels in women with epilepsy receiving antiepileptic drug treatment. *Epilepsia* 46(4):517–523
39. Nakken KO, Solaas MH, Kjeldsen MJ et al (2005) Which seizure-precipitating factors do patients with epilepsy most frequently report? *Epilepsy Behav* 6(1):85–89
40. Sperling MR, Schilling CA, Glosser D et al (2008) Self-perception of seizure precipitants and their relation to anxiety level, depression, and health locus of control in epilepsy. *Seizure* 17(4):302–307
41. Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA et al (2012) The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology* 36(3):415–425
42. Maric NP, Adzic M (2013) Pharmacological modulation of HPA axis in depression—new avenues for potential therapeutic benefits. *Psychiatr Danub* 25(3):299–305
43. Herrero MJ, Blanch J, Peri JM et al (2003) A validation study of the hospital anxiety and depression scale (HADS) in a Spanish population. *Gen Hosp Psychiatry* 25:277–283
44. Gómez-Arias B, Crail-Meléndez D, López-Zapata R et al (2012) Severity of anxiety and depression are related to a higher perception of adverse effects of antiepileptic drugs. *Seizure* 21:588–594
45. First Michael B, Spitzer, Robert L, et al (2002) Structured clinical interview for DSM-IV-TR axis I disorders, research version, patient edition, (SCID-I/P) New York: biometrics research, New York State Psychiatric Institute
46. San-Juan D, Tapia CA, González-Aragón MF et al (2011) The prognostic role of electrocorticography in tailored temporal lobe surgery. *Seizure* 20:564–569
47. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156–159
48. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3(6):1101–1108
49. Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z et al (1991) Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron* 7(1):165–176
50. Humpel C, Wetmore C, Olson L (1993) Regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level in pentylenetetrazol-induced epileptic seizures. *Neuroscience* 53(4):909–918
51. Vezzani A, Ravizza T, Moneta D et al (1999) Brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the limbic system of rats after acute seizures and during spontaneous convulsions: temporal evolution of changes as compared to neuropeptide Y. *Neuroscience* 90(4):1445–1461
52. Jiang X, Zhou J, Mash DC et al (2009) Human BDNF isoforms are differentially expressed in cocaine addicts and are sorted to the regulated secretory pathway independent of the Met66 substitution. *NeuroMolecular Med* 11(1):1–12
53. Koppel I, Tuvikene J, Lekk I et al (2015) Efficient use of a translation start codon in BDNF exon 1. *J Neurochem* 134(6):1015–1025
54. Chiaruttini C, Sonogo M, Baj G et al (2008) BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Mol Cell Neurosci* 37(1):11–19
55. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M et al (2007) Mouse and rat BDNF structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85:525–535
56. Aliaga EE, Mendoza I, Tapia-Arancibia L (2009) Distinct subcellular localization of BDNF transcripts in cultured hypothalamic neurons and modification by neuronal activation. *J Neural Transm* 116(1):23–32
57. Baj G, Del Turco D, Schlaudraff J et al (2013) Regulation of the spatial code for BDNF mRNA isoforms in the rat hippocampus following pilocarpine-treatment: a systematic analysis using laser microdissection and quantitative real-time PCR. *Hippocampus* 23(5):413–423
58. Baj G, D'Alessandro V, Musazzi L et al (2012) Physical exercise and antidepressants enhance BDNF targeting in hippocampal CA3 dendrites: further evidence of a spatial code for BDNF splice variants. *Neuropsychopharmacology* 37(7):1600–1611
59. Maynard KR, Hobbs JW, Sukumar M et al (2017) Bdnf mRNA splice variants differentially impact CA1 and CA3 dendrite complexity and spine morphology in the hippocampus. *Brain Struct Funct*. doi:10.1007/s00429-017-1405-3
60. Pruunsild P, Sepp M, Orav E et al (2011) Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *J Neurosci* 31(9):3295–3308
61. 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
62. Katanuma Y, Numakawa T, Adachi N et al (2014) Phencyclidine rapidly decreases neuronal mRNA of brain-derived neurotrophic factor. *Synapse* 68(6):257–265
63. Moore AN, Waxham MN, Dash PK (1996) Neuronal activity increases the phosphorylation of the transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) in rat hippocampus and cortex. *J Biol Chem* 271(24):14214–14220
64. Zhu X, Han X, Blendy JA et al (2012) Decreased CREB levels suppress epilepsy. *Neurobiol Dis* 45(1):253–263
65. Rakhade SN, Yao B, Ahmed S et al (2005) A common pattern of persistent gene activation in human neocortical epileptic foci. *Ann Neurol* 58(5):736–747
66. Beaumont TL, Yao B, Shah A et al (2012) Layer-specific CREB target gene induction in human neocortical epilepsy. *J Neurosci* 32(41):14389–14401
67. Bao GS, Cheng XQ, Hua Y et al (2011) Changes of glucocorticoid receptor mRNA expression in basolateral amygdala-kindled rats. *Chin Med J* 124(17):2622–2627
68. Hwang IK, Lee YB, Yoo KY et al (2005) Seizure-induced changes of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the hippocampus in seizure sensitive gerbils. *Neurosci Res* 53(1):14–24
69. Clark M, Smith MA, Weiss SR et al (1994) Modulation of hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression by amygdaloid kindling. *Neuroendocrinology* 59(5):451–456
70. Nyakas C, De Kloet ER, Veldhuis HD et al (1983) Hippocampal corticosterone receptors and novelty-induced behavioral activity. *Brain Res* 288(1–2):219–228
71. Baj G, Leone E, Chao MV et al (2011) Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(40):16813–16818
72. Lavebratt C, Trifunovski A, Persson AS et al (2006) Carbamazepine protects against megalencephaly and abnormal expression of BDNF and Nogo signaling components in the mcep/mcep mouse. *Neurobiol Dis* 24(2):374–383
73. Chang YC, Rapoport SI, Rao JS (2009) Chronic administration of mood stabilizers upregulates BDNF and bcl-2 expression levels in rat frontal cortex. *Neurochem Res* 34(3):536–541
74. Yasuda S, Liang MH, Marinova Z et al (2009) The mood stabilizers lithium and valproate selectively activate the promoter IV of brain-derived neurotrophic factor in neurons. *Mol Psychiatry* 14(1):51–59
75. Croce N, Mathé AA, Gelfo F et al (2014) Effects of lithium and valproic acid on BDNF protein and gene expression in an in vitro human neuron-like model of degeneration. *J Psychopharmacol* 28(10):964–972
76. Park SW, Lee JG, Seo MK et al (2015) Effects of mood-stabilizing drugs on dendritic outgrowth and synaptic protein levels in primary hippocampal neurons. *Bipolar Disord* 17(3):278–290
77. Varela RB, Valvassori SS, Lopes-Borges J et al (2015) Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced

- hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats. *J Psychiatr Res* 61:114–121
78. Chen PS, Peng GS, Li G et al (2006) Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. *Mol Psychiatry* 11(12):1116–1125
79. Fukuchi M, Nii T, Ishimaru N et al (2006) Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neurosci Res* 65(1):35–43
80. Almeida LE, Roby CD, Krueger BK (2014) Increased BDNF expression in fetal brain in the valproic acid model of autism. *Mol Cell Neurosci* 59:57–62
81. Blümcke I, Coras R, Miyata H et al (2012) Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Pathol* 22(3):402–411
82. Tassi L, Meroi A, Deleo F et al (2009) Temporal lobe epilepsy: neuropathological and clinical correlations in 243 surgically treated patients. *Epileptic Disord* 11(4):281–292
83. Fauser S, Schulze-Bonhage A (2006) Epileptogenicity of cortical dysplasia in temporal lobe dual pathology: an electrophysiological study with invasive recordings. *Brain* 129(Pt 1):82–95
84. Mai L, Jope RS, Li X (2002) BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3beta and mood stabilizing agents. *J Neurochem* 82(1):75–83
85. Shen HY, Kalda A, Yu L et al (2008) Additive effects of histone deacetylase inhibitors and amphetamine on histone H4 acetylation, cAMP responsive element binding protein phosphorylation and DeltaFosB expression in the striatum and locomotor sensitization in mice. *Neuroscience* 157(3):644–655
86. Errami M, Tassa AT, Galindo CL et al (2010) Carbamazepine alone and in combination with doxycycline attenuates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Heart Int* 5(1):c7
87. Bhowmik M, Saini N, Vohora D (2014) Histamine H3 receptor antagonism by ABT-239 attenuates kainic acid induced excitotoxicity in mice. *Brain Res* 1581:129–140
88. Tai YT, Lee WY, Lee FP et al (2014) Low dose of valproate improves motor function after traumatic brain injury. *Biomed Res Int* 2014:980657
89. Long ZM, Zhao L, Jiang R et al (2015) Valproic acid modifies synaptic structure and accelerates neurite outgrowth via the glycogen synthase kinase-3β signaling pathway in an Alzheimer's disease model. *CNS Neurosci Ther* 21(11):887–897
90. Basta-Kaim A, Budziszewska B, Jaworska-Feil L et al (2003) Opposite effects of clozapine and sulpiride on the lipopolysaccharide-induced inhibition of the GR-mediated gene transcription in fibroblast cells. *Pol J Pharmacol* 55(6):1153–1158
91. Usui T, Saitoh Y, Komada F (2003) Induction of CYP3As in HepG2 cells by several drugs. Association between induction of CYP3A4 and expression of glucocorticoid receptor. *Biol Pharm Bull* 26(4):510–517
92. Gajzer D, Ross J, Winder L et al (2016) Epigenetic and molecular signatures of cord blood CD34 (+) cells treated with histone deacetylase inhibitors. *Vox Sang* 110(1):79–89