



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

*EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE REST/NRSF Y LA POSIBLE
REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EJERCIDA SOBRE LOS GENES GRIA2
Y GABRD EN HIPOCAMPO DE PACIENTES CON EPILEPSIA DE LÓBULO
TEMPORAL FARMACORRESISTENTE*

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. en C. VÍCTOR NAVARRETE MODESTO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LUISA LILIA ROCHA ARRIETA

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA, CENTRO DE INVESTIGACIÓN
Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

COMITÉ TUTOR

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN

FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES

FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

CIUDAD DE MÉXICO. ENERO DE 2020



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.



DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

Esta tesis fue realizada en los siguientes laboratorios:

Laboratorio 8 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez" del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social

Laboratorio de Estructuras de Proteínas del Instituto Nacional de Medicina Genómica

La presente tesis fue realizada gracias al apoyo de:

Beca Nacional de Doctorado

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

CVU: 377494

Febrero 2014 - enero 2018

Programa de Becarios IMSS

Instituto Mexicano del Seguro Social

Matricula: 99096812

Marzo 2015 - febrero 2018

Esta tesis fue parte del proyecto R-2017-785-100 aprobado por el Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS a nombre de la Doctora Sandra Adela Orozco Suárez

Dedicada a:

A mis padres Margarito y Plácida por todo su apoyo, su ejemplo y su guía, pues a ellos debo todo lo que soy.

A mi pequeño Christian, quien le ha dado un nuevo sentido a mi vida, me ha mostrado una nueva y hermosa forma de amor y me ha dado las más grandes lecciones de vida.

A mis hermanos Edgar y Daniel (junto a su familia) quienes le han dado sentido a la vida familiar y me han brindado su apoyo y su confianza.

A la memoria de mis abuelos Francisco, Isabel y Florencio porque se que desde el lugar donde se encuentran, iluminan y guían cada paso en mi vida.

A Pako, Yaravi y Víctor, porque a pesar de que la vida nos ha llevado por caminos distintos, su apoyo, su confianza y compañía fue parte fundamental en este camino.

A todos los demás miembros de mi familia, tías, primos, sobrinos y en especial a mi abuelita Francisca, quienes siempre han creído en mí y me han brindado su mano para continuar en este camino.

Y a mis amigos, tanto nuevos, como aquellos que por años han estado ahí, viéndome crecer y que me han mostrado que todos los días es una nueva oportunidad para vivir.

Agradecimientos:

A la Dra. Luisa Rocha, por su invaluable apoyo y su guía en el camino de la ciencia, haciéndome parte de su equipo de trabajo en el laboratorio 8 del Cinvestav Sur.

A la Dra. Sandra Orozco por su apoyo, su asesoría y sobre todo por su gran calidad humana, que hicieron muy satisfactoria mi estancia en la UIMEN del CMNSXXI.

A la Dra. Iris Feria de la UIMEN del CMNSXXI, por su asesoría, disposición y apoyo en la realización de este proyecto, siempre con miras a fortalecer mi formación. Así como al Dr. Julio Pérez del INMEGEN, por su disposición y su valiosa contribución para el desarrollo de mi proyecto.

A las Dras. Rosalinda Guevara Guzmán y Carolina Escobar Briones por su tiempo en cada tutorial y su importante asesoría para el desarrollo del proyecto y en beneficio de mi formación.

A la UNAM y al posgrado de Ciencias Biomédicas por brindar los medios que permiten enriquecer la formación académica y profesional. Especialmente a Sara, secretaria de la entidad académica Instituto de Fisiología Celular cuya ayuda es fundamental al brindarnos todas las facilidades para los trámites administrativos propios del posgrado.

A todos los doctores que a través de los cursos comparten su tiempo y sus conocimientos favoreciendo nuestro desarrollo académico. A la Q.F.B. Francia Carmona Cruz del Cinvestav Sur por su asesoría y apoyo técnico en la realización del trabajo experimental

A ILAE e IBRO cuyo apoyo fue fundamental en mi proceso formativo y han abierto un parteaguas invaluable en mi desarrollo profesional como científico y epileptólogo

A todos aquellos compañeros y amigos que se volvieron parte fundamental de mi día a día, que hicieron más ameno el trabajo en el laboratorio (y fuera de él) al compartir momentos, charlas, sonrisas, tristezas, frustraciones y demás. Ángeles, Dany, Cindy, Marisol, José Luis, así como los doctores César, Ivette, Leonardo y Lupita del laboratorio 8 del Cinvestav. Monse, Angy, Viny, Estefy, Rodrigo, Josué, Lalo, Azul, Katia de la UIMEN del CMNSXXI. Así como Gabriel, mi teacher y gran amigo

A mis amigos de la vida, Gaby, Héctor, Martín, Pily, Cris, Isa, Mary, Ely y Ely que son como hermanos, nos hemos visto crecer y siempre han estado ahí creyendo en mí. También a Hiro, Jess, Salma, Gris y Diana, amigos entrañables que ya forman parte invaluable de mi historia.

A Pako, Yaravi y Víctor porque hicieron suyos mis sueños y recorrieron junto a mí una parte del camino.

A mis padres y hermanos por su gran apoyo y compartir sus sueños con los míos, por ser la gran familia que somos y por todo aquello que no puedo expresar con palabras. A Christian Jesús, mi hijo, porque gracias a él la vida tiene otro sentido, y es mi mayor impulso para conseguir este logro.

A mis abuelos Francisco, Isabel y Florencio por su Luz que siempre está conmigo, y a mi abuelita Francisca, por sus grandes enseñanzas de vida. A toda mi familia, quienes desde el inicio me han apoyado.

Finalmente quiero agradecer a Dios por la maravillosa vida que me ha dado, la gente que ha puesto en mi camino y por ser mi eterno guía y a quien todo debo.

Contenido

Índice de Abreviaturas	III
Índice de Figuras	V
Índice de Tablas	V
Resumen	VI
Summary	VII
1 Introducción.....	1
1.1 Epilepsia y Epilepsia de Lóbulo Temporal (ELTM).....	1
1.2 Tratamiento farmacológico y farmacorresistencia	2
1.3 Comorbilidades psiquiátricas asociadas a epilepsia y síndromes epilépticos	8
1.4 Regulación génica en ELTM	8
1.4.1 GluR2	9
1.4.1.1 Estructura y regulación genómica	9
1.4.1.2 Mecanismos funcionales	11
1.4.1.3 Implicaciones en epilepsia	12
1.4.2 GABA _{Aδ}	13
1.4.2.1 Estructura y regulación genómica	13
1.4.2.2 Mecanismos funcionales	15
1.4.2.3 Implicaciones en epilepsia	16
1.5 Regulación transcripcional mediada por REST/NRSF	18
2 Justificación.....	20
3 Hipótesis	20
4 Objetivos	20
4.1 Objetivo General	20
4.2 Objetivos Particulares	20
5 Materiales y métodos.....	21
5.1 Estandarización de la Reacción en Cadena de Polimerasa cuantitativa (qPCR).....	21
5.1.1 Diseño de cebadores y sondas para sistema TaqMan con IDT	21
5.1.2 Diseño de gBlocks para sistema TaqMan con IDT	23
5.1.3 Obtención de curvas de calibración.....	23
5.1.3.1 Preparación de células químicas competentes	24
5.1.3.2 Transformación de células quimiocompetentes	24
5.1.3.3 PCR de colonias (Colony PCR)	25
5.1.3.4 Curvas de calibración.....	25
5.2 Obtención de tejido hipocampal de autopsias.....	26
5.2.1.1 Criterios de inclusión	27
5.2.1.2 Criterios de exclusión	27
5.3 Obtención de tejido hipocampal de pacientes con ELTM farmacorresistente	28
5.3.1.1 Criterios de inclusión	29
5.3.1.2 Criterios de exclusión	29
5.4 Procesamiento y manipulación del tejido hipocampal	30
5.5 Extracción y procesamiento de ARNm mediante qPCR.....	30
5.5.1 Síntesis de ADN complementario (ADNc)	31
5.5.2 PCR en tiempo real	32
5.6 Extracción y procesamiento de proteínas mediante western blot	32
5.6.1 Extracción de proteínas totales	32
5.6.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	32
5.6.3 Transferencia.....	33
5.6.4 Bloqueo e inmunodetección	33
5.6.5 Stripping & reblotting	34
5.7 Inmunoprecipitación de cromatina.....	34
5.7.1 Disgregación del tejido y <i>crosslinking</i>	34
5.7.2 Lisis celular	35
5.7.3 Optimización de la fragmentación del ADN mediante sonicación.....	35

5.7.4	Inmunoprecipitación y <i>crosslinking reversal</i>	36
5.7.5	Amplificación de secuencias RE1 de los genes GRIA2 y GABRD por PCR	38
5.7.5.1	Análisis predictivos de sitios RE1 y diseño de cebadores.....	38
5.7.5.2	PCR punto final	39
5.8	Análisis estadístico.....	40
6	Resultados y discusión	41
6.1	Confiabilidad, sensibilidad y precisión en la amplificación génica.....	41
6.2	Expresión de REST/NRSF en pacientes con ELTM farmacorresistente y su asociación con variables clínicas y psiquiátricas.	43
6.2.1.1	Características clínicas de las autopsias.....	43
6.2.1.2	Características clínicas de los pacientes con ELTM farmacorresistentes.....	43
6.2.1.3	Expresión de REST/NRSF en hipocampo de autopsias	43
6.2.1.4	Expresión de REST/NRSF en hipocampo de pacientes con ELTM farmacorresistente y su asociación con las variables clínicas y comorbilidades psiquiátricas.....	46
6.3	Unión de REST/NRSF a la secuencia ER1 en el promotor de los genes GRIA2 y GABRD	50
6.3.1.1	Identificación de las secuencias RE1 en los promotores de GRIA2 y GABRD en corteza cerebral de autopsia	51
6.3.1.2	Unión de REST/NRSF a las secuencias promotoras de GRIA2 y GABRD en hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM.	54
6.4	Expresión transcripcional de GRIA2 y GABRD en hipocampo de pacientes con ELTM y su asociación con la sobreexpresión de REST/NRSF	57
6.4.1	Correlación entre los niveles de ARNm de GRIA2 y GABRD con las variables clínicas y la sobreexpresión de REST/NRSF	60
7	Discusión general.....	63
8	Conclusiones.....	67
9	Perspectivas.....	68
10	Bibliografía.....	71
11	Anexos.....	82
11.1	Anexo 1. Carta de autorización para la obtención de tejido hipocampal de autopsias.....	82
11.2	Anexo 2. Carta de aprobación del proyecto y protocolos relacionados.....	83
11.3	Anexo 3. Membrana completa de western blot para REST/NRSF	84
11.4	Anexo 4. Artículo Publicado	85
11.5	Anexo 5: Otras Publicaciones (Artículo de Revisión)	91
11.6	Anexo 6: Otras Publicaciones (Capítulo de Libro).....	104
11.7	Anexo 7: Participación en congresos y eventos científicos.....	121

Índice de Abreviaturas

ADAR	Adenosina Deaminasa Dependiente de ARN
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Ácido kaínico
AMPA	Receptores α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazolepropionato a glutamato
ANOVA	Análisis de Varianzas
AP2	Activator Protein 2/ Clathrin adaptor 2 (Proteína Activadora tipo 2/Adaptador de Clatrina tipo 2)
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BD	Bipolar Disorder (Desorden Bipolar)
BPD	Borderline Personality Disorder (Trastorno Limitrofe de Personalidad)
BSF-1	Factor Específico de Cerebro 1
CA	Regiones del <i>Cornu Ammonio</i> (Cuerno de Amón, Hipocampo)
Ca ²⁺	Ion calcio
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Cbp	Cuanto baste para
ChIP	Chromatin immunoprecipitation (Inmunoprecipitación de cromatina)
Cl ⁻	Ion cloro
CP	cross point (Punto de cruce)
CpG, isla	Regiones con una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos (Citosina-fosfato-Guanina)
CREB	Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) response element-binding protein (Proteína de unión al elemento de respuesta a Adenosín Monofosfato cíclico)
DEPC	Diethyl pyrocarbonate (Dietil pirocarbonato)
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphates (Deoxinucleótidos trifosfato)
DO	Densidad Óptica
DRG	Dorsal Root Ganglion (Ganglio de la raíz dorsal)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEG	Electroencefalograma
EEM	Error Estandar de la Media
ELT	Epilepsia de Lóbulo Temporal
ENO2	Gen que codifica para Enolasa 2
ERK	Extracellular-signal-Regulated Kinase pathway (Vía de las cinasas reguladas por señales extracelulares)
FAE	Fármaco Antiepiléptico
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA _A	Receptor tipo A para ácido γ -aminobutírico
GABA _{Aδ}	Subunidad delta de los receptores GABA _A
GABRD	Gen que codifica para la subunidad δ de los receptores GABA _A
GDNF	Glial cell-Derived Neurotrophic Factor (Factor Neurotrófico derivado de células gliales)
GluR	Subunidades de los receptores AMPA a glutamato
GRIA2	Gen que codifica para la subunidad 2 de los receptores AMPA a glutamato
GRIP	Glutamate Receptor Interacting Protein (Proteína de interacción con el receptor a glutamato)
HADS	Hospital and Anxiety Depression Scale
HCl	Ácido clorhídrico
HCN1	Gen que codifica para los canales de cationes acoplados a nucleótidos cíclicos de tipo 1
HDAC	Histone Deacetylase (Desacetilasa de histonas)
HMT	Histone methyltransferases (Metiltransferasa de histonas)
HS	Hippocampal Sclerosis (Esclerosis hipocampal)
IDT®	Integrated DNA Technologies (Tecnologías integradas del ADN)
I _h	Corriente hiperpolarizante

ILAE	International League Against Epilepsy (Liga Internacional contra la epilepsia)
IPM	Intervalo Post-Mortem
K ⁺	Ion potasio
LB, agar	Agar Luria-Bertani
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase pathway (Vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos)
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
Na ⁺	Ion sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NC	Nucleotide Complete. (Molécula genómica completa en base de datos de NCBI)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información en Biotecnología)
NM	Nucleotide Messenger (Secuencia ARNm en base de datos de NCBI)
NP-40	Nonil Fenoxipolietoxiletanol
NRF-1	Nuclear Respiratory Factor 1 (Factor Respiratorio Nuclear tipo 1)
NRSF	Neuron-Restrictive Silencer Factor (Factor Silenciador Restrictivo a Neuronas)
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive fusion proteins (Proteínas de Fusión Sensibles a N-etilmaleimida).
Nt	Nucleótidos
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Amortiguador salino de fosfatos)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDZ	Dominio de reconocimiento proteico que repite la secuencia Glicina-Leucina-Glicina-Fenilalanina
PICK1	Protein Interacting with C Kinase – 1 (Proteína que interactúa con la C cinasa 1)
qPCR	Quantitative PCR (PCR cuantitativa)
<i>r</i>	Coefficiente de correlación de Pearson
R ²	Coefficiente de correlación lineal.
RE1	Represor Element 1 (Elemento represor tipo 1)
REST	Gen que codifica para el factor de transcripción REST/NRSF
REST	RE1-Silencing Transcription factor (Factor de Transcripción Silenciador de RE1)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEMEFO	Servicio Médico Forense
SFB	Suero Fetal Bovino
Sin3A	Paired amphipathic helix protein (Proteína con hélices emparejadas anfipáticas)
SNC	Sistema Nervioso Central
SOB, medio	Medio "Super Optimal Broth"
Sp1	Specific Protein 1 (Proteína Especifica 1)
TATA, caja	Secuencia del tipo 5'-TATAAA-3', que es seguida generalmente por tres o más adeninas encontrada en los promotores génicos.
TBS	Tris-Buffered Saline (Amortiguador salino de Tris)
TM	Dominios Transmembranales
Tm	Melting Temperature (Temperatura de Fusión)
UTR	Untranslated Region (Región no traducida)
WNT	Wingless/Integrated pathway (Vía Wingless/integrada)

Índice de Figuras

Figura 1	Estructura y regulación del gen GRIA2.....	10
Figura 2	Estructura y función de la subunidad GluR2.....	11
Figura 3	Estructura y función del gen GABRD humano.....	14
Figura 4	Estructura y función de los receptores GABA _A	15
Figura 5	Función y Estructura génica y proteica de REST/NRSF.....	19
Figura 6	Fragmento gBlock global.....	23
Figura 7	Patrones de fragmentación del ADN mediante sonicación.....	37
Figura 8	Ensayos predictivos ChIP-Seq para la unión de REST/NRSF en sitios RE1 de GRIA2 y GABRD.....	39
Figura 9	Curvas de calibración para qPCR de ENO2, REST/NRSF, GRIA2 y GABRD.....	42
Figura 10	Correlación de la edad con la expresión proteica de REST/NRSF en el hipocampo humano.....	46
Figura 11	Expresión de REST/NRSF en el hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM farmacorresistente.....	47
Figura 12	Correlación entre la frecuencia de las crisis epilépticas y la expresión de proteína de REST/NRSF en el hipocampo de pacientes con ELTM farmacorresistente.....	48
Figura 13	Expresión de REST/NRSF en el hipocampo de pacientes con ELTM farmacorresistente con y sin ansiedad y depresión comórbidas.....	49
Figura 14	Determinación de los sitios RE1 de los promotores de los genes GRIA2 y GABRD.....	52
Figura 15	Localización de las secuencias RE1 en los genes GRIA2 y GABRD.....	53
Figura 16	Unión de REST/NRSF a las secuencias RE1 de los genes GRIA2 y GABRD en hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM.....	56
Figura 17	Expresión de ARNm de GluR2 y GABAA δ en hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM farmacorresistente.....	59
Figura 18	Correlación de la edad con la expresión de ARNm de GluR2 en hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM farmacorresistente.....	60
Figura 19	Correlación entre la frecuencia de crisis epilépticas y la expresión de ARNm de GluR2 y GABAA δ en pacientes con ELTM farmacorresistente.....	62
Figura 20	Modelo de regulación transcripcional de los genes GRIA2 y GABRD mediada por REST/NRSF en hipocampo de pacientes con ELTM.....	60

Índice de Tablas

Tabla 1	Clasificación de los Fármacos Antiepilépticos utilizados en la clínica.....	3
Tabla 2	Características de los cebadores y sondas para REST/NRSF, GRIA2, GABRD y ENO2.....	22
Tabla 3	Programa de amplificación por qPCR para REST/NRSF y ENO en sistema LightCycler 2.0.....	26
Tabla 4	Datos demográficos de las autopsias.....	27
Tabla 5	Datos clínicos de los pacientes con ELTM.....	28
Tabla 6	Cebadores utilizados para amplificar las dos secuencias hipotéticas de unión de REST/NRSF a los promotores de GRIA2 y GABRD.....	38
Tabla 7	Valores de la ecuación de la recta obtenidos de curvas de calibración de ENO2 y REST/NRSF, GRIA2 y GABRD.....	42
Tabla 8	Valores de expresión de ARNm y proteínas de pacientes y autopsias.....	44
Tabla 9	Correlaciones entre la expresión de REST/NRSF y las variables clínicas.....	45
Tabla 10	Correlaciones entre los niveles de ARNm de GluR2 y GABAA δ con las variables clínicas de las autopsias y pacientes con ELTM.....	58

Resumen

Introducción: REST/NRSF es un factor de transcripción que reprime genes neuronales al unirse a su secuencia consenso en el ácido desoxirribonucleico (ADN), conocida como sitio RE1. Diversos estudios experimentales han demostrado que los genes GRIA2 y GABRD tienen sitios RE1 en sus regiones promotoras. El gen GRIA2 codifica para la subunidad GluR2 de los receptores AMPA a glutamato, la cual regula la permeabilidad a calcio. El gen GABRD codifica para la subunidad δ de los receptores GABA_A, la cual regula la corriente tónica a nivel extrasináptico. Por otra parte, se ha demostrado que en modelos experimentales de crisis convulsivas se incrementa la expresión de REST/NRSF a la vez que disminuyen los niveles de ARNm de GluR2 y GABA_{A δ} . Sin embargo, a la fecha no se ha evaluado la expresión de REST/NRSF, ni su participación sobre la regulación transcripcional de los genes que codifican para GluR2 y GABA_{A δ} en pacientes con Epilepsia de Lóbulo Temporal Mesial (ELTM) farmacorresistente.

Materiales y Métodos: Se obtuvieron 28 hipocampos de pacientes con ELTM fármacorresistente sometidos a cirugía y 13 hipocampos de autopsias que fueron utilizados como condición control. La expresión de ARNm y proteína de REST/NRSF, GluR2 y GABA_{A δ} se evaluó mediante PCR en tiempo real (qPCR) y *western blot*, respectivamente. La unión de REST/NRSF a las secuencias RE1 en los promotores de GRIA2 y GABRD se determinó mediante Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) seguida de PCR punto final. En todos los casos se determinaron las correlaciones entre la expresión de ARNm y proteínas con las variables clínicas y con comorbilidades psiquiátricas como ansiedad y depresión.

Resultados: Los resultados mostraron que el ARNm y la proteína de REST/NRSF se incrementan en pacientes versus autopsias. El incremento proteico de REST/NRSF se asocia con una mayor frecuencia de crisis epilépticas y se incrementa con la edad en autopsias. Además, la sobreexpresión de REST/NRSF fue más evidente en pacientes con MTLE sin ansiedad y depresión. Se determinaron los sitios RE1 de los promotores de GRIA2 y GABRD, y mediante ChIP se mostró que están más enriquecidos con REST/NRSF en pacientes que en autopsias. Además, la expresión de ARNm de GluR2 y GABA_{A δ} disminuye en pacientes con ELTM. Dicha disminución correlaciona con una mayor frecuencia de crisis epilépticas de manera inversamente proporcional a la proteína de REST/NRSF. Así también, a mayor edad, los niveles de ARNm de GluR2 disminuyen tanto en pacientes como en autopsias.

Conclusiones: El factor de transcripción REST/NRSF se sobreexpresa en el hipocampo de pacientes con ELTM. La sobreexpresión de REST/NRSF se asocia positivamente con la frecuencia de las crisis y con el desarrollo de comorbilidades psiquiátricas. La sobreexpresión de REST/NRSF en pacientes con ELTM induce una mayor unión a las secuencias RE1 de los genes GRIA2 y GABRD, lo que correlaciona con la disminución en sus niveles de ARNm. De acuerdo con lo anterior, la inhibición transcripcional mediada por REST/NRSF podría ser uno de los mecanismos represores de GRIA2 y GABRD, modificando su regulación y facilitando la actividad epiléptica, ya que dichos genes están involucrados en procesos de excitabilidad e inhibición de redes neuronales

Summary

Rational: REST / NRSF is a transcription factor that acts as a transcriptional repressor of neuronal genes by binding to its consensus sequence, known as the RE1 site, in DNA. Several experimental studies have shown that the GRIA2 and GABRD genes have RE1 sites in their promoter regions. The GRIA2 gene code for the GluR2 subunit of glutamate AMPA receptors, which regulates calcium permeability. The GABRD gene codes for the δ subunit of the GABAA receptors, which regulate the tonic current at the extrasynaptic level and the neuronal excitability, according to the chloride ion concentration gradient. On the other hand, it has been demonstrated that in experimental models of seizures, the expression of REST/NRSF is increased while the levels of mRNA of GluR2 and GABA_{A δ} decrease. However, to date, the expression of REST/NRSF, nor its participation on the transcriptional regulation of genes encoding GluR2 and GABA_{A δ} in patients with drug-resistant Mesial Temporal Lobe Epilepsy (mTLE) has not been evaluated.

Materials and Methods: 28 hippocampi were obtained from patients with drug-resistant mTLE undergoing surgery and 13 autopsy hippocampi, that were used as controls. The expression of mRNA and proteins of REST/NRSF, GluR2 and GABA_{A δ} was assessed by real-time PCR (qPCR) and *western blot*, respectively. The binding of REST/NRSF to RE1 sequences in the GRIA2 and GABRD promoters was determined by Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) followed by endpoint PCR. In all cases, the statistical correlations between the expression of mRNA and proteins with clinical variables and with psychiatric comorbidities were determined.

Results: The results showed that both the mRNA and the REST/NRSF protein are increased in patients versus autopsies. The increase in protein expression is associated with a greater frequency of epileptic seizures. On the other hand, the REST/NRSF protein increases with age at autopsy. The RE1 sites of the GRIA2 and GABRD promoters were determined, and ChIP showed that they are more enriched with REST/NRSF in patients compared to autopsies. In addition, the expression of GluR2 and GABA_{A δ} mRNA decreases in patients with mTLE. This decrease correlates with a higher frequency of epileptic seizures inversely proportional to the REST/NRSF protein. Also, at an older age, GluR2 mRNA levels decrease both in patients and in autopsies.

Conclusions: The transcription factor REST/NRSF is overexpressed in the hippocampus of patients with mTLE. Overexpression of REST/NRSF is positively associated with the frequency of seizures and with the development of psychiatric comorbidities. Overexpression of REST/NRSF in patients with mTLE induces a greater binding to the RE1 sequences of the GRIA2 and GABRD genes, which correlates with the decrease in their mRNA levels. According to the above, the transcriptional inhibition mediated by REST/NRSF could be one of the repressor mechanisms of GRIA2 and GABRD, modifying its regulation and facilitating epileptic activity, since these genes are involved in processes of excitability and inhibition of neural networks.

1 Introducción

1.1 Epilepsia y Epilepsia de Lóbulo Temporal (ELTM)

La epilepsia es un desorden neurológico que afecta a casi el 1% de la población mundial equivalente a casi 70 millones de personas (Elger, 2002) y que ocupa el segundo lugar mundial en prevalencia de entre todas enfermedades neurológicas (Hwang et al., 2013). Se define como la condición recurrente de crisis epilépticas no provocadas (dos o más), debido a una predisposición genética o un estado patológico crónico adquirido (Stafstrom, 2010). Así, una crisis epiléptica se define como la alteración temporal de la función cerebral debido a una descarga excesiva y anormal en las neuronas corticales (Stafstrom, 2010).

A nivel celular la comunicación neuronal está regulada a través de un complejo equilibrio entre las señales excitadoras, mediadas principalmente por glutamato, y las señales inhibitorias, mediadas principalmente por el ácido γ -aminobutírico (GABA). Cuando dicho equilibrio se altera por sobreexcitación, o bien por reducción de la inhibición, puede conducir a crisis epilépticas, las cuales se caracterizan por una hiperactividad eléctrica sincrónica e intermitente (Stafstrom, 2010, Cabo-de la Vega et al., 2006). Estas alteraciones eléctricas llevan al desarrollo de dos procesos característicos de la actividad epiléptica, el primero es la hiperexcitabilidad, la cual se refiere a la respuesta anormal de una neurona a estímulos excitatorios (una neurona hiperexcitable tiende a disparar ráfagas de múltiples potenciales de acción en lugar de solo uno o dos), y el segundo es la hipersincronía que se refiere a la respuesta simultánea de un amplio número de neuronas vecinas dentro de un modo de activación anormal (Stafstrom, 2010, Engel et al., 2009).

En 1989 la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE por sus siglas en inglés), ya definía más de 40 tipos de epilepsias (ILAE, 1989), las cuales actualmente se han clasificado en 4 tipos (Scheffer et al., 2017):

1. **Epilepsias focalizadas**, las cuales se refieren a desórdenes mono o polifocales y crisis que involucran solo a un hemisferio cerebral.
2. **Epilepsias generalizadas**, las cuales involucran todas las áreas cerebrales, por lo cual, en el EEG muestran una actividad punta-onda generalizada.
3. **Epilepsias focalizadas/generalizadas**, que son la combinación de las dos primeras, y se presenta generalmente en síndromes como los de Dravet y Lennox-Gastaut.

- 4. Epilepsias desconocidas**, son aquellas con falta de información precisa o no concordante con los criterios de las dos primeras.

En el grupo de las epilepsias focales, la más común es la Epilepsia de Lóbulo Temporal (ELT) (Bell et al., 2011). Se le da ese nombre por que surge de las regiones del lóbulo temporal mesial, en donde la actividad convulsiva involucra la formación hipocampal, en donde se presentan las principales características neuropatológicas, tales como la esclerosis hipocampal (HS, por sus siglas en inglés) (Aronica y Gorter, 2007) y en donde se presenta la exagerada sincronización neuronal característica de la epilepsia (Stafstrom, 2010, Malkki, 2014, ILAE, 1989). La HS se presenta en cerca del 65% de los pacientes con ELT y es una condición patológica caracterizada por una selectiva pérdida neuronal y gliosis en la región CA1 del hipocampo, además de la dispersión de células de la capa granular del giro dentado, neurogénesis de células granulares y reorganización sináptica de las fibras musgosas (Aronica y Gorter, 2007, Briellmann et al., 1999, Dichter, 2009).

En condiciones normales el hipocampo muestra una robusta sincronización neuronal y un equilibrio en la actividad de los canales responsables de la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria (Stafstrom, 2010). La neurotransmisión depende de canales activados por voltaje, en cuyo caso los canales de sodio y calcio son excitatorios, mientras que los de potasio y cloro son inhibitorios. También están los canales activados por ligando, en cuyo caso los receptores a glutamato son excitatorios y los receptores a GABA son inhibitorios (Jiruska et al., 2013, Bean, 2007). Los estudios anatómicos y patológicos en hipocampo de pacientes con ELT farmacorresistente, han mostrado que dicho desorden está asociado a una cierta pérdida de neuronas gabaérgicas (interneuronas) y a displasias corticales. Dichos eventos conllevan a un desequilibrio en la sincronización neuronal normal, haciendo que la actividad de los elementos excitatorios antes mencionados, esté por encima de los inhibitorios (Cabo-de la Vega et al., 2006).

1.2 Tratamiento farmacológico y farmacorresistencia

El tratamiento farmacológico actual está dirigido a contrarrestar alguna o varias de las alteraciones producidas a nivel de transportadores, canales iónicos y/o los sistemas de neurotransmisión glutamatérgicos y gabaérgicos. En la tabla 1 uno se describen los mecanismos de acción y las crisis para las cuales son indicados los Fármacos

Antiepilépticos (FAEs) disponibles en la clínica, así como su clasificación de acuerdo con el periodo en que comenzaron a utilizarse (Brodie et al., 2016a).

Tabla 1. Clasificación de los Fármacos Antiepilépticos utilizados en la clínica.

FAE	Tipo de Crisis	Mecanismo Farmacológico	Referencias
Primera generación (1912-1978)			
Carbamazepina (CBZ)	Focales y generalizadas	Bloqueo de canales de Na ⁺ dependientes de voltaje.	(Cotterman-Hart, 2015, Willow et al., 1984, Sheets et al., 2008)
Etosuximida (ESM)	Ausencia	Reducción de corrientes de Ca ²⁺ de bajo umbral tipo T.	(Cotterman-Hart, 2015, Coulter et al., 1989, Kostyuk et al., 1992)
Fenobarbital (PB)	Focales, generalizadas y de ausencia	Prolonga la apertura de los canales GABA _A e incrementa la afinidad del receptor por el ligando.	(Czapinski et al., 2005, Macdonald y Barker, 1977)
Fenitoína (PHT)	Focales y generalizadas	Inhibición de canales de Na ⁺ dependientes de voltaje e incremento de la neurotransmisión gabaérgica reduciendo el eflujo de K ⁺ .	(French y Gazzola, 2011, Hanaya y Arita, 2016, Wong y Teo, 1986, De Weer, 1980)
Primidona (PRM)	Focales y generalizadas	Desconocido. (Se cree que inhibe la actividad de los canales de Na ⁺ e incrementa la inhibición mediada por GABA).	(Cotterman-Hart, 2015)
Valproato (VPA)	Generalizadas y de ausencia	Inhibición de canales de Na ⁺ y de Ca ²⁺ tipo T acoplados a voltaje. Inhibición de la degradación metabólica de GABA debido al bloqueo de la GABA transaminasa. Potencia la inhibición mediada por GABA, mediante el incremento de la afinidad del receptor GABA _A por el ligando.	(Czapinski et al., 2005, Hanaya y Arita, 2016, Kelly et al., 1990, Macdonald y Bergery, 1978)
Segunda generación (1989-2004)			
Clobazam (CBZ)	Asociadas al Sx. Lennox-Gastaut	Incremento de la neurotransmisión gabaérgica.	(Tolou Ghamari et al., 2015, Nakamura et al., 1996)
Clonazepam (CNZ)	Generalizadas y asociadas a Sx. Lennox-Gastaut	Favorece la neurotransmisión gabaérgica.	(Tolou Ghamari et al., 2015, Jenner et al., 1986, Brodie et al., 2016b, Shangguan et al., 2015)
Felbamato (FBM)	Asociadas al Sx. de Lennox-Gastaut	Bloqueo de canales de Na ⁺ dependientes de voltaje. Inhibición de la neurotransmisión glutamatérgica vía interacciones con receptores AMPA/kainato y con la subunidad NR2B de los receptores NMDA e incremento de la inhibición mediada por GABA modulando la actividad de los receptores GABA.	(Harty y Rogawski, 2000, Tagliatela et al., 1996, Rho et al., 1994, De Sarro et al., 1994, Rho et al., 1997)

Gabapentina (GBP)	Focales	Bloqueo de canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje vía su unión a la subunidad $\alpha 2\delta$ e Incremento de la síntesis de GABA.	(Gee et al., 1996, Bryans et al., 1998)
Lacosamida (LCM)	Focales y generalizadas	Inactivación selectiva de los canales de Na ⁺ dependientes de voltaje.	(Asconape, 2013, Errington et al., 2008, Sheets et al., 2008)
Lamotrigina (LTG)	Focales, generalizadas y asociadas al Sx. Lennox-Gastaut	Bloqueo de canales de Na ⁺ dependientes de voltaje. Inhibe las corrientes de (Tipo N) en neuronas, inhibiendo la liberación de glutamato y aspartato.	(Cotterman-Hart, 2015, Stefani et al., 1996, Xie et al., 1995, Ookubo et al., 2013)
Levetiracetam (LEV)	Focales y generalizadas.	Inhibición selectiva de canales de Ca ²⁺ tipo N y T dependientes de voltaje. Unión a proteínas sinápticas SV2A que alteran la liberación de neurotransmisores.	(Lukyanetz et al., 2002, Hovinga, 2001, Lynch et al., 2004, Rigo et al., 2002, Madeja et al., 2003)
Oxcarbazepina (OXC)	Focales	Bloqueo de canales de Na ⁺ y Ca ²⁺	(Cotterman-Hart, 2015, Wellington y Goa, 2001, Huang et al., 2008)
Perampanel (E2007)	Focales	Agonista no competitivo, altamente selectivo de los canales AMPA postsinápticos.	(Hanada et al., 2011, Plosker, 2012, Rektor, 2013)
Pregabalina (PGB)	Focales y generalizadas	Bloqueo de canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje vía su unión a la subunidad $\alpha 2\delta$, con lo que reduce la liberación sináptica de varios neurotransmisores.	(Cotterman-Hart, 2015, Fink et al., 2002, Taylor et al., 2007)
Tiagabina (TGB)	Focales y generalizadas	Inhibe la recaptura glial y neuronal de GABA, incrementando sus niveles en la hendidura sináptica.	(Czapinski et al., 2005, Nielsen et al., 1991)
Topiramato (TPM)	Focales y generalizadas.	Inhibe las corrientes de Na ⁺ y dependientes de voltaje, incrementa la inhibición mediada por GABA, incrementa las corrientes de potasio, reduce los niveles de glutamato y aspartato y modula los niveles de Ca ²⁺ mediante la regulación de los receptores AMPA/KA.	(Mula et al., 2006, Cotterman-Hart, 2015, Czapinski et al., 2005)
Vigabatrina (VGB)	Focales y espasmos infantiles.	Incrementa los niveles de GABA por inhibición irreversible de la GABA transaminasa.	(Cotterman-Hart, 2015, Jung et al., 1977)
Zonisamida (ZNS)	Focales y generalizadas	Bloquea canales de Na ⁺ dependientes de voltaje y canales de Ca ²⁺ tipo T. Incrementa la neurotransmisión dopaminérgica, serotoninérgica y gabaérgica. Reduce la sobreproducción de óxido nítrico y radicales libres, favoreciendo efectos neuroprotectores y anticonvulsivantes.	(Kito et al., 1996, Ueda et al., 2003, Schauf, 1987, Kaneko et al., 1993, Mori et al., 1998)

Tercera generación (Desde 2008)			
Brivaracetam (BRI)	Focales y generalizadas	Unión selectiva y de alta afinidad a SV2 Inhibe los canales de Na ⁺ dependientes de voltaje	(Zona et al., 2010, Nicolas et al., 2016)
Canabidiol (CBD)	Epilepsia Refractaria	Antagonista no competitivo de los receptores CB1 y agonista inverso de los receptores CB2. Agonista de TRPV1-4, TRPA1, 5-HT1A, PPAR-γ y las subunidades α1 y α3 del receptor a glicina. Antagonista de TRPM8, GPR55 y canales de Ca ²⁺ + tipo T activados por voltaje. Modula TNFα, VDAC1 y los receptores a adenosina (A1 y A2)	(Friedman y Devinsky, 2016, Perucca, 2017, Ibeas Bih et al., 2015)
Canabidavirina (CBDV)	Generalizadas	Modulación de los canales TRP	(Friedman y Devinsky, 2016, De Petrocellis et al., 2011)
Carabersat (SB-204269) (CRB)	Focales y generalizadas	Se une a un sitio estereoespecífico en el SNC, regulando la excitabilidad neuronal. No sigue ningún mecanismo antes descrito para FAEs	(Upton et al., 1997, Luszczki, 2009, Herdon et al., 1997)
Carisbamato (CBM)	Recurrentes y espontaneas	Inhibe canales de Na ⁺ y potenciales de acción.	(Liu et al., 2009, Kulig y Malawska, 2007, Deshpande et al., 2008)
Eslicarbazepin acetato (ESL)	Focales y para epilepsia refractaria	Bloquea los canales de Na ⁺ dependiente de voltaje, estabilizando el disparo sostenido y repetitivo, con lo que inhibe la liberación de glutamato y otros neurotransmisores.	(Ambrosio et al., 2001, Parada y Soares-da-Silva, 2002, Holtkamp et al., 2016, Tambucci et al., 2016)
Fosfenitoin (FPHT)	Focales	Modula canales de Na ⁺ dependientes de voltaje.	(Boucher, 1996, Luszczki, 2009)
Ganaxolona (GNX)	Focales y espasmos infantiles	Modulación de receptores GABA _A incrementando la permeabilidad de Cl ⁻ sin activación de receptores nucleares a progesterona. A bajas concentraciones potencia la acción de GABA y a altas concentraciones activa el receptor GABA _A .	(Hosie et al., 2006, Carter et al., 1997, Monaghan et al., 1999, Nohria y Giller, 2007)
Lacosamida (LCM)	Focales	Inactiva los canales de Na ⁺ dependientes de voltaje y bloquea alostericamente los receptores NMDA uniéndose a la subunidad NR2B	(Errington et al., 2008, Stohr et al., 2007, Kellinghaus, 2009)
Pregabalina (PGB)	Focales y generalizadas	Atenúa la liberación de Ca ²⁺ inducida por despolarización, esto mediante su unión a las subunidades α2δ tipo 1 y 2, con lo que inhibe la liberación de glutamato, norepinefrina y sustancia P	(Dooley et al., 2002, Dooley et al., 2000, Taylor et al., 2007)

Retigabina (RTG)	Focales y para epilepsia refractaria severa.	Apertura de canales de potasio KCNQ (Tipo Kv7) Bloquea débilmente los canales de Na ⁺ y Ca ²⁺ . Incrementa la síntesis de GABA y corrientes de Cl ⁻ . Modula positivamente los receptores GABA _A que contienen las subunidades β2 y β3.	(Gunthorpe et al., 2012, Wuttke et al., 2005, Otto et al., 2002, van Rijn y Willems-van Bree, 2003)
Rufinamida (RUF)	Asociadas con el Sx. Lennox-Gastaut	Prolonga el estado de inactivación de los canales de Na ⁺ dependientes de voltaje, limitando el disparo de los potenciales de acción.	(Perucca et al., 2008, White et al., 2008, Luszczki, 2009)
Seletracetam (SEL)	Epilepsias genéticas.	Unión selectiva y de alta afinidad a SV2A y reduce las corrientes de Ca ²⁺	(Pollard, 2008, Martella et al., 2009)
Talampanel (TLP)	Focales y para epilepsia refractaria.	Bloquea los receptores AMPA de manera estereoselectiva y no competitiva e inhibe débilmente los receptores a Kainato.	(May et al., 1999, Wang y Niu, 2013, Howes y Bell, 2007)

AMPA, receptores α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico; **Ca²⁺**, ion calcio; **CB1**, Receptor cannabinoide de tipo 1; **CB2**, Receptor cannabinoide de tipo 2; **FAE**, Fármaco Antiepiléptico; **GABA**, Ácido Gamma-aminobutírico; **GABA_A**, Receptores a GABA tipo A; **GPR55**, Receptor 55 acoplado a proteína G; **K⁺**, ion potasio; **KA**, Kainato; **Na⁺**, ion sodio; **NMDA**, receptores de N-metil-D-aspartato; **PPAR-γ**, Receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma; **SNC**, Sistema Nervioso Central; **SV2A**, Proteína de Vesículas Sinápticas tipo 2A; **Sx**, síndrome; **TNFα**, Factor de Necrosis Tumoral alfa; **TRPV1-4**, Receptor de potencial transitorio V1-4; **TRPA1-4**, Receptor de potencial transitorio A1; **TRPM8**, Receptor de potencial transitorio M8, **VDAC1**, Canal dependiente de voltaje selectivo de aniones 1.

En pacientes adultos, la ELT es la de mayor incidencia en resistencia al tratamiento farmacológico, debido a ello, el tratamiento de elección para estos pacientes suele ser la resección de las estructuras epileptogénicas a través de una lobectomía temporal (Bell et al., 2011). Se ha demostrado que en ELT la zona epileptogénica es amplia e involucra, además del hipocampo, a otras estructuras límbicas incluyendo la formación parahipocampal, la amígdala y las cortezas entorhinal y perirhinal (Bernasconi et al., 2003).

Al inicio del tratamiento se prescribe un FAE en monoterapia y la dosis se incrementa de manera gradual hasta alcanzar un control total de las crisis o la aparición de efectos adversos. Con dicho régimen farmacológico, alrededor del 47% de los pacientes permanece libre de crisis a largo plazo. Del 53% de los pacientes que no se controlan con la monoterapia inicial, alrededor del 13% lo harán con un segundo FAE en monoterapia (o incluso un tercero) y un 3% lo hará con el uso simultáneo de dos FAEs. Sin embargo, existe un 30% de pacientes con epilepsia que no se controla tras probar

varios regímenes de politerapia, y si esto ocurre en un lapso de 1 a 2 años, se les denomina *farmacorresistentes* (Diaz, 2004, LaRoche y Helmers, 2004, Malkki, 2014). Las causas que llevan a este fenómeno de resistencia al tratamiento farmacológico se desconocen, aunque se ha demostrado que las crisis repetitivas inducen una menor respuesta a los FAEs y aumentan el riesgo de daño neuronal (Gutiérrez-Manjarrez y García-Ramos, 2010). Por otra parte, se han postulado varias hipótesis para tratar de explicar el fenómeno de la farmacorresistencia (Basic, 2016):

- Hipótesis de los transportadores. Sugiere que hay una inadecuada penetración de los fármacos a través de la barrera hematoencefálica, causada por un incremento en la expresión o función de los transportadores de eflujo, llevando a niveles de fármaco insuficientes en el tejido cerebral epileptogénico.
- Hipótesis del blanco terapéutico. Sugiere una reducción en la sensibilidad, causada por cambios intrínsecos o adquiridos en los principales blancos de los FAEs.
- Hipótesis de las redes. Propone que la farmacorresistencia es consecuencia de alteraciones estructurales o cambios en las redes cerebrales (como en HS).
- Hipótesis de las variantes génicas. Sugiere que existe una resistencia determinada por variantes genéticas que alteran la estructura y función de proteínas involucradas en la farmacocinética y la farmacodinámica de los FAEs.
- Hipótesis de la farmacocinética. Postula el desarrollo de tolerancia metabólica, como respuesta adaptativa del cuerpo, tras la administración repetida de los FAEs.
- Hipótesis de la severidad intrínseca. Sugiere que cuanto más severa es la epilepsia, se vuelve menos tratable farmacológicamente.
- Hipótesis de la regulación de las redes bioenergéticas. Considera que la epilepsia es resultado de la disfunción de redes complejas, que implica no solo el desequilibrio de excitación e inhibición neuronal, sino también la disfunción del control glial de la homeostasis cerebral, procesos inflamatorios, alteraciones bioquímicas, cambios bioenergéticos y cambios epigenéticos (por ejemplo, la disfunción en la homeostasis cerebral del ribonucleósido de adenosina, el cual es parte del ATP).
- Hipótesis de la metilación. Sugiere que los eventos desencadenantes iniciales y las convulsiones por sí mismas pueden inducir metilación del ADN. Este proceso altera la función de la cromatina e induce el fenotipo epileptogénico, que incluye convulsiones recurrentes crónicas, lesión estructural, resistencia al tratamiento y deterioro cognitivo.

1.3 Comorbilidades psiquiátricas asociadas a epilepsia y síndromes epilépticos

Independientemente del tipo de epilepsia, las comorbilidades psiquiátricas y otras enfermedades asociadas, son hasta ocho veces más comunes en personas con epilepsia que en la población general, lo cual depende de factores como la edad y/o el género (Keezer et al., 2016). Múltiples modelos pretenden explicar la presencia de condiciones cognitivas y psiquiátricas en epilepsia. Uno de ellos sugiere que la epilepsia o su tratamiento causan la condición comórbida. Contrario a ello, un modelo sugiere que la comorbilidad o su tratamiento causan la epilepsia. Un tercer modelo sugiere que un mecanismo subyacente compartido, ya sea biológico o medioambiental, media la ocurrencia de ambas condiciones (Seidenberg et al., 2009). Se ha encontrado que los pacientes con epilepsia tienen de 2 a 11 veces más probabilidad de presentar esquizofrenia que la población no epiléptica y que este fenómeno depende de la severidad de la epilepsia (Fruchter et al., 2014). Por otra parte, la depresión es la comorbilidad psiquiátrica más común en epilepsia y múltiples factores de riesgo, tales como el tratamiento con FAEs, características de las crisis y factores bioquímicos, se han relacionado con el desarrollo de la misma (Gaitatzis et al., 2004). Además, la presencia de depresión y epilepsia se han relacionado con el desarrollo de otras comorbilidades (Seidenberg et al., 2009). Los desórdenes de personalidad entre los pacientes epilépticos tienen una prevalencia del 18%, siendo el Trastorno Limítrofe de Personalidad (BPD) y el desorden bipolar (BD) los más comunes. El desarrollo de estos desórdenes de personalidad, parece ser consecuencia del tratamiento con AEDs, patologías de lóbulo temporal, así como antecedentes familiares (Swinkels et al., 2003, Sucksdorff et al., 2015).

1.4 Regulación génica en ELTM

En ELTM el desequilibrio en los sistemas de neurotransmisión está asociada a cambios en la expresión de algunos genes como GRIA2, que codifica para la subunidad GluR2 de los receptores a glutamato, y GABRD que codifica para la subunidad delta (δ) de los receptores GABA_A (McClelland et al., 2014).

1.4.1 GluR2

1.4.1.1 Estructura y regulación genómica

El gen GRIA2 codifica para la subunidad proteica GluR2 de los receptores α -amino-3-hidroxi-5-metilisoazolepropionato (AMPA) a glutamato. Dicho gen consta de 17 exones y 16 intrones, siendo los exones 11, 12 y 16 los que codifican para las regiones transmembranales M1-M4. Por otra parte, los exones 14 y 15 codifican segmentos alternativos *Flip-Flop*, mientras que las secuencias carboxilo terminales (-C) son codificadas en los exones 16 y 17 (Figura 1) (Kohler et al., 1994). Con respecto a la regulación transcripcional, un análisis *in vitro* demostró que el promotor proximal contiene un elemento regulatorio negativo (RE1, Represor Element 1) y una región regulatoria positiva (Sp1 y NRF-1)(Figura 1) (Myers et al., 1998). Además, miR-124 interactúa con el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de GluR2 y regula la traducción y su distribución en la sinapsis (Ho et al., 2014).

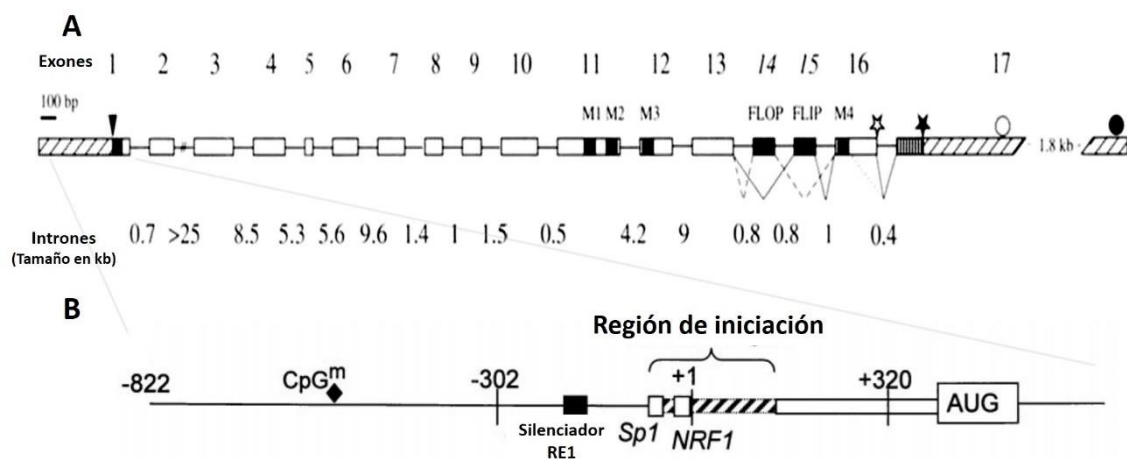


Figura 1. Estructura y regulación del gen GRIA2. **A)** Estructura del gen GRIA2 en la cual se muestran los 17 exones como recuadros y se señalan los tamaños de los 16 intrones en kilopares de bases. Las regiones no codificantes se muestran en ashurado. El inicio de la traducción está marcado por una punta de flecha. Las secuencias de codificación para las secuencias M1-M4 y flip-flop se indican mediante recuadros negros. Los codones de parada para los dos extremos -C están marcados por símbolos de estrella abiertos (extremo -C corto) y relleno (extremo -C largo). Los extremos 3' de los principales ARNm de GluR2 están indicados por un círculo abierto (ARNm de 4 kb) o lleno (ARNm de 6 kb). **B)** Regiones regulatorias del promotor proximal del gen GRIA2 en el cual se muestra el inicio de la transcripción a partir de +1. En las regiones adyacentes se localizan los sitios regulatorios positivos (Sp1 y NRF1) señaladas como recuadros. También se señalan el codón de inicio (AUG), el elemento regulatorio negativo RE1 como un recuadro negro y un rombo negro indica la presencia de islas CpG. Modificados de Kohler et al., 1994 y Myers et al., 1998.

Los AMPA son receptores ionotrópicos que se localizan principalmente en los sitios post-sinápticos de la sinapsis excitatoria (Bassani et al., 2009). Dichos receptores están formados por 4 subunidades (GluR1-4) de tamaño similar (900 aminoácidos) que forman complejos heterotetraméricos (Hollmann y Heinemann, 1994). En el hipocampo y la corteza adultos, la mayoría de los receptores de AMPA están conformados por las subunidades GluR1/GluR2 y GluR2/GluR3 (Craig et al., 1993). Sin embargo, GluR3 se expresa en menor proporción, por lo que más del 70% de GluR2 se asocia con GluR1 (Wentholt et al., 1996) y en algunos casos, como en hipocampo inmaduro y otras regiones cerebrales maduras, con GluR4 (Zhu et al., 2000).

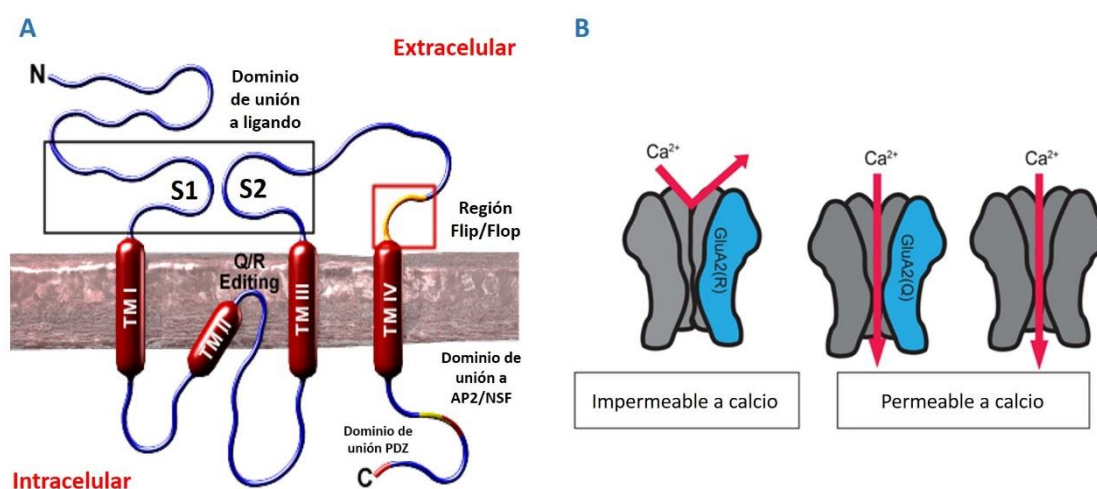


Figura 2. Estructura y función de la subunidad GluR2. A) Una típica subunidad GluR consiste de su dominio amino terminal (-N) extracelular, un dominio de unión a ligando (S1 y S2), tres dominios transmembranales (TM I, III y IV), un *loop* citoplasmático reentrante (TM II), un *cassete* de *splicing* alternativo *flip/flop* (recuadro rojo) y un extremo C-terminal intracelular con dominios de unión a proteínas y un dominio de unión a PDZ. B) En la subunidad GluR2, la permeabilidad a Ca²⁺ depende de la presencia de glutamina (Q) o arginina (R) en el sitio de edición Q/R. GluR2 (R) evita la entrada de Ca²⁺, mientras que GluR2 (Q) o la ausencia de GluR2 la favorecen. Tomado y modificado de Wright y Vissel, 2012 y de www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors/ampar/

Cada subunidad GluR tiene un dominio hidrofóbico en el extremo amino, en el cual se encuentran el péptido señal, tres dominios hidrofóbicos transmembranales (TM I, III y IV), un *loop* citoplasmático reentrante (TM II), un dominio de unión a ligando (formado en la región S1 y S2 extracelular), un cassette de splicing alternativo *flip/flop* (en el *loop* entre TM III y IV), un C-terminal (con sitios para interactuar con un gran número de proteínas como NSF, AP2) y un dominio PDZ terminal que se une a PICK1 y GRIP (Figura 2A). Los efectos de las interacciones proteína-proteína son cruciales en la

localización y el tráfico de estos receptores. (Hollmann y Heinemann, 1994, Bassani et al., 2009). El *cassette* de splicing *flip/flop* es un segmento de 35 aminoácidos que precede a M3 y que es responsable de que los receptores GluR se produzcan en una de dos formas moleculares (Sommer et al., 1990a). Las variantes *flip* tienen una alta expresión prenatal, la cual se mantiene durante el desarrollo postnatal y en el adulto, mientras que las variantes *flop* se incrementan durante el desarrollo cerebral y hasta la adultez (Monyer et al., 1991). La regulación de estas variantes influye en las propiedades farmacológicas y cinéticas de los receptores, ya que las variantes *flop* tienden a desensibilizarse mucho más rápido en respuesta a glutamato (Monyer et al., 1991, Sommer et al., 1990a).

1.4.1.2 Mecanismos funcionales

Los canales de los receptores AMPA nativos son impermeables al calcio, una función controlada por la subunidad GluR2 (Wright y Vissel, 2012). La permeabilidad al calcio de la subunidad GluR2 está determinada por la edición postranscripcional del ARNm de GluR2, que cambia un único aminoácido en la región TM II de glutamina (Q) a arginina (R). Este es el llamado sitio de edición Q/R. GluR2 (Q) es permeable al calcio, mientras que GluR2 (R) no lo es (Figura 2B) (Bowie y Mayer, 1995, Wright y Vissel, 2012). Casi toda la proteína GluR2 expresada en el Sistema Nervioso Central (SNC) está en la forma GluR2 (R), dando lugar a receptores de AMPA impermeables al calcio. Esto, junto con las interacciones con otras proteínas intracelulares, hace que GluR2 sea quizás la subunidad más importante del receptor AMPA.

En el hipocampo, la mayoría de los receptores AMPA son heterotetrámeros de GluR1-GluR2 o GluR2-GluR3 con una cantidad más pequeña de monómeros de GluR1 (Wenthold et al., 1996). Los receptores GluR2-GluR3 entran y salen de sinapsis continuamente, mientras que aquellos que carecen de GluR2 (como los monómeros GluR1) y los receptores GluR1-GluR2 participan en la regulación de la vía de transporte de receptores (Malinow y Malenka, 2002). Como ya se mencionó, los receptores AMPA con la subunidad GluR2 median la mayoría de las transmisiones sinápticas excitatorias rápidas en el SNC de los vertebrados y juegan un papel importante en muchas funciones cerebrales diferentes, como el aprendizaje y la memoria (Bassani et al., 2009). Sin embargo, también participan activamente en procesos patológicos que involucran muerte celular por excitotoxicidad.

1.4.1.3 Implicaciones en epilepsia

Si bien se ha encontrado una disminución en la expresión de GluR2 en hipocampo de ratas y una distribución alterada de los mismos en procesos naturales como el envejecimiento (Yu et al., 2011, Liu et al., 2008, Hof et al., 2002, Pandey et al., 2015), la expresión también se ve alterada en procesos patológicos asociados a excitotoxicidad. Como ya se mencionó, la impermeabilidad al Ca^{2+} por parte de la subunidad GluR2 es conferida por el residuo de arginina que reside en el poro. Dicho residuo es introducido por la adenosina deaminasa dependiente de ARN (ADAR) la cual es degradada en neuronas expuestas a niveles excitotóxicos de glutamato (Mahajan et al., 2011).

Se ha demostrado que, en isquemia transitoria inducida en cerebro de rata, la transcripción de GluR2 se reduce preferentemente en las neuronas de CA1 del hipocampo al tiempo que induce neurodegeneración (Pellegrini-Giampietro et al., 1992). Se ha demostrado también que en ratones transgénicos con una deficiente edición de la subunidad GluR2, hay una reducción del ARNm de dicha subunidad. Tal reducción se asocia con el incremento en las corrientes de Ca^{2+} en neuronas piramidales, lo cual hace a los animales son más susceptibles a las crisis convulsivas (Brusa et al., 1995). Por otra parte, se ha demostrado que, tras la inducción de estatus epiléptico (EE) en ratas, hay una disminución de ARNm y proteína GluR2 en hipocampo. Sin embargo, se muestra un incremento de GluR1, lo cual sugiere que la reducción de GluR2 induce la formación de receptores AMPA permeables a Ca^{2+} , haciendo que las neuronas piramidales sean más vulnerables a la inducción del EE (Friedman, 1998, Grooms et al., 2000, Pellegrini-Giampietro et al., 1997, Gorter et al., 1997, Friedman et al., 1994). Esta disminución en la expresión de GluR2 tras la inducción de EE, parece estar relacionado con la desacetilación de la histona 4 (H4) en el promotor del gen Gria2 (Huang et al., 2002).

En pacientes con ELT con HS se demostró por inmunohistoquímica que los niveles de GluR2 se reducen significativamente, sobre todo en aquellos subcampos con una pérdida sustancial de células neuronales (en particular CA1, CA4 y CA3), en comparación con hipocampo de autopsias (Blumcke et al., 1996). En otro estudio se demostró que a nivel proteico hay una disminución significativa de la subunidad GluR2 en hipocampo de pacientes con ELT comparado con autopsias y tejido hipocampal de primates no humanos. Dichos cambios no correlacionan con lo reportado a nivel de ARNm, en donde no se observaron cambios (Grigorenko et al., 1997)

La evidencia anterior sugiere que la disminución de la expresión de GluR2 puede desempeñar un papel en el daño excitotóxico inducido por glutamato.

1.4.2 GABA_A δ

1.4.2.1 Estructura y regulación genómica

El gen GABRD codifica para la subunidad proteica delta (δ) de los receptores tipo A para ácido γ -aminobutírico (GABA_A). La mayoría de los genes GABR constan de 9 exones codificantes, sin embargo, GABRD es una excepción. Dicho gen consta de 8 (isoforma 1b) o 9 (isoforma 1a) exones y 7 a 8 intrones respectivamente (Windpassinger et al., 2002, Simon et al., 2004). El primer exón en el extremo 5'-UTR no es codificante, el segundo consta de 526 pb que codifican para los 37 aminoácidos iniciales que incluyen al péptido señal y continua con otra secuencia de 39 aminoácidos. Los 7 exones siguientes codifican para las secciones transmembranales y los sitios de unión a ligando, mientras que el ultimo exón codifica para el C- terminal, incluyendo una señal de poliadenilación (Poly A)(Figura 3) (Simon et al., 2004). Con respecto a su regulación transcripcional, se ha demostrado que su promotor tiene predisposición a ser silenciado epigenéticamente por metilación, ya que contiene regiones ricas en islas CpG y deficiencia de cajas TATA y CCAAT canónicas (Sommer et al., 1990b). También se ha reportado un elemento repetido de bases púricas en la región 5' flanqueante al gen, el cual funge como sitio de unión para el Factor Específico de Cerebro (BSF1)(Motejlek et al., 1994). Además, a través de análisis *in vitro* e *in vivo*, se ha identificado un sitio regulatorio de unión para REST/NRSF, el cual está implicado en un débil silenciamiento (Schoenherr et al., 1996, Luscher et al., 1997)

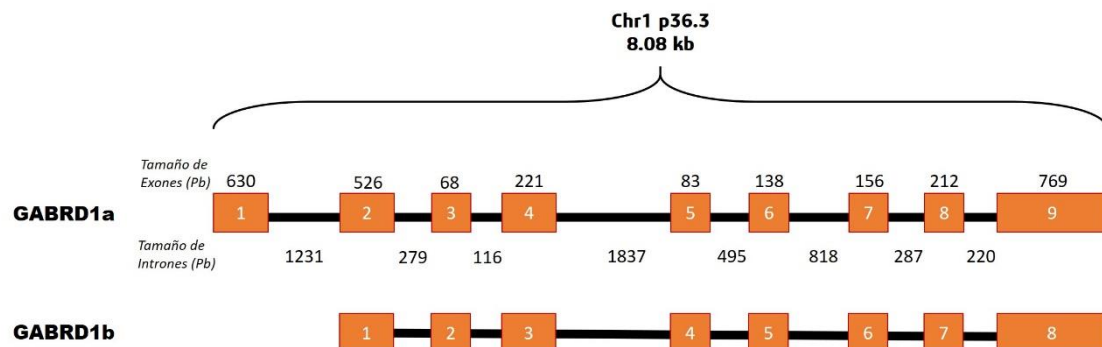


Figura 3. Estructura y regulación del gen GABRD humano. El gen GABRD está localizado en la banda p36.3 del cromosoma 1 y se han identificado dos subtipos. El subtipo 1a que consta de 9 exones (cajas) y 8 intrones (líneas continuas entre exones) y el subtipo 1b que consta de 8 exones y 7 intrones. Los tamaños de los exones e intrones se muestran en pares de bases (pb).

Los receptores GABA_A son canales de cloro acoplados a ligando ampliamente distribuidos en el SNC y que median la neurotransmisión postsináptica inhibitoria. Estos receptores están formados por la combinación pentamérica de al menos 19 diferentes subunidades GABAR (α 1—6, β 1—3, γ 1—3, δ , ϵ , π , θ y ρ 1—3) (Simon et al., 2004). Cada subunidad está compuesta de un largo N-terminal, cuatro segmentos transmembranales (TM 1-4), un largo *loop* intracelular entre TM 3 y 4 y un pequeño dominio C-terminal. El segmento TM 2 de cada una de las 5 subunidades es de vital importancia, ya que se alinean hacia el centro para formar el poro (Figura 4A) (Schofield et al., 1987, Benarroch, 2007). De acuerdo con el prototipo de funcionamiento del receptor, dos moléculas de GABA se unen al dominio de unión a ligando formado por las subunidades α y β , lo cual favorece la apertura del poro y produce corrientes de cloro a través de la membrana (Figura 4B) (Benarroch, 2007). Debido a lo anterior, la expresión de las subunidades α y β es suficiente para producir receptores funcionales, sin embargo, la conformación pentamérica es necesaria para modular la cinética del receptor y para su regulación farmacológica.

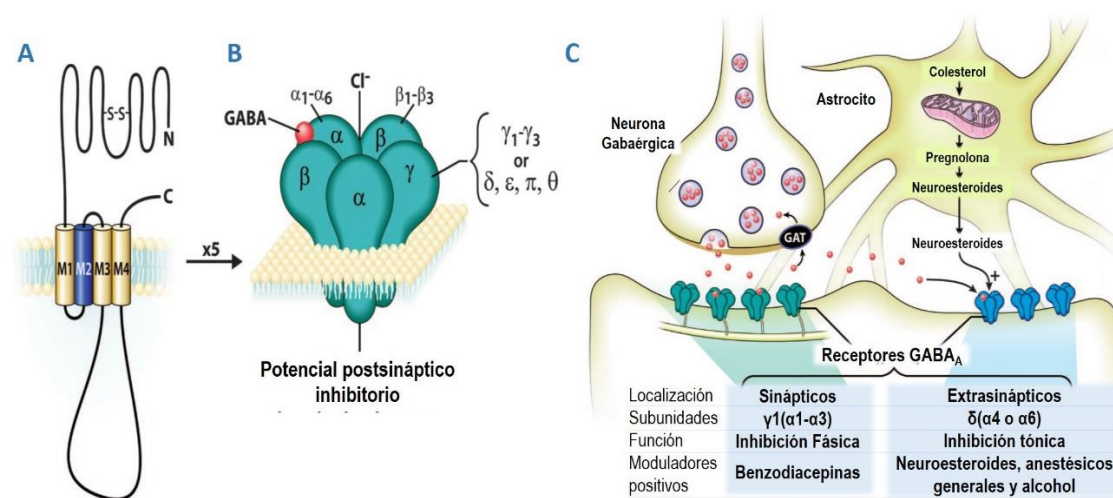


Figura 4. Estructura y función de los receptores GABA_A. **A)** Los receptores GABA_A poseen cuatro dominios transmembranales M1-M4. El dominio M2 posee cargas positivas que hace que se orienten hacia el centro para formar el poro. Los extremos carboxilo (corto) y amino (largo) orientados hacia el citoplasma. **B)** Los receptores GABA_A tienen una composición pentamérica y la mayoría poseen dos subunidades α , dos β y una γ . Esta última puede ser remplazada por las subunidades δ , ϵ , θ y π y dependiendo de la combinación se modifican la cinética y su sensibilidad a GABA. **C)** Las corrientes de Cl⁻ que pasan a través de los receptores GABA_A pueden ser de dos tipos, fásica y tónica. La corriente fásica depende de los receptores localizados en la sinapsis (subunidad γ 2) los cuales son sensibles a benzodiazepinas, mientras que la corriente tónica depende de los receptores localizados extrasinápticamente (subunidad δ), los cuales son modulados por neuroesteroides y anestésicos. Tomado y modificado de Benarroch, 2007.

La mayoría de los receptores GABA_A nativos están compuestos de dos subunidades α , dos β y una γ , sin embargo, hay una amplia variabilidad de ellos que incluyen a las subunidades δ , ϵ , θ y ρ . (Figura 4B). De hecho, en la conformación de los receptores GABA_A, las subunidades δ , ϵ y π parecen ser capaces de remplazar a la subunidad γ y la subunidad θ de remplazar a la subunidad β (Sieghart et al., 1999). Las diferentes combinaciones dan a lugar a receptores con variaciones en su sensibilidad a GABA, su cinética y en su modulación por ligandos (Sieghart, 1995). Por otra parte, los receptores GABA_A generan dos formas prominentes de corriente: la fásica y la tónica. La corriente fásica depende de los receptores sinápticos y es rápidamente desensibilizada, mientras que la corriente tónica depende de los receptores extrasinápticos y es no desensibilizante (Figura 4C) (Whissell et al., 2015). En hipocampo, dichas corrientes tónicas dependientes de receptores extrasinápticos contienen a las subunidades δ o α -5 (Glykys et al., 2008). Estas subunidades poseen características particulares en su *loop* citoplasmático, lo que favorece su localización extrasináptica (Arslan et al., 2014).

1.4.2.2 Mecanismos funcionales

La subunidad δ de los receptores GABA_A (GABA_{A δ}) generalmente se asocia a las subunidades α 1, α 4, α 6, β 2 o β 3, de manera que al momento se han identificado tres diferentes subtipos de receptores GABA_{A δ} . El receptor α 1 β δ que se expresa en interneuronas de varias regiones cerebrales incluyendo hipocampo y amígdala, el α 4 β δ expresado en proyecciones neuronales de hipocampo y tálamo, y el α 6 β δ expresado en células granulares cerebelares (Figura 4C) (Whissell et al., 2015, Brickley y Mody, 2012).

Además de su localización extrasináptica, los receptores GABA_{A δ} tienen propiedades que los hacen particularmente importantes para el SNC. I) Generan una corriente tónica persistente que afecta la excitabilidad neuronal. II) Están implicados en la regulación conductual incluyendo memoria, ansiedad y nocicepción, lo cual los coloca como blancos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas. III) Muestran gran dinamismo para cambiar de acuerdo a diferentes condiciones fisiológicas o patológicas. Lo anterior tiene implicaciones en la regulación del comportamiento y en la sensibilidad de las redes neuronales a los fármacos y a compuestos dirigidos a los receptores GABA_A (Whissell et al., 2015, Olsen y Sieghart, 2009). Los GABA_{A δ} son receptores no sinápticos de alta afinidad y eficacia, con una alta sensibilidad a los neuroesteroides y anestésicos (Figura 4C) (Benarroch, 2007)

La regulación de la excitabilidad neuronal por parte de los receptores GABA_{Aδ} es bidireccional, ya que restringe o aumenta la excitabilidad según el gradiente de concentración de iones cloro (Cl⁻) (Ben-Ari et al., 2012). Esta regulación depende de tres factores: su alta sensibilidad a GABA, su baja cinética de desensibilización (Wlodarczyk et al., 2013) y su tendencia a la apertura espontánea en ausencia de GABA y otros ligandos endógenos (Tang et al., 2010, Wlodarczyk et al., 2013). Se ha observado que en neuronas maduras y sanas con una baja concentración intracelular de Cl⁻, la apertura del canal del receptor GABA_{Aδ} disminuye la excitabilidad al permitir la entrada de iones Cl⁻ cargados negativamente, favoreciendo la hiperpolarización de la membrana y la reducción en la resistencia de entrada ("shunting inhibition"). En contraste con su efecto inhibitorio en neuronas maduras sanas, los receptores GABA_{Aδ} pueden incrementar la excitabilidad en neuronas maduras dañadas, neuronas inmaduras y otras células con una alta concentración intracelular de Cl⁻. En estas células, el potencial de inversión de Cl⁻ es significativamente positivo en relación con el potencial de membrana en reposo. En consecuencia, la apertura del canal provoca el flujo de Cl⁻ y la despolarización de la membrana, lo que puede aumentar la excitabilidad (Whissell et al., 2015).

1.4.2.3 Implicaciones en epilepsia

Las alteraciones en la función extrasináptica de los receptores GABA_{Aδ} están implicados en varias formas de epilepsia. En estado normal, no patológico, los receptores GABA_{Aδ} muestran una alta expresión en giro dentado, subcampos del hipocampo, en el tálamo, corteza y cerebelo, así como bajos niveles en amígdala, hipotálamo, ganglios basales, tallo cerebral y médula espinal (Whissell et al., 2015). Específicamente, los receptores GABA_{Aδ} se localizan en la capa molecular y granular del giro dentado, en células de canasta con forma piramidal del hilus y en interneuronas de CA3 del hipocampo. En menor medida, también se ha observado su expresión en el estrato radiatum y oriens de CA1 del hipocampo y en la capa de células piramidales de CA1 y CA3. (Sperk et al., 1997, Tsunashima et al., 1997). Sin embargo, se ha demostrado que tras la inducción de crisis convulsivas con ácido kainico (AK), GABA_{Aδ} se expresa en astrocitos y disminuye su expresión en la capa molecular del giro dentado y en CA1 del hipocampo (Schwarzer et al., 1997, Tsunashima et al., 1997).

Los estudios en diversos modelos animales de epilepsia, EE y crisis convulsivas son controversiales. En varios estudios se ha demostrado una reducción en los niveles de ARNm y proteína de GABA_{Aδ} hipocampal (Houser et al., 2012, Nishimura et al., 2005,

Peng et al., 2002, Zhang et al., 2007, Schwarzer et al., 1997, Brown et al., 2002). Lo anterior correlaciona con la disminución del incremento en las corrientes tónicas, lo cual evoca la respuesta epileptiforme y altera la respuesta de las corrientes gabaérgicas a una gran variedad de neuromoduladores (Mchedlishvili et al., 2001, Qi et al., 2006, Rajasekaran et al., 2007, Rajasekaran et al., 2009). Sin embargo, hay estudios que reportan un incremento en la expresión de ARNm y proteína GABA_{Aδ} (Brooks-Kayal et al., 1998, Kharlamov et al., 2011, Scimemi et al., 2005), así como un incremento en las corrientes tónicas (Scimemi et al., 2005). Con base en estas evidencias, se han generado dos hipótesis respecto a la función de GABA_{Aδ}. La primera hipotetiza que la disminución en la actividad del receptor contribuye al desarrollo de epilepsia, ya que favorece la excitabilidad y la ocurrencia de crisis epilépticas secundarias a la pérdida de inhibición neuronal (Spigelman et al., 2002, Stell et al., 2003). La segunda hipótesis plantea que la reducción en la actividad del receptor es consecuencia (y no causa) de la epilepsia y del incremento de la excitabilidad (Joshi y Kapur, 2013).

Considerando la expresión de los GABA_{Aδ} en las regiones talamocorticales y el papel que dicha región juega en el desarrollo de las crisis de ausencia, se ha reportado el incremento de la inhibición tónica dependiente de la activación de los receptores extrasinápticos en un modelo genético para este tipo de epilepsia (Cope et al., 2009). Debido a la alta sensibilidad de los receptores GABA_{Aδ} a los neuroesteroides, se cree que puede haber cambios en la excitabilidad neuronal asociados al ciclo menstrual. Con base en lo anterior, la inhibición tónica puede verse afectada durante el ciclo ovárico por las fluctuaciones en los niveles de los derivados de la progesterona. Se ha demostrado en ratones que, durante la fase de alta progesterona correspondiente a la fase lútea en las mujeres, hay mayor expresión de los receptores GABA_{Aδ}, asociada con el incremento en la inhibición tónica en las neuronas del hipocampo y una menor susceptibilidad a las crisis convulsivas (Maguire et al., 2005).

Por otra parte, las mutaciones en el gen GABRD se han asociado con el desarrollo de epilepsias como la epilepsia mioclónica juvenil (Delgado-Escueta et al., 2013). Las variantes E177A y R220H están relacionadas con epilepsia generalizada idiopática (Feng et al., 2006) y la variante rara E177A se ha relacionado con epilepsias generalizadas debidas a crisis febriles (Dibbens et al., 2004)

1.5 Regulación transcripcional mediada por REST/NRSF

Como se ha descrito anteriormente, los genes GRIA2 y GABRD poseen sitios RE1 en sus promotores. Es decir, pueden ser regulados por el factor de transcripción REST/NRSF (*RE1 silencing transcription factor/Neuron-restrictive silencer factor*, por sus siglas en inglés). REST/NRSF es un factor de transcripción codificado por el gen *REST*, el cual consta de 5 intrones y 6 exones (Figura 5A) y que puede ser regulado por diversos factores de transcripción como CREB o por metilación de islas CpG en su promotor (Kreisler et al., 2010). Para llevar a cabo su función represora, este factor represor se une a su secuencia consenso en el ADN, la cual es conocida como sitio NRSE o RE1 (*Neuron Restrictive Silencing Element o Repressor Element 1*, por sus siglas en inglés). Los sitios RE1 constan de aproximadamente 21 nucleótidos cuya secuencia canónica es TTCAGCACCNNGGACAGNGCC. La unión del factor de transcripción se lleva a cabo gracias al dominio de unión al ADN que consiste de 8 dedos de zinc (Figura 5B) (Roopra et al., 2001). Una vez que dicho factor se une a su secuencia consenso, actúa reclutando cofactores represores, desacetilasas de histonas (HDACs) y metiltransferasas de histonas (HMT), para causar remodelamiento de la arquitectura de la cromatina alrededor de sus genes blanco (Figura 5C) (Garriga-Canut et al., 2006, Mulligan et al., 2008, McClelland et al., 2011)

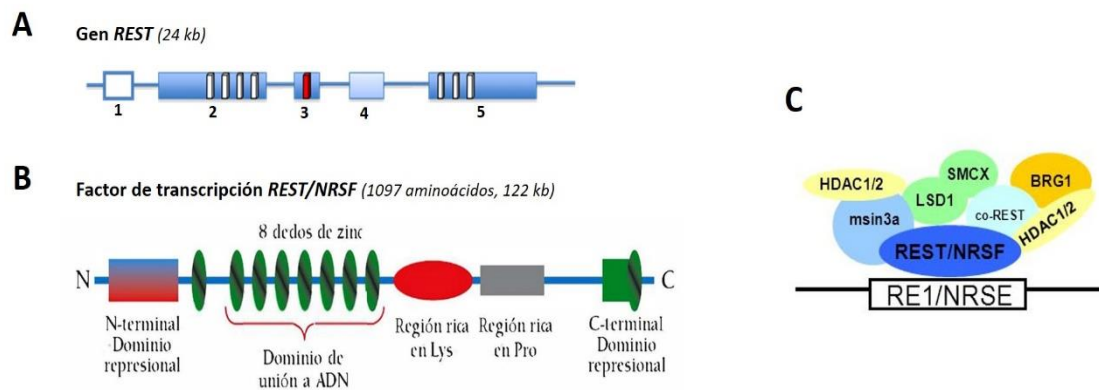


Figura 5. Función y estructura génica y proteica de REST/NRSF. **A)** El gen *REST* tiene un tamaño de 24 kb y consta de 5 intrones y 6 exones. Los intrones 1, 3 y 4 codifican para los 8 dedos de zinc que conforman el dominio de unión al ADN. **B)** La proteína *REST/NRSF* pesa 122 kDa y consta de su dominio de unión al ADN y dos dominios represores localizados en sus extremos -N y -C terminales. **C)** Una vez que localiza su secuencia consenso y se une de manera específica, *REST/NRSF* recluta cofactores represores y factores epigenéticos que van a inducir el remodelamiento de la cromatina para mantenerla silente. Tomado y modificado de (Roopra et al., 2012), McClelland et al., 2011 y http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_REST.html

En modelos experimentales se ha demostrado que REST/NRSF está fuertemente inducido en las neuronas granulares del giro dentado y en neuronas piramidales hipocampales después del EE inducido con AK (Palm et al., 1998). Además, Roopra en el 2001 demostró que en los más de 1300 genes blanco de REST/NRSF, se incluyen muchos genes conocidos por estar involucrados en la excitabilidad neuronal, tales como GABRA1, GABRB3, GABRD y GRIA2 (Roopra et al., 2001). Mas recientemente se ha demostrado que también reprime el gen que codifica para canales de cationes acoplados a nucleótidos cíclicos de tipo 1 (HCN1)(McClelland et al., 2011). Debido a ello se ha estudiado el papel de REST/NRSF en una gran variedad de procesos epilépticos, demostrando que la inhibición de REST/NRSF disminuye el número de convulsiones espontáneas (Garriga-Canut et al., 2006).

2 Justificación

El factor de transcripción REST/NRSF actúa como un represor transcripcional de genes neuronales cuando se une a su secuencia consenso (sitio RE1) en el ADN. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los genes GRIA2 y GABRD tienen sitios RE1 en sus regiones promotoras. Además, se sabe que la expresión de dicho factor se incrementa como consecuencia de las crisis convulsivas en modelos experimentales. Sin embargo, a la fecha no se ha evaluado la expresión de REST/NRSF, su asociación con las variables clínicas y psiquiátricas, ni su participación sobre la regulación transcripcional de los genes que codifican para GluR2 y GABA_{Aδ} en pacientes con ELTM farmacorresistente.

3 Hipótesis

El factor de transcripción REST/NRSF se sobreexpresa en hipocampo de pacientes con ELTM farmacorresistente y se une a los elementos RE1 de los genes GRIA2 y GABRD participando en su represión transcripcional.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar los niveles de expresión de REST/NRSF y su participación en la regulación transcripcional de los genes que codifican para GluR2 y GABA_{Aδ} en pacientes con ELTM farmacorresistente, así como su asociación con las variables clínicas y psiquiátricas.

4.2 Objetivos Particulares

- Evaluar los niveles de ARNm y proteína de REST/NRSF en hipocampo de autopsias y de pacientes con ELTM farmacorresistente.
- Determinar la asociación entre los niveles de ARNm y proteína de REST/NRSF de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM farmacorresistente y las variables clínicas y psiquiátricas.
- Determinar la unión de REST/NRSF a las secuencias RE1 en los promotores de los genes GRIA2 y GABRD en hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM farmacorresistente.
- Evaluar y correlacionar los niveles de ARNm y proteína de GluR2 y GABA_{Aδ} con la expresión de REST/NRSF de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM farmacorresistente y con las variables clínicas y psiquiátricas.

5 Materiales y métodos

5.1 Estandarización de la Reacción en Cadena de Polimerasa cuantitativa (qPCR)

La expresión génica es un mecanismo que controla la función y adaptabilidad de las células procariotas y eucariotas. Existen varias técnicas que permiten evaluar dicho mecanismo. Actualmente, la PCR en tiempo real (qPCR), precedida de retrotranscripción, es la técnica disponible con mayor sensibilidad para analizar y cuantificar el ARNm. Dentro de los métodos de qPCR basados en fluorescencia, se encuentran los que utilizan SYBR Green, pero son menos específicos que aquellas que emplean sondas de hibridación (TaqMan). Las sondas TaqMan están diseñadas para incrementar la especificidad de la qPCR. Dicha especificidad se debe a la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq Polimerasa, la cual hidroliza fluorocromos acoplados a una sonda conforme se va sintetizando la secuencia complementaria a la cadena molde. Así, la emisión de fluorescencia es una medida cuantitativa de los productos de amplificación.

5.1.1 Diseño de cebadores y sondas para sistema TaqMan con IDT

Con base en lo anterior, se estandarizó un sistema de qPCR con sondas TaqMan para detectar, en pacientes y autopsias, los niveles de expresión los genes REST/NRSF, GRIA2 y GABRD relativos al gen endógeno Enolasa 2 (ENO2) en un rango específico de concentración asociada a los ciclos de amplificación. A continuación, se describe el proceso de diseño de cebadores y sondas TaqMan para qPCR para REST/NRSF, GRIA2, GABRD y ENO2.

Se obtuvieron las secuencias genómicas para cada gen, es decir, las secuencias de la región del cromosoma donde se localiza el gen de interés (NC en NCBI) y las secuencias codificantes de los genes, es decir, el ARNm (NM en NCBI).

ENO2	NC_000012.12 (6914450-6923696)	NM_001975.2
REST/NRSF	NC_000004.12 (56907876-56935847)	NM_001193508.1
GRIA2	NC_000004.12 (157220584-157370583)	NM_000826.3
GABRD	NC_000001.11 (2019329-2030753)	NM_000815.4

Las secuencias intrónicas y exónicas de cada gen se localizaron de forma manual determinando las concordancias entre la secuencia codificante y diferentes regiones genómicas. Una vez marcadas las secuencias exónicas, se eligieron al azar secuencias que involucran dos o más exones y sobre estas secuencias se realizó el diseño de cebadores, ya que al utilizar dos o más regiones aseguramos cierto grado de especificidad de los cebadores/sondas.

Una vez determinadas las secuencias, se utilizó la herramienta PrimerQuest Tool de IDT para el diseño de cebadores y sondas. Los amplicones abarcaron más de un exón y su longitud fue menor a 200 nt, para evitar inespecificidad en el apareamiento de bases. Se seleccionaron un par de cebadores candidatos a los cuales se les realizó el análisis de propiedades utilizando la herramienta OligoAnalyzer Tool de IDT con los siguientes parámetros: concentración de MgCl₂ ≈2.5-3.0 mM y de dNTPs ≈0.8mM. Nos aseguramos de que el porcentaje de guaninas y citosinas fuese mayor del 50% y que la Primer Melting Temperature (T_m) fuese similar entre cebadores, pero aproximadamente 5° C más para la sonda.

Se determinó la posible formación de estructuras secundarias (hairpins, homo y heterodímeros) asegurando que el ΔG de los hairpins y de los homo y heterodímeros fuera menor del 10% de la ΔG max. Se precisó que los cebadores presentaran un máximo de 3 enlaces formados entre las estructuras secundarias para evitar apareamiento inespecífico y aumentar la probabilidad de apareamiento con la secuencia genómica. Los cebadores y sondas seleccionadas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Características de los cebadores y sondas para REST/NRSF, GRIA2, GABRD y ENO2.

Gen	Cebadores/Sondas	nt	T _m (°C)
REST/NRSF	Fw: 5'-GCATCAGGTGCTCCAGATATT-3'	21	62
	Rv: 3'-GCTTCATATTGGCATGGCTTAC-5'	22	
	Snd: 3'-TTTGTCCCTCCGCTCCAGGTGTTTC-5'	24	
ENO2	Fw: 5'- CAGGACTTTGTCAGGGACTATC-3'	22	62
	Rv: 3'- CCCTACATTGGCTGTGAACT-5'	20	
	Snd: 3'- CCATTGAGGACCCATTTGACCAGGA-5'	24	
GRIA2	Fw: 5'-CACCTCTGGGCTTGAGAATAAG-3'	22	62
	Rv: 3'-GTCAACACAGTAGCCCTCATAG-5'	22	
	Snd: 3'-ATGAAATGCTTGAAGGCAATGAGCG-5'	25	
GABRD	Fw: 5'-ATGTCCTGGGTCTCCTTCT-3'	19	62
	Rv: 3'-ATGAGCGTGGTCATCGTC-5'	18	
	Snd: 3'-ACCGTGGTGATGCCTAGAGACAC-5'	23	

Fw, Cebador Forward; **Rv**, Cebador Reverse; **Snd**, Sonda; **nt**, nucleótidos; **T_m**, Primer Melting Temperature.

5.1.2 Diseño de gBlocks para sistema TaqMan con IDT

Los gBlock son secuencias verificadas de doble cadena de bloques genómicos diseñados ad hoc que se insertan en vectores para la transformación y recombinación bacteriana. Se utilizan para la estandarización de qPCR, edición de genomas e investigación de anticuerpos.

Se realizó el diseño de un gBlock global que además de incluir los amplicones de REST/NRSF y ENO2, incluyó también las secuencias de amplificación para los genes blanco GRIA2 y GABRD. El procedimiento de diseño es el siguiente:

Previamente se realizó el análisis de los cebadores y su respectiva sonda, con lo cual se *predijo* el largo de cada amplicón (ENO2: 200nt, REST: 185nt, GRIA2: 200 nt, GABRD: 180 nt). Cada amplicón puede constituir un gBlock, sin embargo, se puede construir un gBlock global con varios amplicones separados por medio de 5 timinas (TTTTT). El gBlock global obtenido se muestra en la figura 6.

CTGATCCTCCCGATAACATCACTGGGGACCAGCTGGGGGCACTCTACCA	
GGACTTTGTCCAGGGACTATCCTGTGGTCTCCATTGAGGACCCATTTGAC	
CAGGATGATTGGGCTGCCCTGGTCCAAGTTCACAGCCAATGTAGGGATCC	ENO2
AGATTGTGGGTGATGACCTGACAGTGACCAACCCAAAACGTATTGAGCG	
GGCATTTTTTAGAACCTCAGCCTGTATTTGAGGCATCAGGTGCTCCAGAT	
ATTTACAGTTCAAATAAAGATCTTCCCCCTGAAACACCTGGAGCGGAGG	REST
ACAAAGGCAAGAGCTCGAAGACCAAACCTTTTCGCTGTAAGCCATGCCA	
ATATGAAGCAGAATCTGAAGAACAGTTTGTGCATCACATCAGAGTTTTTT	
TAATCCTACATGCCCTCCGTCCTGTGGTCCGCATGTCTGGGTCTCCTT	
CTGGATCAGCCAGGCGGCGGTGCCCAGGGTGTCTCTAGGCATCAC	GABRD
CACGGTGCTGACGATGACCACGCTCATGGTCAGTGCCCGCTCCTCCCTG	
CCACGGGCATCAGCCATCAAGGCACTGGACGTCTTTTTTTGGACAAAAT	
GGTTGTTACCCCTACTGAGCTCCCTTCTGGAAATGACACCTCTGGGCTT	
GAGAATAAGACTGTTGTTGTCACCACAATTTTGAATCTCCGTATGTTAT	GRIA2
GATGAAGAAAAATCATGAAATGCTTGAAGGCAATGAGCGCTATGAGGC	
TACTGTGTGACCTGGCTGCAGAAATCGCCAAACATTGTGGGTTTTTCT	
TACTTTGGAGAGATTTGCCTGCTGACCAAAGGACGTCGTAAGTCCAGTG	
TTCGAGCTGATACATATTGTCGTCTTACTCACTTCCGTGGACAATTC	
AACGAGGTCCTGGAGGAATATCCAATGATGAGGAGAGCCTTTGAGACAG	
TTGCCATTGACCGACTAGATCGAATAGGAAAGAAAAATTCAATTCTTCTG	

Figura 6. Fragmento gBlock global. Secuencia del gBlock utilizado para la transfección y transformación de bacterias E. coli DH5 α .

5.1.3 Obtención de curvas de calibración

Para estandarizar la qPCR se realizaron las curvas de calibración para ENO2, REST/NRSF, GRIA2 y GABRD. Dichas curvas fueron realizadas evaluando la expresión de los gBlocks en sistemas de expresión bacterianos, utilizando la cepa E. coli, DH5 α quimiocompetente. Dicha quimiocompetencia se obtuvo de la siguiente forma:

5.1.3.1 Preparación de células químicas competentes

Partiendo de un cultivo bacteriano de *E. coli* DH5 α en agar LB, se tomó una colonia bacteriana, se inoculó en 5 mL de medio SOB suplementado con MgSO₄ y MgCl₂ (a una concentración final de 10 mM c/u) y se dejó incubar a 37°C en agitación durante 16 h. Posteriormente se realizó una dilución 1:100 del medio *overnight* con medio SOB fresco (500 μ L en 50 mL) y se incubó a 37°C en agitación hasta el medio de cultivo tuvo una densidad óptica de 0.5 a 600 nm como consecuencia de la proliferación bacteriana. Tras obtener dicha característica, los cultivos se dejaron enfriar en hielo por 15 min y se cosecharon las células por centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos (min) a 4 °C. Se desechó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 16 mL de Suero Fetal Bovino (SFB), y se incubaron en hielo durante 15 min. Las células se cosecharon por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron nuevamente en 4 mL de SFB. Se agregaron 140 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para una concentración final de 3.5% (v/v), se agitó e incubó 5 min en hielo. Una segunda alícuota de DMSO se agregó con el mismo volumen para obtener una concentración final de 7% (v/v) y se incubó en hielo por 15 min. Las bacterias se alicuotaron en volúmenes de ~200 μ l en tubos previamente enfriados, y se congelaron inmediatamente utilizando hielo seco. Las bacterias se almacenaron a -70 °C hasta su utilización. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad.

5.1.3.2 Transformación de células quimiocompetentes

Una vez obtenidas las bacterias quimiocompetentes se realizó la transformación utilizando el vector pJET1.2/blunt del CloneJET PCR Cloning Kit (#K1231 Thermo Scientific). La transformación se realizó con el procedimiento determinado para extremos romos de la siguiente forma:

Se preparó la mezcla de ligación que contenía 10 μ L de buffer de reacción 2X, 1 μ L de gBlock, 1 μ L de plásmido pJET1.2/blunt, 1 μ de DNA ligasa T4 y cuanto baste para (cbp) 20 μ L de agua libre de nucleasas. Se mezcló con vortex, y se incubó a temperatura ambiente por 5 min.

Se tomaron 200 μ L de la solución que contenía bacterias quimiocompetentes y se le adicionaron 5 μ L de mezcla de ligación. Dicha suspensión se incubó en hielo por 30 min, posteriormente a 37 °C por 5 min y finalmente en hielo durante 2 min. Una vez transcurrido el choque de temperaturas, se adicionó 1 mL de medio LB previamente

calentado a 37°C y se incubó a 37 °C por 1 h en agitación. Se cosecharon las células por centrifugación a 12000 rpm por 2 min y se retiró el sobrenadante dejando un remanente de aproximadamente 100 µl. Las células se resuspendieron en dicho remanente, se sembraron en agar LB con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C.

5.1.3.3 PCR de colonias (Colony PCR)

Para evaluar la transformación de las bacterias recombinantes se debe corroborar que estas expresen la resistencia al antibiótico (ampicilina) y que el fragmento gBlock se haya insertado en el plásmido. Para ésto, se realizó el análisis de las clonas recombinantes de la siguiente forma:

Se preparó el mix PCR para mezcla de reacción de 20 µL conteniendo lo siguiente:

- Buffer Taq 10X – 2 µL
- dNTPs 2 mM – 2 µL
- MgCl₂ 25 mM – 1.2 µL
- Cebador Forward pJET 1.2 10 mM – 0.4 µL
- Cebador Reverse pJET 1.2 10 mM – 0.4 µL
- Agua libre de nucleasas – 13.9 µL
- Taq DNA polimerasa 5u/µL – 0.1 µL

Con un asa estéril se picaron diversas colonias y se resuspendieron en 20 µL de Mix PCR (cada una de manera individual). De dicha suspensión se realizó la PCR de 25 ciclos utilizando el siguiente programa de amplificación:

1. 95°C por 3 min
2. 94 ° C por 30 s
3. 60 °C por 30 s
4. 72 °C por 1 min

Se determinó la presencia de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%. Una vez determinada la colonia recombinante, se resembró para expandir la clona y obtener más producto.

5.1.3.4 Curvas de calibración

Las curvas de calibración se obtuvieron una vez expandida la colonia transformada y con el gBlock insertado. REST/NRSF, GRIA2, GABRD y ENO2 se

amplificaron por qPCR a través del sistema LyghtCycler TaqMan Master (Roche) que se realizó en un equipo LyghtCycler 2.0 (Roche) de 6 canales siguiendo el siguiente procedimiento:

Se realizaron diluciones a concentraciones conocidas de plásmido, que van desde los 30 ng/μL hasta los 3fg/μL y se preparó el Master Mix LightCycler para REST/NRSF, GRIA2, GABRD y para ENO2 conteniendo lo siguiente:

- a. Agua grado biología molecular – 6 μL
- b. Sonda/cebador 10X – 1 μL
- c. Master Mix 5X – 2 μL

Cada reacción de qPCR se realizó en capilares LyghtCycler en los cuales se adicionó 1 μL de la respectiva dilución de plásmido y 9 μL de Master Mix LightCycler. Los capilares con la mezcla de reacción se centrifugaron a 900 rpm por 30 s y se colocaron en el carrusel del equipo LyghtCycler 2.0. El programa de amplificación tuvo las siguientes especificaciones (Tabla 3):

Tabla 3. Programa de amplificación por qPCR en sistema LightCycler 2.0

Modo de análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura	Tiempo	Modo de adquisición
Preincubación					
Ninguno	1		95°C	10 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	45	Desnaturalización	95	10 s	Ninguno
		Anillamiento	62	30 s	Ninguno
		Extensión	72	1 s	Simple
Enfriamiento					
Ninguno	1		37	30 s	Ninguno

Una vez terminada la amplificación, se obtuvo el valor de CP (*cross point*) que indica la cantidad inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN. Se graficaron los valores de CP contra la concentración de plásmido y se obtuvieron los valores de la ecuación de la recta que fueron utilizados para la normalización de los valores obtenidos tras la amplificación del ADN complementario (ADNc) de las muestras de pacientes y autopsias. Las amplificaciones se realizaron por triplicado.

5.2 Obtención de tejido hipocampal de autopsias

Las muestras de hipocampo de autopsias fueron obtenidas a del Servicio Médico Forense (SEMEFO) a través de un acuerdo de colaboración asentado en el acta

SP/INV/004/2013 (ANEXO 1). Las variables demográficas de 13 autopsias utilizadas para este estudio se presentan en la tabla 4.

5.2.1.1 Criterios de inclusión

- Tejido proveniente de sujetos cuya causa de muerte no esté relacionada con enfermedades neurológicas.
- Que el tejido haya sido retirado e inmediatamente congelado a -80°C en menos de 20 h (intervalo post-mortem <20 h)
- Masculinos y femeninos sin considerar intervalo de edad específico.

5.2.1.2 Criterios de exclusión

- Tejidos que provengan de sujetos con muerte relacionada a algún evento cerebral traumático.
- Tejidos cuyo Intervalo Post-Mortem (IPM) y periodo de preservación sea mayor a 20 h.

Tabla 4. Datos demográficos de las autopsias

Sujeto	Género	Edad	Causa de la muerte	Intervalo Post-Mortem (h)
A1	M	57	Infarto de miocardio	18
A2	M	40	Proyectil de arma de fuego	13
A3	F	45	Desconocido	10
A4	F	17	Asfixia	18
A5	M	16	Asfixia	18
A6	F	40	Proyectil de arma de fuego	20
A7	M	37	Infarto de miocardio	ND
A8	M	32	Proyectil de arma de fuego	12
A9	M	30	Proyectil de arma de fuego	13
A10	F	31	Asfixia	17
A11	M	34	Traumatismo torácico	15
A12	F	28	Diabetes	15
A13	F	42	Asfixia	18
M:7		34.5 ± 3.2	15.58 ± 0.88	
F:6				

F, femenino; M, masculino; ND, No Determinado (dato excluido). En la parte inferior de la tabla se muestran promedios \pm Error Estándar de la Media.

5.3 Obtención de tejido hipocampal de pacientes con ELTM farmacorresistente

Las muestras de tejido hipocampal fueron obtenidas de 28 pacientes diagnosticados con ELTM farmacorresistente sometidos a lobectomía temporal entre 2014 y 2017, según el protocolo establecido por el programa de cirugía de epilepsia del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y aprobado por el Instituto Mexicano del Seguro Social en el proyecto R-2017-785-100 (Anexo 1) Las características clínicas de los pacientes se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Datos clínicos de los pacientes con ELTM

Px	Género	Edad (años)	Edad inicio de las crisis (años)	Duración de la epilepsia (años)	Frecuencia de crisis (por mes)	Lado del foco	#FAEs pre-cirugía	Psi.
200	M	42	19	23	30	I	4	Dep/A
206	M	25	3	22	5	D	4	NP
239	M	38	10	28	3	I	3	Dep
240	F	29	25	4	60	D	5	Dep
241	M	40	10	40	4	D	10	Dep/A
242	F	27	8	19	5	D	4	A
243	F	33	28	5	8	I	3	Dep/A
244	F	31	12	19	7	D	5	Dep
271	M	37	1	36	6	I	1	NP
275	F	23	13	10	1	I	2	NP
281	M	ND	ND	ND	ND	D	ND	NP
282	M	37	9	28	2	D	3	Dep/A
316	F	30	28	2	4	D	1	NP
324	F	35	2	33	4	I	ND	NP
326	F	38	15	23	50	I	2	A
329	M	40	42	8	8	D	2	NP
339	M	47	12	35	4	I	7	Dep
345	M	17	9	8	30	I	5	NP
359	M	33	27	6	30	D	5	NP
367	F	22	12	10	4	I	5	NP
369	F	28	10	18	15	D	7	NP
371	F	37	3	34	10	I	5	NP
386	M	32	ND	ND	ND	I	ND	NP
408	F	ND	ND	ND	ND	D	ND	NP
413	M	31	9	21	7	I	8	A
417	M	38	8	30	4	I	3	Dep
420	M	28	5	23	30	D	7	Dep/A
424	F	ND	ND	ND	ND	D	ND	NP
	M:15 F:13	32±1.4	13.3±2.0	20.2±2.3	13.8±3.3	D:14 I:14	4.4±0.4	Dep: 5 A: 3 Dep/A:5

A, ansiedad; D, derecho; Dep, depresión; F, femenino; FAEs, Fármacos antiepilépticos; I, izquierdo; M, masculino; ND, no determinado; NP, no presenta; Psi, comorbilidades psiquiátricas. En la parte inferior de la tabla se muestran promedios ± Error Estándar.

Todos los pacientes se mantuvieron libres de FAEs por lo menos 24 h antes del procedimiento neuroquirúrgico. Los criterios para la selección de pacientes fueron los siguientes:

5.3.1.1 Criterios de inclusión

- Pacientes candidatos a lobectomía temporal con diagnóstico de ELTM farmacorresistente
- Masculinos o femeninos de entre 18 y 60 años.
- Que supieran leer y escribir, con capacidad de cooperación adecuada y coeficiente intelectual de 90 a 109
- Con valoración preoperatoria completa que consistió en:
 - Historia clínica completa.
 - Evaluación neuropsicológica, la cual consistió en la aplicación de pruebas psicológicas que comprenden la valoración cuantitativa y cualitativa de las funciones cognitivas. Estas pruebas dan información acerca de la capacidad de integración y organización de las funciones superiores del paciente y permiten relacionarlas con regiones cerebrales específicas y el grado de compromiso de estas.
 - La presencia de depresión y trastornos de ansiedad se evaluó mediante la Hospital and Anxiety Depression Scale (HADS; versión en español). Los diagnósticos fueron confirmados con la entrevista clínica estructurada para trastornos del Eje I DSM-IV (SCID-I), aplicada por un psiquiatra que desconocía el diagnóstico de epilepsia.
 - Video electroencefalograma (EEG)
- Ser diagnosticados como farmacorresistentes, es decir, fue indispensable que tuvieran antecedente de haber sido tratados farmacológicamente con politerapia por un espacio ininterrumpido de 2 años, con seguimiento de niveles séricos de FAE sin haber mostrado mejoría.
- Que su epilepsia implique impedimento para realizar actividades cotidianas, es decir, que haya un detrimento en la calidad de vida.

5.3.1.2 Criterios de exclusión

- Padecimiento de enfermedades sistémicas graves que contraindicaran una neurocirugía mayor.

- Diagnóstico de enfermedad neurodegenerativa.
- Falta de cooperación con el tratamiento.
- Presencia de implantes, prótesis metálicas y claustrofobia.
- Pacientes previamente sometidos a cirugía extratemporal por cualquier indicación.
- Que no hayan sido valorados adecuadamente.

5.4 Procesamiento y manipulación del tejido hipocampal

El tejido hipocampal resecado de pacientes y autopsias se colocó en nitrógeno líquido inmediatamente después de su resección para preservar su integridad. Se trasladó y manipuló en estas condiciones, hasta su almacenamiento a -80 °C. Para las determinaciones experimentales, el tejido siempre fue manipulado en hielo seco y en condiciones de esterilidad. A cada fragmento de tejido se le realizaron cortes con bisturí totalmente estéril hasta obtener la cantidad necesaria para cada experimento (100 mg para extracción de ARNm y 200 mg para extracción de proteínas).

5.5 Extracción y procesamiento de ARNm mediante qPCR

La extracción de ARNm se realizó con Trizol (Invitrogen) a partir de 100 mg de tejido y de acuerdo con el protocolo del fabricante:

El tejido congelado se cortó en fragmentos pequeños de aproximadamente 3 mm³ y se pasó a un tubo de 1.5 mL. Se agregó 1 mL de Trizol, se homogenizó y se colocó en hielo por 10 min. Posteriormente se agregaron 200 µL de cloroformo frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min. a 4 °C. La fase acuosa se separó sin tocar la interfase y se agregaron 500 µL de isopropanol frío. Se mezcló por inversión y se incubó toda la noche a -20 °C.

Después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1mL de etanol al 75%. Dicha suspensión de lavado se centrifugó a 8000 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet sobre papel absorbente hasta quitar todas las gotas de solución. El pellet de ARNm se disolvió en 50 µL de agua DEPC.

Con el fin de incrementar la pureza y mantener la integridad del ARNm obtenido se realizó un proceso de re-purificación a través del sistema de perlas magnéticas Agentcourt RNA clean XP (Beckman Coulter) siguiendo el protocolo del fabricante.

A cada muestra de 50 μL de ARNm se le agregaron 90 μL de Agencourt RNAClean XP. Se homogenizó y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Los tubos se colocaron en la gradilla magnética por 5 min para separar las perlas de la solución y la solución se aspiró suavemente cuidando de no tomar las perlas. Sin retirar las muestras de la gradilla magnética, se agregó 1 mL de etanol al 70% a cada tubo, se incubaron por 30 s a temperatura ambiente y se retiró el etanol. Este proceso de lavado se repitió 3 veces y una vez terminado, los tubos de reacción se mantuvieron abiertos hasta la evaporación total del etanol. Posteriormente se retiraron los tubos de la gradilla magnética, las perlas se resuspendieron en 30 μL de agua DEPC y nuevamente se colocaron en la gradilla magnética. Una vez separadas las perlas, la solución que contiene el ARNm se aspiró y se realizaron alícuotas que fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

El ARNm obtenido se cuantificó espectrofotométricamente, se verificó su pureza mediante la relación 260/280 nm, la cual indica que valores de 1.8 a 2.0 son aceptables, dado que no presentan contaminación. La integridad se evaluó mediante un gel de agarosa 1%-formaldehído 1% que permite observar las bandas correspondientes a las diferentes subunidades ribosomales eucarióticas del ARN ribosomal (18S y 28S).

5.5.1 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADNc se realizó utilizando la M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante:

En un tubo estéril se agregaron 2 μg de ARNm, el volumen equivalente a 1 μg de *random primer* y cbp 15 μL de agua DEPC. Dicha mezcla de reacción se calentó a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min para deshacer estructuras secundarias e inmediatamente después se colocó en hielo. Se agregaron los siguientes componentes y se mezcló suavemente:

- Buffer de reacción M-MLV 5X – 5 μL
- dNTPs 10 mM – 5 μL
- M-MLV RT – 200 unidades
- Agua DEPC - cbp 30 μL

La mezcla de reacción se incubó por 1 h a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 10 min a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente el ADNc se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

5.5.2 PCR en tiempo real

Una vez obtenido el ADNc del tejido cerebral, se llevó a cabo la qPCR bajo las mismas condiciones experimentales con las que se realizaron las curvas de calibración (sección 5.1.3.4). Se tomó el volumen equivalente a 500 ng de ADNc y se preparó la reacción utilizando los cebadores descritos en la Tabla 2 para REST/NRSF, GRIA2, GABRD y para ENO2. El programa de amplificación fue el descrito en la Tabla 3.

5.6 Extracción y procesamiento de proteínas mediante western blot

Se evaluó la expresión proteica de REST/NRSF mediante western blot de acuerdo con el siguiente protocolo:

5.6.1 Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas totales de tejido hipocampal se realizó a partir de 18 muestras utilizando un buffer NP-40 (Tris-HCl 1M, NaCl 0.4M, EDTA 0.5M, NP-40 y SDS al 10%) suplementado con inhibidores de proteasas (cOmplete, Roche).

Se tomaron 200 mg de tejido hipocampal el cual se homogenizó con 1 mL de buffer de lisis NP-40 suplementado con inhibidores de proteasas, hasta que las partículas de tejido fueron de aproximadamente 1 mm. El homogenizado se incubó 30 min a temperatura ambiente agitando cada 10 min. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 10 min, se tomó el sobrenadante que contiene a las proteínas y se realizaron alícuotas que fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Las proteínas se cuantificaron espectrofotométricamente por método colorimétrico de Bradford y se evaluó su integridad a través de una tinción de gel de poliacrilamida con azul de Coomassie. Dicha tinción permitió observar las bandas definidas de las proteínas de alto y bajo peso molecular.

5.6.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Una vez extraídas, las proteínas fueron separadas de acuerdo con su peso molecular a través de un gel SDS-PAGE al 10%. Para la SDS-PAGE de REST/NRSF se tomó el volumen correspondiente a 100 mg de proteínas y se agregó buffer de carga (1:1, v/v). Las muestras se desnaturalizaron al colocarlas en agua hirviendo por 5 min e inmediatamente después en hielo. Posteriormente se cargaron en los pozos de los gels a

la concentración indicada y en uno de los pozos se cargó el marcador de peso molecular. La cámara de electroforesis se aforó con buffer de corrida 1X y se corrió a 90 V o a 24 Amp por 2 h.

5.6.3 Transferencia

Una vez terminada la electroforesis se procedió a transferir las proteínas separadas a un medio sólido (membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de porosidad). Para ello, se retiró el gel de la cámara y se enjuagó en buffer de transferencia para eliminar el SDS. Mientras tanto, se preparó el dispositivo de transferencia humedeciendo esponjas, bloques de papel filtro y la membrana de nitrocelulosa con buffer de transferencia, se comprimió y se colocó en la cámara de transferencia semiseca (Semidry, Biorad). Con buffer de transferencia se humidificó todo el dispositivo, se cerró la cámara y se puso a correr a 23 V por 1 h. Una vez concluido el tiempo, se retiró la membrana de nitrocelulosa y se tiñó por 3 min con rojo de Ponceau, para corroborar la transferencia adecuada de las proteínas. Dicha tinción transitoria fue removida enjuagando con agua destilada.

5.6.4 Bloqueo e inmunodetección

Una vez que realizada la correcta transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa se procedió al bloqueo e inmunodetección. Con base en esto, la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se incubó durante 1h con leche al 5% y SFB al 0.5% diluidos en PBS 1X-Tween-20 al 0.1% para bloquear la porosidad de la membrana y evitar reconocimiento antigénico inespecífico. Una vez concluido el bloqueo, la membrana se enjuagó 10 s con PBS 1X. Inmediatamente después se incubó en una dilución 1:1000 del anticuerpo primario anti-REST/NRSF (Abcam ab75785) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se retiró la membrana del anticuerpo primario y se lavó 3 veces durante 10 min con PBS 1X-Tween-20 al 0.1%. Inmediatamente después se incubó en una dilución 1:10000 de anti-mouse durante 1h a temperatura ambiente. La membrana se retiró del anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS 1X-Tween 20 al 0.1% y un lavado de 30 min con solución de alta sal (NaCl 1M). Para la obtención de las imágenes, se tomó la membrana y se adicionaron 200 mL de solución quimiolumincente (Luminata Cressendo, Millipore) y se colocó en el fotodocumentador (Fusion). Se ejecutó el programa de revelado y una vez

obtenidas las imágenes, la membrana se lavó con PBS 1X-Tween 20 al 0.1% durante 30 min.

5.6.5 Stripping & reblotting

Tras la obtención de las imágenes de la respectiva proteína de interés, es importante corroborar que las posibles diferencias de expresión no sean resultado de diferencias en la concentración de las proteínas cargadas en el gel. De acuerdo con lo anterior, en las mismas membranas se evaluó el control de carga a través de la inmunodetección de una proteína expresada de manera endógena (β -actina). Para poder utilizar la misma membrana se realizó un proceso de “stripping” que permite retirar el bloqueo y el anticuerpo primario de la primera proteína de interés. Se realizó un procedimiento de stripping suave, el cual se describe a continuación:

Tras el lavado del procedimiento anterior, se realizaron dos lavados a la membrana con stripping buffer de 5 a 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS 1X durante 10 min a temperatura ambiente y dos lavados con TBS 1X durante 5 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después de los lavados, se repitió el procedimiento de bloqueo e inmunodetección utilizando anti- β -actina (sc-69879, 1:1000) como anticuerpo primario y anti-mouse (1:10000) como anticuerpo secundario.

5.7 Inmunoprecipitación de cromatina

5.7.1 Disgregación del tejido y *crosslinking*

La estandarización de la técnica se realizó con tejido cortical de una autopsia. Así, se determinó que la cantidad de tejido requerida era de 400 mg. Con base en lo anterior se juntaron aleatoriamente 30 mg de tejido hipocampal de 14 pacientes y 40 mg de hipocampo de 10 autopsias respectivamente. El tejido congelado a -80°C se manipuló en condiciones de esterilidad y se seccionó de la forma descrita en la sección 5.4. Las muestras fueron disgregadas hasta obtener pequeños trozos de aproximadamente $1\text{-}3\text{mm}^3$ y transferidas a tubos cónicos de 15 mL a los cuales se añadió 1 mL de PBS con inhibidores de proteasas (PBS+i).

Para la reacción de *crosslinking*, a cada tubo que contenía la solución anterior se le agregaron 10 μL de formaldehído (concentración final del 1%) y se incubaron en rotación por 15 min a temperatura ambiente. El *crosslinking* se detuvo agregando 252.5

μL de glicina 0.5 M (concentración final de 0.125 M) y se continuó la incubación rotatoria a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 720 rpm por 5 min a 4 °C, se descartó el medio y la pastilla resultante se lavó una vez con PBS+i frío. Nuevamente las muestras fueron centrifugadas a 720 rpm por 5 min a 4 °C, los pellets de tejido fueron resuspendidos en 1 mL de PBS+i frío y se colocaron en hielo.

5.7.2 Lisis celular

De las pastillas resuspendidas en el procedimiento anterior, un volumen equivalente a 200 mg de tejido inicial fue transferido a tubos eppendorf de 1.5 mL. Se procedió a la disgregación del material utilizando un homogenizador tipo Potter-Elvehjem. Los tejidos macerados se centrifugaron a 1000 rpm a 4 °C por 10 min, se les aspiró el sobrenadante y fueron resuspendidos en buffer de lisis (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50mM) con inhibidores de proteasas (BL+i) hasta obtener una suspensión homogénea. Las suspensiones de lisis se incubaron en hielo por 15 min y posteriormente los núcleos se centrifugaron a 2500 rpm a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron, las pastillas resultantes se resuspendieron en BL+i a un volumen 5X y se incubaron en hielo por 20 min.

5.7.3 Optimización de la fragmentación del ADN mediante sonicación

Se procedió a la fragmentación del ADN de las muestras, la cual se realizó por sonicación utilizando un sonicador Covaris®. La estandarización en corteza cerebral se realizó a partir de las suspensiones de lisis, de las cuales se tomaron 6 alícuotas de 100 μL . Dichas alícuotas fueron sonicadas probando 20, 30 y 40 ciclos de 30 segundos ON y 30 segundos Off por duplicado. Para confirmar la fragmentación de la cromatina se tomaron 50 μL de cada sonicado (equivalente a 20 mg de tejido inicial) y se agregaron 50 μL de agua. A estas soluciones se les agregó RNasa sin DNasa a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se les añadió proteinasa K a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron a 65 °C durante toda la noche. Después de la incubación, las soluciones fueron centrifugadas a 14000 rpm y los sobrenadantes se recuperaron. Se purificó el ADN de dichos sobrenadantes utilizando el kit MagJET Genomic DNA (Thermo Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante descrito a continuación:

Al sobrenadante recuperado se resuspendió en 300 μL de BL+i y se transfirió a tubos que contenían una suspensión de 400 μL de isopropanol y 25 μL de perlas magnéticas. Dicha suspensión se agitó suavemente y los tubos se colocaron en una gradilla magnética. Una vez que las perlas se agregaron hacia el magneto, el sobrenadante fue removido cuidadosamente y se descartó. Los tubos se removieron de la gradilla magnética y las perlas se resuspendieron en 800 μL de *wash* buffer 1 suplementado con etanol. Nuevamente los tubos se colocaron en la gradilla magnética hasta que las perlas se agregaron y se removió el sobrenadante. Este procedimiento se repitió resuspendiendo en 800 μL de *wash* buffer 2 suplementado con etanol. Una vez removido el sobrenadante, las perlas se resuspendieron en 150 μL de *Elution* Buffer y los tubos se incubaron a 72 °C en agitación a 700 rpm por 5 min. Posteriormente se colocaron en la gradilla magnética hasta que las perlas se agregaron y el sobrenadante que contiene el ADN fue transferido a un tubo de 1.5 mL. Posteriormente se procedió a cuantificar el ADN espectrofotométricamente (Epoch®).

Las muestras de ADN purificado (500 ng) fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar el tamaño de los fragmentos conseguidos con la sonicación. Se determinó que los fragmentos de ADN adecuados para la amplificación (200-600 pb) se obtenían con 30 y 40 ciclos de sonicación. La mayor concentración de estos fragmentos se encontró con 30 ciclos. Estos parámetros de sonicación fueron reproducibles en tejido hipocampal de pacientes con ELTM y autopsias (Figura 7).

5.7.4 Inmunoprecipitación y *crosslinking reversal*

El procedimiento de inmunoprecipitación se realizó con los 100 μL restantes de las muestras sonicadas utilizando el kit EpiQuik™ Tissue Chromatin Immunoprecipitation (Epigentek®) de acuerdo con el protocolo del fabricante:

Se tomaron 100 μL del sonificado y se diluyeron con 100 μL de solución CP4. De dicha solución se pasaron 5 μL a un tubo, se etiquetó como "ADN *input*" y se colocó en hielo. Mientras tanto la placa se preparó lavando cada pocillo con 120 μL de CP1 y posteriormente 100 μL de CP2. Después se agregaron los anticuerpos de la siguiente forma: 1 μL de anti-IgG normal de ratón como control negativo (solo se expresa tras reacciones antigénicas), 1 μL de anti-RNA Polimerasa II como control positivo (su expresión es constante, pues transcribe los genes eucariotas) y 10 μg de anti-REST/NRSF (sc-374611, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Los pocillos fueron cubiertos con Parafilm

M y se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min. Finalmente, la solución de incubación de anticuerpos se retiró y los pocillos se lavaron 3 veces con 150 μ L de CP2.

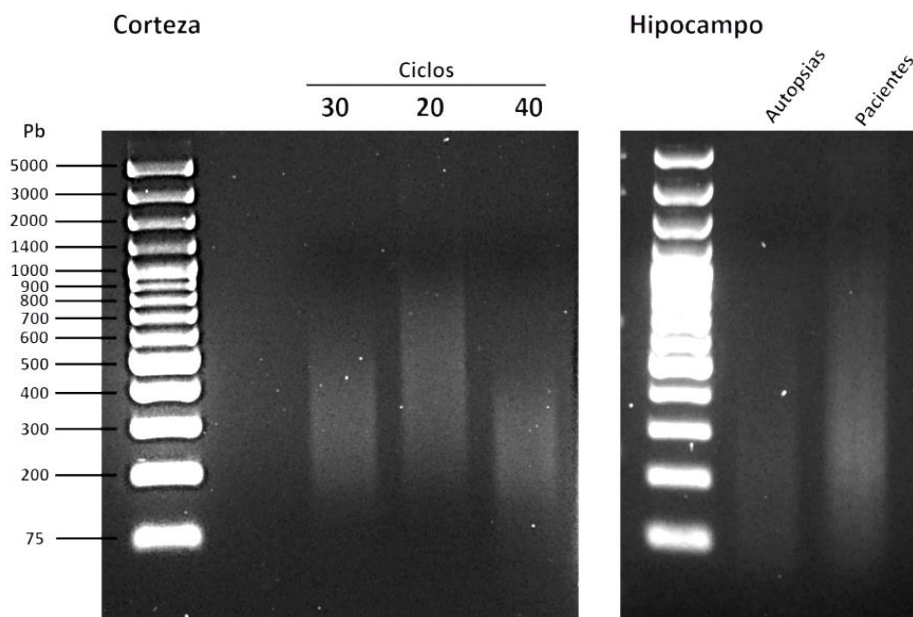


Figura 7. Patrones de fragmentación del ADN mediante sonicación. La imagen del lado izquierdo muestra los patrones de fragmentación de ADN de corteza cerebral a 20, 30 y 40 ciclos de sonicación (indicados en la parte superior de cada carril). La imagen del lado derecho muestra los patrones de fragmentación del ADN de hipocampo de autopsias y pacientes a 30 ciclos de sonicación. El marcador de pares de bases, para ambas figuras, se muestra del lado izquierdo. Nótese que el barrido a 30 ciclos de sonicación muestra mayor enriquecimiento de fragmentos entre 200-600 pb, mismos que fueron reproducibles en hipocampo de autopsias y pacientes.

Se tomaron 100 μ L del sobrenadante diluido y se agregaron a cada pozo. Los pocillos fueron cubiertos con Parafilm M y se incubaron durante 90 min en agitación a 80 rpm a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se realizaron 6 lavados de 2 min a 80 rpm con 150 μ L de CP1 y un lavado con 150 μ L de buffer TE 1X. A los pocillos y al vial “ADN *input*” se les agregaron 40 μ L de una mezcla 1:40 de proteinasa K con CP5. Se cubrieron los pocillos con la tira de tapas y se incubó la placa y el tubo a 65 °C en un baño de agua durante 15 min. Después se agregaron 40 μ L de CP6 a los pozos y al tubo, se mezcló, se volvieron a cubrir los pocillos con la tira de tapas y se incubaron a 65 °C en baño de agua durante 90 min. Se agregaron 150 μ L de CP7 a las muestras y al tubo y estas mezclas se transfirieron a las columnas de centrifugado acopladas a los tubos de recolección de 2 mL. Estos dispositivos se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 segundos. Se agregaron 200 μ L de etanol al 70% a las columnas y se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 segundos. Se

desecharon los flujos y se realizaron dos lavados a las columnas agregando 200 µl de etanol al 90% y centrifugando a 12000 rpm durante 35 segundos. Se desecharon los flujos, las columnas se colocaron en viales de 1.5 mL y se les agregaron 20 µl de CP8 directamente en el filtro. Los viales con las columnas se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 segundos para eluir el ADN purificado, el cual se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

5.7.5 Amplificación de secuencias RE1 de los genes GRIA2 y GABRD por PCR

5.7.5.1 Análisis predictivos de sitios RE1 y diseño de cebadores

Para determinar los posibles sitios de unión de REST/NRSF a los sitios RE1 de los genes GRIA2 y GABRD se utilizó la base de datos ChIP qPCR Assay-SABiosciences (QIAGEN) con la cual se realizó un análisis de las siguientes secuencias:

- GRIA2: Homo_sapiens-ENSG00000120251-GRIA2 ENSG00000120251; upstream from -1000 to 17000; size: 17001; location: chromosome:GRCh38:4:1:190214555:1 157203182 157220182 D
- GABRD: Homo_sapiens-ENSG00000187730-GABRD ENSG00000187730; upstream from -3500 to 800; size: 4301; location: chromosome:GRCh38:1:1:248956422:1 2015798 2020098 D

El análisis de secuencias arrojó dos posibles sitios de unión de REST/NRSF para cada gen (Figura 8).

Partiendo de los ensayos predictivos, se diseñaron y analizaron los dos juegos de cebadores para cada gen (un juego por cada sitio de unión), siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.1.1. Los cebadores diseñados se muestran en la tabla 6:

Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar las dos secuencias hipotéticas de unión de REST/NRSF a los promotores de GRIA2 y GABRD.

Gen	Cebadores	nt	Tm (°C)
GABRD (Secuencia 1)	Fw- ACAACCTGAGACGCTTTCTAAC Rv- GAGTTTCTGTGCCCATGAGAT	22 21	62.5
GABRD (Secuencia 2)	Fw- AGATAGCGGCTGGGAGAG Rv- CACCGAGTTCTCAGGTCTTTC	18 21	62.5
GRIA2 (Secuencia 1)	Fw- GATCAGCTTTGCTGCATTTGG Rv- CGCTGAGAAAGCACAGCTC	21 19	63
GRIA2 (Secuencia 2)	Fw- CGTGAGTGAGAGAGGAGAGA Rv- CTGAAGTGGAGGCAGAAGAA	20 20	62

nt, nucleótidos; Tm, Primer Melting Temperature.

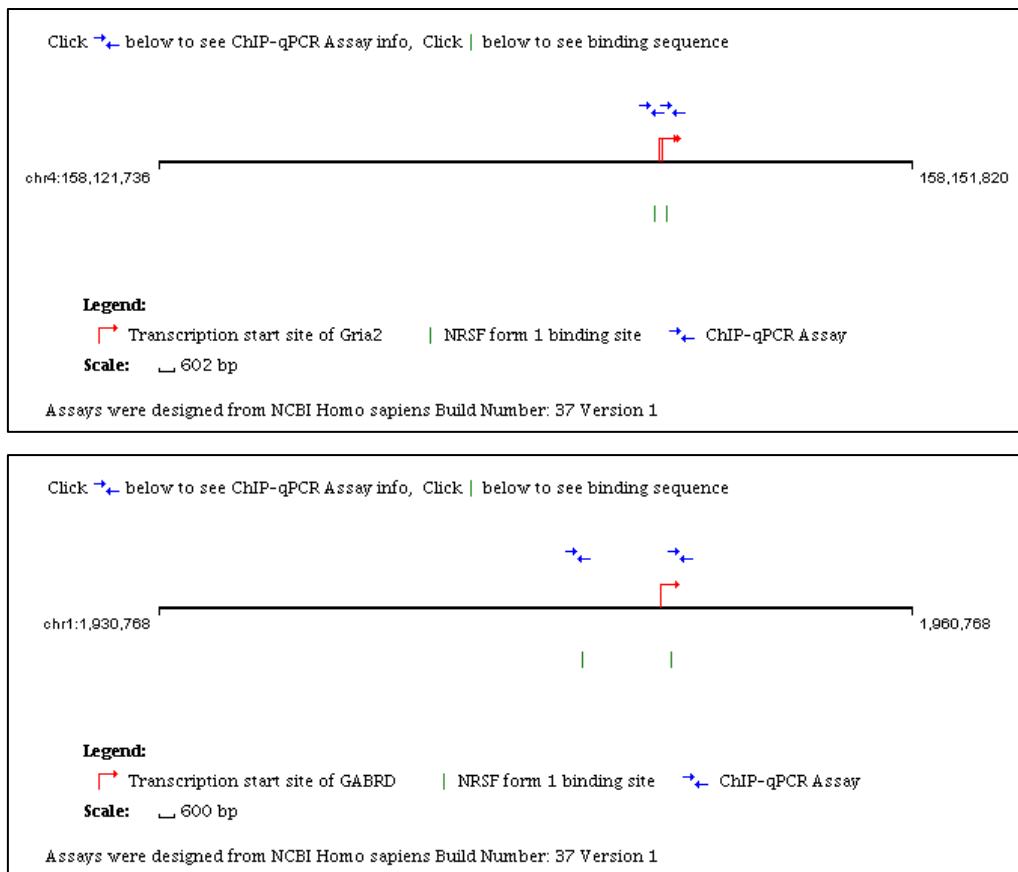


Figura 8. Ensayos predictivos ChIP-Seq para la unión de REST/NRSF en sitios RE1 de GRIA2 y GABRD. Se muestra los resultados de los ensayos ChIP-Seq para los genes GRIA2 (arriba) y GABRD (abajo) en el que se muestran los posibles sitios de unión de REST/NRSF a dos posibles sitios RE1 en cada gen. La línea negra representa el fragmento del promotor sobre el cual se realizó el análisis predictivo. Al inicio y al final de la línea se muestran las localizaciones cromosómicas. Las flechas rojas indican los sitios de inicio de la transcripción, las flechas azules muestran los posibles sitios de hibridación de los cebadores y las líneas verdes perpendiculares indican el sitio específico de unión de REST/NRSF. Los ensayos fueron diseñados desde NCBI Homo Sapiens Build Number 37 Version 1.

5.7.5.2 PCR punto final

Partiendo de los ADNs purificados, se llevó a cabo la amplificación de las secuencias RE1 de los genes GRIA2 y GABRD mediante PCR punto final. Se prepararon mezclas de reacción para un volumen de 20 μ L y para cada sistema de amplificación (cebadores forward y reverse de cada secuencia). Dichas mezclas de reacción se prepararon de la siguiente forma:

- ADN – 500 ng
- Buffer Taq 5X – 2 μ L
- dNTPs 2 mM – 2 μ L

- Cebador Forward 10 mM – 0.4 μ L
- Cebador Reverse 10 mM – 0.4 μ L
- Taq DNA polimerasa 5u/ μ L – 0.2 μ L
- Agua libre de nucleasas – cbp 20 μ L

Se realizó la PCR punto final de 35 ciclos utilizando el siguiente programa de amplificación.

- 95°C por 3 min
- 94 ° C por 30 s
- 62 °C por 30 s
- 72 °C por 1 min

Los productos de PCR se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se evaluaron las diferencias en la amplificación de las secuencias de unión de REST/NRSF.

5.8 Análisis estadístico

Para la estandarización de la qPCR, se determinó la sensibilidad y exactitud del sistema de medición en el rango de valores de 30 ng a 3 fg de plásmido mediante un análisis de linealidad. Para todos los genes en estudio se determinaron los valores de la ecuación de la recta ($y=mx+b$) y el ajuste del modelo a través del coeficiente de correlación (R^2) ajustado.

Las diferencias en la expresión de las proteínas se determinaron a través del análisis de imágenes por densidad óptica utilizando el software ImageJ ®. Los valores obtenidos fueron normalizados en proporción con los datos obtenidos para β -actina.

Los valores de expresión obtenidos de los pacientes y las autopsias obtenidas por los diferentes procedimientos experimentales se compararon mediante la prueba t de Student con una prueba post hoc de Mann-Whitney. La influencia de las variables clínicas con la expresión proteica de cada grupo se determinó mediante coeficientes de correlación de Pearson con un $\alpha=0.05$, en cuyo caso el p-valor se calculó siguiendo una ley de *Student* con N-2 grados de libertad y 95% de potencia. La dependencia de la expresión de ARNm y proteínas en las comorbilidades psiquiátricas se analizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una prueba post hoc de Dunn-Sidak (Bonferroni). Se utilizó el

software SigmaPlot 12.5 para los análisis estadísticos. Los valores estadísticamente significativos fueron los siguientes: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$.

La tasa de unión de REST/NRSF a las secuencias RE1 de los genes GRIA2 y GABRD en tejido hipocampal de autopsias y pacientes con ELTM fue determinada mediante un análisis de densidad óptica realizado con el programa ImageJ (U. S. National Institutes of Health). Debido a la cantidad de tejido requerida para el experimento no fue posible realizar experimentos para cada paciente y por lo tanto no es posible establecer diferencias estadísticas. Los resultados fueron expresados como porcentajes de unión de REST/NRSF en unidades arbitrarias de densidad óptica. Dicho porcentaje de unión fue obtenido en comparación con el *input*, el cual fue considerado como el 100%.

6 Resultados y discusión

6.1 Confiabilidad, sensibilidad y precisión en la amplificación génica

Verificar la linealidad de un método consiste en comprobar que una función matemática relacionada a un procedimiento analítico es efectivamente una recta para un intervalo definido de valores. Con base en lo anterior, se realizó un análisis de linealidad para determinar la sensibilidad y exactitud del sistema de medición en el rango de valores de 30 ng a 3 fg de plásmido y para ello se determinó el coeficiente de correlación (R^2) ajustado para las curvas de cada gen en estudio. Con respecto a R^2 , se sabe que entre más cercano es el valor a 1, mayor es la linealidad y el ajuste al modelo planteado, es decir, el modelo es más confiable (Elena, 2005). El R^2 de las curvas de concentración fue 0.999 para ENO2, 0.9921 para REST/NRSF, 0.9995 para GRIA2 y 0.9958 para GABRD (Figura 9, Tabla 7). Lo anterior indica que el modelo para determinar la concentración de ENO2 dependiente de la amplificación (CP) fue 99.9% confiable, 99.21% para la de REST/NRSF, 99.95% para la de GRIA2 y 99.58% para la de GABRD.

Por otra parte, cada punto de las curvas se evaluó 3 veces, con lo cual se determinó que el sesgo es mínimo e insignificante (menor a 1 en cada uno de los 6 puntos). Este resultado indica que no existe sesgo dependiente de la concentración del plásmido como resultado del aumento en los ciclos de amplificación.

Con base en estos resultados se determinó que el ajuste del modelo para la amplificación de ENO2, REST/NRSF, GRIA2 y GABRD por qPCR es muy bueno, ya que es confiable, sensible y preciso para describir la relación que existe entre las variables.

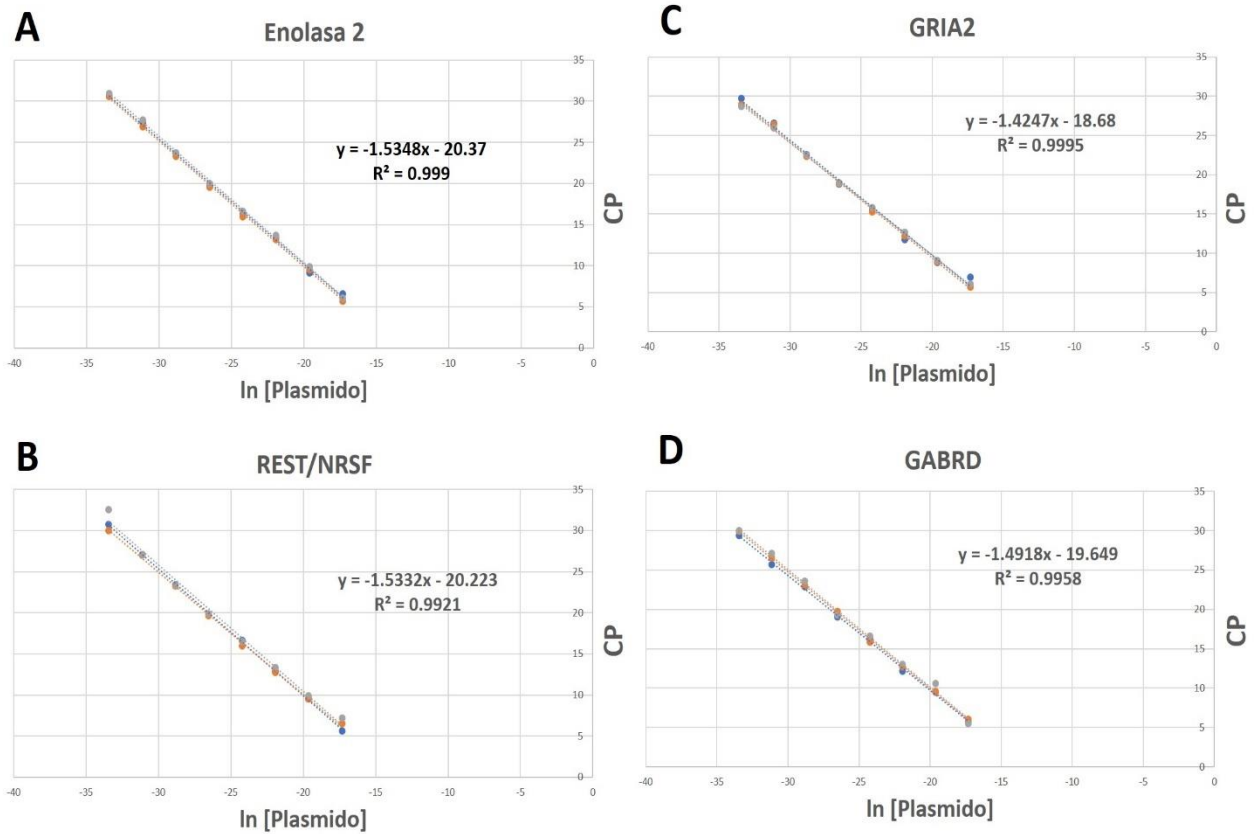


Figura 9. Curvas de calibración para qPCR de ENO2, REST/NRSF, GRIA2 y GABRD. A) La gráfica muestra la curva de calibración de ENO2 en la que se relaciona el logaritmo natural (ln) de la concentración de plásmido con respecto a los valores del CP (*cross point*) de la amplificación por qPCR, mientras que en B) se muestra la respectiva curva de calibración de REST/NRSF, en C) la de GRIA2 y en D) la de GABRD. En ambas gráficas se muestran los valores del coeficiente de correlación (R^2) y la respectiva ecuación de la recta.

Tabla 7. Valores de la ecuación de la recta obtenidos de curvas de calibración de ENO2 y REST/NRSF, GRIA2 y GABRD.

	m	b	r ²
ENO2	-1.5348	20.37	0.999
REST/NRSF	-1.5332	20.223	0.9921
GRIA2	-1.4247	18.68	0.9995
GABRD	-1.4918	19.649	0.9958

Estos valores se utilizaron para la normalización de la qPCR en la que se evaluó la expresión de ARNm de REST/NRSF, GRIA2 y GABRD (con respecto al gen endógeno ENO2) en el tejido hipocampal de autopsias y pacientes con ELTM. Para dicho análisis, se procedió a seleccionar los tejidos hipocampales de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión establecidos. De dichos tejidos se extrajo el ARNm y las proteínas para las posteriores evaluaciones de expresión.

6.2 Expresión de REST/NRSF en pacientes con ELTM farmacorresistente y su asociación con variables clínicas y psiquiátricas.

Como se ha descrito anteriormente, existen evidencias de la sobreexpresión de REST/NRSF en regiones límbicas de modelos experimentales de crisis convulsivas. Sin embargo, aún se desconoce si REST/NRSF también se sobreexpresa en el hipocampo de pacientes con ELTM. Por otra parte, estudios señalan que el hipocampo de sujetos con ELTM exhibe cambios que facilitan la actividad epiléptica y los trastornos psiquiátricos como ansiedad y depresión, mismos que se han asociado al decremento de REST/NRSF. Con base en lo anterior, se evaluó la expresión de ARNm (n=28) y proteína (n=18) de REST/NRSF en el hipocampo de autopsias y de pacientes con ELTM farmacorresistente. Dichos valores de expresión se correlacionaron con las variables clínicas y con la presencia de ansiedad y depresión comórbidas.

6.2.1.1 Características clínicas de las autopsias

Se obtuvieron 13 hipocampos de autopsias, de los cuales 7 fueron masculinos y 6 femeninos. Los datos clínicos de las autopsias se presentan como promedios \pm Error estándar de la media (EEM): edad 34.5 ± 3.2 años e intervalo postmortem (IPM) 15.58 ± 0.88). Tabla 4.

6.2.1.2 Características clínicas de los pacientes con ELTM farmacorresistentes

Se obtuvieron 28 hipocampos de pacientes con ELTM, de los cuales 15 eran masculinos y 13 femeninos. Todos los pacientes recibieron politerapia previo a la cirugía. Los datos clínicos de los pacientes fueron los siguientes (promedio \pm EEM): edad de inicio de las crisis epilépticas, 13.3 ± 2.05 años, duración de la epilepsia, 20.2 ± 2.3 años, frecuencia de crisis epilépticas, 13.8 ± 3.3 crisis por mes, y número de fármacos antiepilépticos (FAEs) durante el periodo prequirúrgico, 4.4 ± 0.48 FAEs. La edad de los pacientes no fue significativamente diferente comparada con la de las autopsias (32 ± 1.4 años, $p > 0.05$) (Tabla 5).

6.2.1.3 Expresión de REST/NRSF en hipocampo de autopsias

Los datos de expresión de ARNm de REST/NRSF relativa al gen endógeno ENO2, así como los datos de expresión proteica expresados como unidades arbitrarias de

densidad óptica relativos a la expresión de β -actina, para pacientes y autopsias, se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Valores de expresión de ARNm y proteínas de pacientes y autopsias.

Pacientes			Autopsias		
#Paciente	ARNm	Proteína	#Autopsia	ARNm	Proteína
200	0.07	1.00	1	0.09	0.39
206	0.25	--	2	0.08	0.35
239	0.11	13.76	3	0.11	0.53
240	0.23	--	4	0.14	1.19
241	0.10	3.50	5	0.14	0.75
242	0.11	19.09	6	0.09	1.06
243	0.34	0.88	7	0.10	0.70
244	0.45	10.55	8	0.05	4.38
271	0.19	--	9	0.12	2.25
275	0.11	4.28	10	0.08	5.40
281	0.14	--	11	0.11	3.96
282	0.03	4.67	12	0.09	4.70
316	0.57	14.15	13	0.18	0.42
324	0.28	--			
326	0.17	2.78			
329	0.05	--			
339	1.18	12.26			
345	0.25	--			
359	0.26	6.25			
367	0.35	--			
369	0.11	0.79			
371	0.20	9.31			
386	0.09	10.43			
408	0.65	11.36			
413	0.22	7.09			
417	0.33	--			
420	0.07	--			
424	0.35	2.58			
Promedios \pm EEM	0.26 \pm 0.0446	7.49 \pm 1.266		0.11 \pm 0.0101	2.01 \pm 0.526

EEM, Error Estándar de la Media

Con base en los datos presentados se realizaron los análisis de correlación con las variables clínicas de los pacientes y las autopsias según corresponde (Tabla 9). Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (r), con el cual se evaluó la fuerza y dirección en la relación entre dos variables cuantitativas relacionadas de forma lineal (valores de expresión de ARNm y proteínas vs variables clínicas). Para determinar la fuerza, el r comprende valores entre +1 y -1, así, mientras más se aleje su valor del cero,

más fuerte será la relación entre las dos variables. La dirección es determinada por la tendencia de ambas variables a aumentar (+) o disminuir (-) de manera conjunta. Finalmente, el cálculo de la significancia (p-valor) permite determinar si el valor de r es causal o casual, de tal forma que su valor es significativo cuando se puede afirmar con cierta probabilidad (95% en nuestro caso) que es diferente de cero.

Con base en lo anterior, se sabe que la integridad del ARNm puede verse afectada por un prolongado IPM (Birdsill et al., 2011). Sin embargo, no se encontró correlación significativa entre el IPM (rango de 10-20 h) del grupo de autopsias y los niveles de expresión de ARNm y proteína REST/NRSF ($r=0.435$, $p>0.05$; y 0.0704 , $p>0.05$, respectivamente) (Tabla 9). Estos resultados indican que, bajo las condiciones experimentales planteadas, el rango de IPM de las autopsias no influyó en la expresión de REST/NRSF y por lo tanto los valores pueden ser usados como condición control.

Tabla 9. Correlaciones entre la expresión de REST/NRSF y las variables clínicas

Variables clínicas	Pacientes		Autopsias	
	ARNm (r)	Proteína (r)	ARNm (r)	Proteína (r)
Edad (años)	-0.257	-0.0974	-0.417	0.646*
Edad de inicio de crisis (años)	0.134	-0.197	--	--
Duración de la epilepsia (años)	-0.357	0.0445	--	--
Frecuencia de crisis (por mes)	-0.122	0.658*	--	--
Número de FAEs previos a la cirugía	-181	-0.140	--	--
Intervalo Post-Mortem (horas)	--	--	0.435	0.0704

FAEs, Fármacos Antiepilépticos; **ARNm**, ácido ribonucleico mensajero. Valores de r son coeficientes de correlación de Pearson. * $p<0.05$

Un hallazgo importante es que la expresión proteica de REST/NRSF correlacionó positivamente con la edad de las autopsias ($r=0.646$, $p<0.05$) (Tabla 9, Fig. 10), lo cual significa que, bajo las condiciones experimentales planteadas, a mayor edad, mayor expresión proteica de REST/NRSF en hipocampo de autopsias. Este resultado está de acuerdo con un estudio previo que indica que la mayor expresión de REST/NRSF en la corteza prefrontal y el hipocampo de los sujetos normales se correlaciona con una buena conservación de las funciones cognitivas y la edad, una situación que se pierde en sujetos con enfermedad de Alzheimer (Lu et al., 2014). Por otra parte, se encontró que, bajo las condiciones experimentales planteadas, la edad no correlaciona con los niveles de expresión de ARNm ($r=-0.417$, $p>0.05$) (Tabla 9), lo cual sugiere que, en condiciones

normales el factor de transcripción se traduce de acuerdo con los requerimientos celulares, independientemente de los niveles de ARNm.

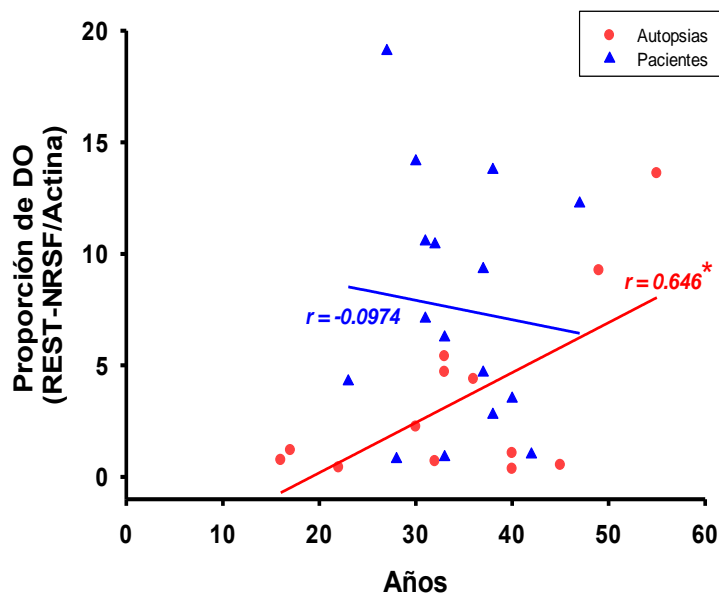


Figura 10. Correlación de la edad con la expresión proteica de REST/NRSF en el hipocampo humano. La gráfica muestra la correlación en la expresión de proteína de REST/NRSF expresada como densidad óptica (DO) con la edad de las autopsias y los pacientes. Se observa que la correlación significativa encontrada en las autopsias no es evidente en pacientes con ELTM farmacorresistente. r indica el valor del coeficiente de correlación de Pearson. * $p < 0.05$.

Bajo las condiciones experimentales planteadas no se encontraron otras correlaciones significativas en autopsias.

6.2.1.4 Expresión de REST/NRSF en hipocampo de pacientes con ELTM farmacorresistente y su asociación con las variables clínicas y comorbilidades psiquiátricas

A diferencia de las autopsias, en hipocampo de pacientes con ELTM hubo un incremento significativo en la expresión de ARNm (146%, $p < 0.01$) y proteína REST/NRSF (273%, $p < 0.01$) (Fig. 11), bajo las condiciones experimentales planteadas.

Dicho incremento de este factor de transcripción puede ser consecuencia del aumento en los niveles de glutamato extracelular que se produce en los pacientes con ELTM (During y Spencer, 1993). El glutamato activa cascadas transduccionales como ERK y JNP/MAPK, lo cual resulta en la fosforilación y activación del factor de transcripción *cAMP response element-binding* (CREB) (Vanhoutte et al., 1999). Se sabe que CREB regula positivamente al gen *REST* (Kreisler et al., 2010), así que es posible que la activación crónica de CREB inducida en el hipocampo de pacientes con ELTM (Park et al., 2003) resulte en la sobreexpresión de REST/NRSF. Por otra parte, la sobreexpresión de REST/NRSF está asociada con la activación de la vía canónica WNT que resulta del incremento en los niveles de glutamato extracelular (Lutgen et al., 2016). En la vía WNT, β -catenina regula directamente al gen *REST* y a otros genes relacionados

con el control de las células progenitoras (Nishihara et al., 2003). De hecho, la sobreexpresión de β -catenina y otros efectores de la vía WNT están asociadas con neurogénesis aberrante del hipocampo en un modelo experimental de ELTM (Qu et al., 2017).

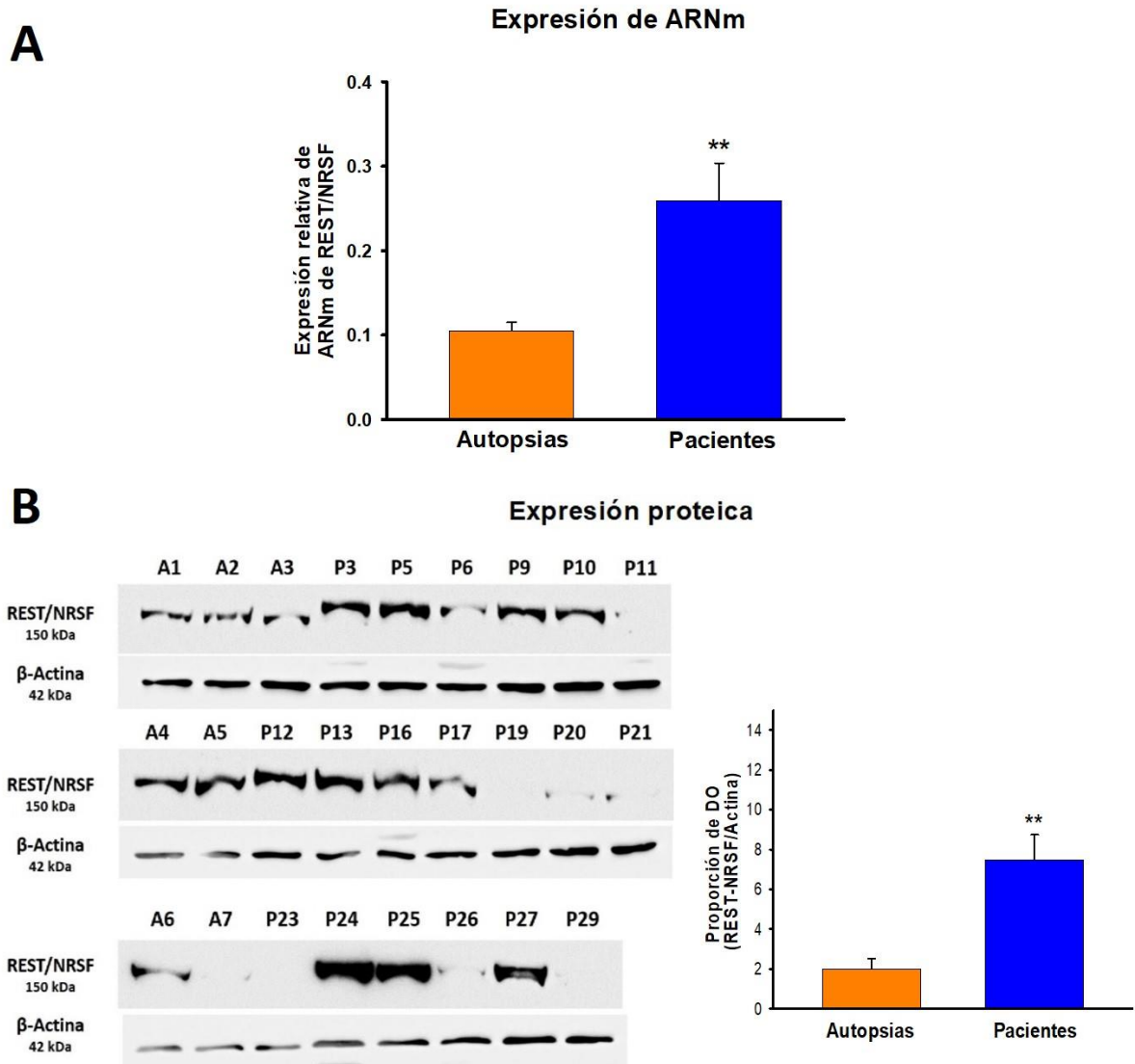


Figura 11. Expresión de REST/NRSF en el hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM farmacorresistente. A) La gráfica muestra la expresión del ARNm de REST/NRSF relativa al gen endógeno ENO2. B) Se muestran las imágenes obtenidas por western blot, mientras que la gráfica muestra los valores de densidad óptica (proporción de DO) con relación a la expresión de proteínas de REST/NRSF y β -actina. Una imagen representativa del gel completo, en el que se muestra la especificidad de las bandas, se muestra como Anexo 3. Los resultados se expresan como media \pm EEM. T-test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. A, autopsias ($n=13$) y P, pacientes ($n=28$).

Por otra parte, el peso molecular de la proteína REST/NRSF obtenido en pacientes fue de entre 180-200 kDa, el cual es mayor de los 150 kDa de las autopsias y predicho para las condiciones experimentales planteadas (Figura 11B). Dicha situación puede ser consecuencia de las modificaciones postraduccionales, siendo la glicosilación de O la principal causa del cambio en el peso molecular de las proteínas (Unal et al., 2008, Gross et al., 1989). Al respecto, se ha reportado que la isoforma REST/NRSF 4 es O-glicosilada entre los residuos 87 y 152 (Lee et al., 2000), mismos que se encuentran en todas las isoformas de REST/NRSF. Además, existe evidencia experimental que demuestra la inducción de modificaciones postraduccionales asociados a epileptogénesis y actividad convulsiva. Se ha demostrado que la inducción de crisis convulsivas con ácido kainico en ratas, aumenta la carbonilación (adición de grupos funcionales que contienen monóxido de carbono) y disminuye la O- β -N-acetilglucosaminación (adición de β -N-acetilglucosamina en los residuos de serina y treonina) de proteínas hipocampales (Hartman, 2013, Sanchez et al., 2019) con lo cual se modifican las propiedades fisicoquímicas de las mismas. Futuros estudios deberán ser conducidos para determinar los mecanismos postraduccionales específicos de la fisiopatología de la ELTM humana y que podrían afectar directamente a REST/NRSF.

Se ha observado en un modelo animal que la inducción de crisis convulsivas produce un incremento en los niveles de expresión de REST/NRSF, los cuales regresan a sus niveles basales 24 h después (Spencer et al., 2006). El análisis de correlación entre los niveles de expresión obtenidos y las variables clínicas mostró que la alta frecuencia de crisis está asociada con la alta expresión proteica de REST/NRSF en el hipocampo de los pacientes en estudio ($r=0.658$, $p<0.05$) (Tabla 9, Fig. 12).

Ya que la liberación de glutamato incrementa con cada crisis epiléptica (Haglid et al., 1994), es posible sugerir que el incremento en la frecuencia de eventos convulsivos mantiene elevada la expresión de REST/NRSF, ya sea por un mecanismo mediado por CREB y/o por β -catenina.

La correlación positiva encontrada en el grupo de autopsias entre la expresión proteica de REST/NRSF y la edad, no se presenta en los pacientes con ELTM de este estudio (Tabla 9, Figura 10). Lo cual sugiere que los cambios en la expresión de REST/NRSF son debidos a los cambios fisiopatológicos propios de la ELTM.

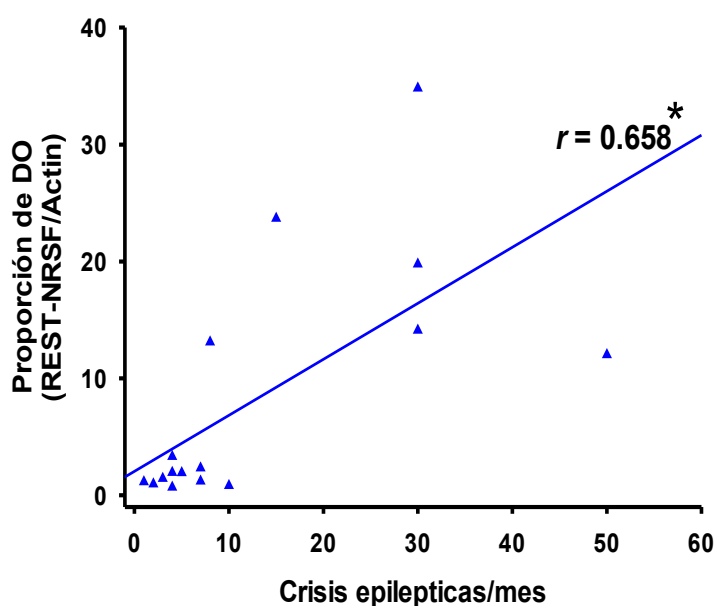


Figura 12. Correlación entre la frecuencia de las crisis epilépticas y la expresión de proteína de REST/NRSF en el hipocampo de pacientes con ELTM farmacorresistente. La gráfica muestra la correlación entre la expresión de proteínas de REST/NRSF expresada como densidad óptica y la frecuencia de las crisis epilépticas por mes. r indica el valor del coeficiente de correlación de Pearson. * $p < 0.05$.

Los datos clínicos muestran que de los 28 pacientes con ELTM, 13 presentan comorbilidades psiquiátricas. 3 pacientes presentan ansiedad, 5 tienen depresión y 5 presentan ansiedad y depresión (Tabla 5). Los pacientes con ELTM y comorbilidades psiquiátricas presentaron sobreexpresión de REST/NRSF, tanto a nivel de ARNm (55% vs autopsias, $p < 0.05$), como de proteínas (148% vs autopsias, $p > 0.05$). Mientras tanto, en hipocampo de los 15 pacientes que tenían ELTM sin desórdenes psiquiátricos la sobreexpresión de REST/NRSF fue más evidente tanto a nivel de ARNm (171% vs autopsias, $p < 0.001$) como de proteína (230% vs autopsias, $p < 0.001$) (Fig. 13).

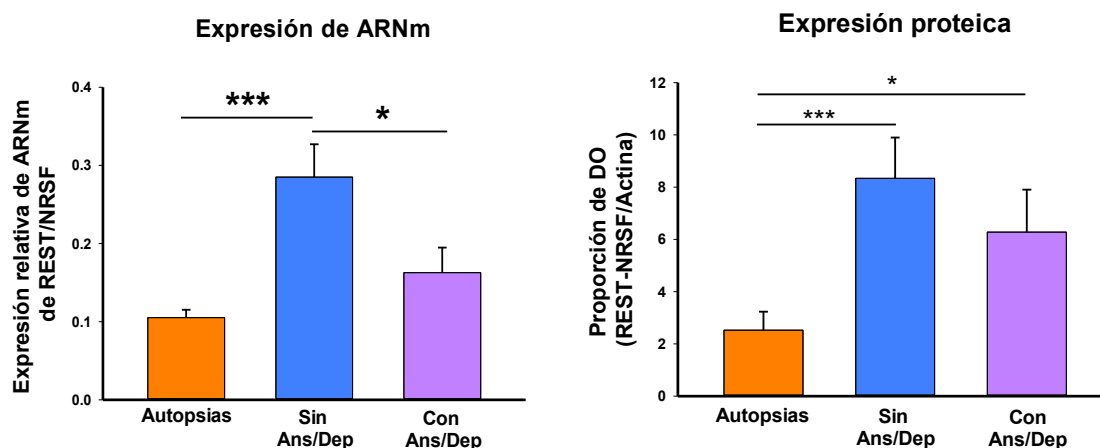


Figura 13. Expresión de REST/NRSF en el hipocampo de pacientes con ELTM farmacorresistente con y sin ansiedad y depresión comórbidas. Las gráficas muestran la expresión de ARNm (izquierda) y proteína (derecha) de REST/NRSF en autopsias, pacientes con ELTM sin trastornos del estado de ánimo y pacientes con ELTM y ansiedad y depresión comórbidas. Los resultados se expresan como media \pm EEM. Prueba post hoc ANOVA y Dunn-Sidak. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Estos resultados correlacionan con un estudio previo en donde se demuestra que el incremento de REST/NRSF está asociado con la reducción de los síntomas psiquiátricos asociados al estrés (Ashton et al., 2017). Por otra parte, la regulación mediada por CREB, también podría estar jugando un papel importante, ya que se ha demostrado que dicho factor de transcripción, tanto en su forma fosforilada como nativa, está disminuido en varias estructuras cerebrales de sujetos con ansiedad y depresión (Pandey et al., 2003, Barrot et al., 2005, Yamada et al., 2003). En contraste, la inducción transcripcional de CREB en el hipocampo de ratones tiene un efecto antidepresivo y ansiolítico (Chen et al., 2001), a la vez que el tratamiento con antidepresivos lleva al incremento en la expresión de CREB (Wallace et al., 2009, Dowlatshahi et al., 1998). Además, se sabe que la administración crónica de antidepresivos modifica también la expresión de múltiples componentes de la cascada de Wnt/ β -catenina en hipocampo, incluido un aumento de WNT2, un subtipo de Wnts (Okamoto et al., 2010).

En nuestro grupo de pacientes no se encontraron correlaciones significativas entre la expresión de REST/NRSF y otras variables clínicas (Tabla 9). Ninguna condición clínica correlacionó con la sobreexpresión de REST/NRSF con y sin trastornos del estado de ánimo.

Estos resultados demuestran que, bajo las condiciones experimentales planteadas, tanto el ARNm y la proteína de REST/NRSF se incrementan en pacientes con ELTM. Sin embargo, la unión de dicho factor de transcripción a sus secuencias consenso en el ADN, puede ser independiente de los niveles de expresión. Con base en esto se evaluó la unión de dicho factor de transcripción a la secuencia RE1 en el promotor de genes blanco relacionados con la fisiopatología de la ELTM.

6.3 Unión de REST/NRSF a la secuencia RE1 en el promotor de los genes GRIA2 y GABRD

Tras determinar que REST/NRSF está sobreexpresado en hipocampo de nuestro grupo de pacientes con ELTM, es importante evaluar el papel de dicha sobreexpresión sobre la regulación de genes que participan activamente en los procesos fisiopatológicos de este tipo de epilepsia. Genes como GRIA2 (gen que codifica para la subunidad GluR2 de los receptores AMPA) y GABRD (gen que codifica para la subunidad δ de los receptores GABA_A) están involucrados en procesos relacionados con excitabilidad e inhibición y poseen sitios RE1 en sus secuencias promotoras. Con base en lo anterior, se determinó por primera vez en tejido humano, la unión de REST/NRSF a las secuencias

RE1 localizadas en el promotor de los genes GRIA2 y GABRD. También se evaluaron las diferencias en la unión de REST/NRSF a la secuencia RE1 de dichos genes, en hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM. Para ello se realizó inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), la cual permite evaluar la asociación de cualquier proteína con una secuencia específica de ADN mediante el uso de un anticuerpo contra la proteína de interés. La ChIP se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

6.3.1.1 Identificación de las secuencias RE1 en los promotores de GRIA2 y GABRD en corteza cerebral de autopsia

Como se ha descrito anteriormente, REST/NRSF se une a los sitios RE1 en las regiones promotoras de sus genes blanco (Roopra et al., 2001). Partiendo de la secuencia canónica antes descrita, se evaluaron dos sitios RE1 hipotéticos para los genes GRIA2 y GABRD en corteza cerebral de autopsia (Figuras 8 y 14). La secuencia 2 del gen GRIA2 mostró resultados positivos a la amplificación, mientras que para GABRD fue la secuencia 1, es decir, solo un sitio en cada gen fue positivo para la unión de REST/NRSF (Figura 14A). Estos datos correlacionan con estudios *in vitro* en los que se ha demostrado que REST/NRSF se une a la secuencia RE1 del gen GRIA2 (Myers et al., 1998) y GABRD (Schoenherr et al., 1996).

Cada uno de los 21 nucleótidos de la secuencia canónica muestra una contribución diferencial para la unión de REST/NRSF. En dicha secuencia, las posiciones 2 a 9 y 12 a 17 son las que presentan menos variaciones y por lo tanto se les considera posiciones centrales (Figura 14B) (Wu y Xie, 2006). A pesar de presentar variaciones en dichas posiciones centrales, los sitios RE1 correspondientes a la secuencia 2 del gen GRIA2 y a la secuencia 1 del gen GABRD mostraron una homología del 80.1 % y 76.2 % respectivamente (Figura 14B). Al respecto, se ha reportado que en neuronas menos del 10% de los sitios RE1 son 100% homólogos con la secuencia canónica, la mayoría solo presenta fragmentos de dicha secuencia (Rockowitz et al., 2014). Por otra parte, varios estudios de genoma completo han analizado el sitio RE1 y han identificado diversos sitios de unión de REST/NRSF con nucleótidos variables. Estas variaciones son determinantes ya que de ello dependen las afinidades de unión y por lo tanto la predilección de los factores de transcripción por una secuencia en particular (Wu y Xie, 2006, Schoenherr et al., 1996). Al respecto, es importante notar que estas posiciones determinantes se pierden en las secuencias de los primers que no amplificaron tanto de GRIA2, como de GABRD.

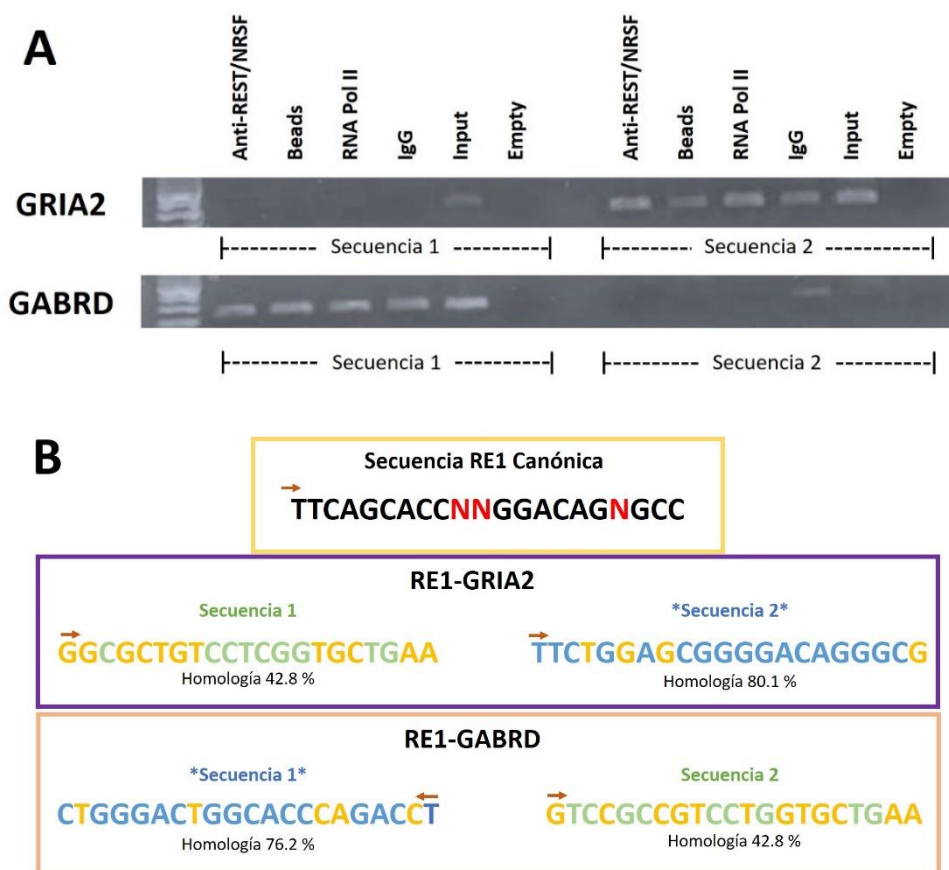


Figura 14. Determinación de los sitios RE1 de los promotores de los genes GRIA2 y GABRD. A) Amplificación de los dos sitios RE1 hipotéticos. Solo la secuencia 2 del gen GRIA2 fue amplificada, mientras que para el gen GABRD fue la secuencia 1. **B)** Secuencias nucleotídicas de los sitios RE1. En la caja amarilla se muestra la secuencia canónica de los sitios RE1. La N en rojo indica que puede variar el nucleótido de esta región. En la caja morada se muestran las secuencias de los dos sitios RE1 hipotéticos para el gen GRIA2, mientras que las del gen GABRD se muestran en la caja rosa. Las secuencias positivas a la unión de REST/NRSF se muestran en azul y las negativas en verde. En todas secuencias se señala el porcentaje de homología con respecto a la secuencia canónica y en amarillo los nucleótidos que varían con respecto a dicha secuencia. Las flechas de color marrón indican el sentido de “lectura” por parte de REST/NRSF.

Bajo las condiciones experimentales planteadas, la localización genómica de la secuencia RE1 del gen GRIA2 se encontró en la región 3, banda 2 y subbanda 1 del brazo largo (q) del cromosoma 4 (4q32.1). Su ubicación está comprendida entre 157220826-157220847 del cromosoma 4 (Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p12 Primary Assembly) y en la posición +160 del gen, es decir, en el primer intrón. Con respecto a la localización genómica de la secuencia RE1 del gen GABRD, se encontró en 1p36.33. Su ubicación está comprendida entre 2016159-2016180 del cromosoma 1 (Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p12 Primary Assembly) y en la posición -3150 del promotor de GABRD (Figura 15).

GABRD - 1p36.33

2015818
5'- TAGGAGCACACCCCCATCTCAAACGGGGAGACTTCCATTGATGGAGATCGGCCTTGTACTGATTGTGAAAACCTCACCAGAGCCTCGTT
CGGAGGGTGGTTCCTCCACAGGACAGGAGATGGGCATAACCTCCAGTATCCCCAGAGAGCGGCAGCCAGGTCTCTGCAAAGTGGGT
AGTCACGTGCAAAACAAAACAACCTGAGACGCTTCTAACAGAGTTTCAGCACCTCTGACACTAAGAAAACCAATCACGACTCTCACCTGTGTC
ATTTTGTAAAAGAAGAAAACAAAACCTGGGAAATAAATTCGCTGAGGTACACAGCCAGTTGGAGCAGAGCTGGGACTGGCAGCCAGACCT
CTGACTCCTGGAGCTTCTCCAGATTCTTTGAAAGGGGCCAAGAAGTGAGCTGCTTCCATCTCATGGGCACAGAAAACCTCCCTGCTGGGGC
TCACATCCACCAGGTGCCAGCCACACAGGCCCCAGTCACACAGGCCCCGGCTCCTGACCCTGGGCCAGGCTGCTCCCCGGCTGGCCTTCC
TGGTGTGGCGTGGTCCGAGCTTCCCTGGGTGGAGGATGAGGCTAAGGAAGCCGACTGGTTATGCACATCACAATGGGATGGAAGTTCGGA
AATGGCAACAAAATAATTCTCAAAAACCTTAAAAAGAAATTATGAAAATTCCTGTTTCAGATCCAAACTGAAACATCAGTTAGGAGGC
CGGGTGTGGTGGCTCACGCTGTAATCCAGCAGCTTTGGAGGCCGATGTGGGCCGATCACTTGAGGTGAGGAGTTGAGACCAGCCTGGC
CAACATGGTGAACCTGTCTACTAAAAATACAAAAATAGCTGGGCATGGTCGAGGCCCTGTAATCCAGCCACTTGGGAGGCTGA
GGCAGGAGAATTGCTTGAACCCAGGAGGTGGAGGTTGCAATGAGCTGAGATAGTGCCACTGCCCTCCGGCCTAGGCAACAAGAGCGAAACT
CCATCTCAAAAACAAAAGAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAACCCAGTTAGGAACAATAAAGAATGGAATGAAGTGTG
CAGACTTCAAACTTGCAGAACTGTGAATGATGGATGGACATGCATTTGCCCTTAGGACTGAAGGAAGAGGACAATTTGATGCCAC
CAAACCACAGATATTTGGCTAAGATGCCCGCCAGCTTCAACTGACATACACACAACAGCAGCAGCTTTCCAGCAAAGTTCAACATTGGC
TGGGCACGGAGGCTCATGCCTGCAATCTCAGCAGCTTTGGGAGGCCACGGGGAGGATCCCTTGAGGCCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGGA
AACATAGTGAGACCCCATCTCTACAAAAATAGAAAATTATCTGGGTGCGATGACATGCCTCTGTGGTCCCAGCTCCTCCAGAAGCTGAGG
TGCAAGGATCCCTTGAACCCGGGAGGTGGAGGCTACAGTGAAGTGGATCGTGCCACTGCACCTCCAGCCTGGGCCACAGAGCAAGACCTTG
TCTCTTAAAAGAAAAGAAGAAAATTGAATGTTAATTTTATGCCCCAGATAATAGAGGAGCGTGAAGAAAATGGCAATAGGGTGTGGCTTA
TCCTGAATGAATCGGATCCAGTGAATCAAGTCAAGTCAACGCTGCTTCTCAGAGTGATCAGCACCAGATATCTCAGATAAGCTCTTCGCAGA
TATTGAAGGATTCGACCATGAACCACTCTCACTGCTTAGTTCCAAAGCTCAGGAAGGAAAGACAGGGAGGGGGGCCTGTCCGGAGG
CAGTGTGGCGTGTGGCCGAGTGGGTGCATGGACTTTGAGATGTGGAGTCTGCACCTCCTCCTACATTTGCTGAGCACCTACTTCATC
CAATACACCACCAAGGAGAAGACGGACAAGACCCCTGTTCTGGAGGGGAAGAATAAAAAATAATGCCTCTCACCGGGGCGGGCCAAAGCT
CTGGGCACCTCTTCATGAATTAATCCTAAATTAATCCATGGAAGGGACAGTGGGAAGGGGCACGTTGTCAGAGCACAGGCTCGGACAGG
AAACCCGGGAACACAGGAGGTCAGTGTCTGTACCCAAAGGCCCTCTCGGCAGGGCCAGTGAGCAGCCGGGAAGGGGGCCTTGGAG
TTGAGACCTGTGGGGTGTGTAGAGCCCGTTCCTTGATTTAAGAAAGCAGGCTAGGGCTGGGTGCAAGTGGCTCACGCTGTAATCCCAGC
ACTTTGGGAGGCGAGGCGGGGGATCACGGGTCAGGAGTTGAGAGCAGGCTGGCCAACATGGTGAATTCCTGTCTGTACTAAAAGATAC
AAAAAATAACCGAGCGTGGTGGCAGGTCCTGTAATCCCACCTACTCGGGAAGCTGTGGCAGGAGACTTGCTTGAACCTGGGAGGCAGAA
GTTGAGTGAGCCGAGATTTGCTCCAGCCTGGGTAACAGAGCCAGATTCATCTCGAAAAATAACATAACATAACATAACATAAC
ATAACATAACATAACATAACATAAAATAAGCAAGCAAACTGGAACAGCCCTCATTCTCCACTTCCCACAGTAGGGATTGGGCTGG
AAATTCGGAAGCAATCCCTCTCTGCACTTCTCCTCCACCTGCCCTGTGCGGCCAGGGCCCTTCATCCAGAAGCAGCAGCCTCGGGGACA
GCTTCGCCATTTTTAAGTGTTCACGAGGGGTGACACTGTGTGTGTCAGCGACATCGCGAGCCAGAAGTGAATAACTGACACAACAATG
ATTAAAGTTTGTGAGCAGCTTCAGGAAATGGCAGCGCAACTTTATGTTCAAAGATCCAAGGCAGGAGAGTGTGAGGCCCTCCCTTTCCCA
GATCCTAGGGGTGTGGAGGGCGGGCTGGGGCCATGAGAGGTGTGGAGAGTCAAGAACTGCGGCTGCGGCGCAGCCCCACCTGCTTTTCC
TCTCCCCGCCCCGTCGAGGGTCCCAGGGATCAGGACTTGCTCCAAAGTCGCTGGCCCCAGCTCCCAGCAAGGAGGAGGGTTTGGGA
AGCAGCCGCTGGTGGGGTCTCTCTCTGACAGCTGCAGGGACTGGCCCCCTCCCACCACCAGCCGCGGCGAGCCAGAAGCAGCCACGAG
ACGTGCGACCCCCACAAACCCCTCGGGACGAGGTTCTGCCGCGCCGTGGGCCACAGTGTCCACCGGGGCTTGTGCGGTTGTGCGCTC
CCATGAAGACACCCGAGGGTCCCGTCTGCGGCGGTGAGGGCAGCGGTCCCAGAGAGCCAGACCCGCGCAGGAGAGCTGCCCGGAGG
GAGGGGGCGCGCTGGCGGAGGGGGCGGGATGGGGCGGGGGCGGGGGAGGAGGGGAGCGCGGGCGGGGGCGGGCTGCAGGGAGCGG
GCGGGCTGGGGCGGGCTCGGGGCGGGCTCCGCGCTCCGTCGCCCCCCCTCGCGCCGCGCGCGCTCGCTCAGCTCCCAGCCCGCTGTGCCG
CCTGTGCGGCGCGGGGAGCCAAAGTTTGCAGGACCCCGTCCCAGCCCGCGCGGCCATGGACGCGCCCGCGCGCTGTGCCCCGCTC
CTGCTCCTCTGCGCGCAGCAGCTCCGCGCACCAGGTGAGCGGGCGGGGTCCGCGCGCGCGGGGTGGGGGGCGGGTGGG -3'

Primer Forward
Primer Reverse
Sitio RE1 (Sitio 1)
Inicio

GRIA2 - 4q32.1

```

157220182
5'- GTTTTCACAGGAGATGGAAGATAAAAAATCAAAATATATTTGTAACGTAAGACAGCAGGGCCCTGGTGAGAGGACGCTTCGCCGCCAACAAATTA
GCAATTCGGCTTCTACACAGCAGCCGGAGATCAGCTTTGCTGCATTTGGTCCAGGTTGGAGCATCTCCGACAGCTGCAACAGCCGACAG
AAGGTAGCTCCGGGGGGGAGCAGGCGCTGTCTCGGTGCTGAAAGGCCAGGCGCGGGTGGGCGCAGACCCCGGAGACCCGAGGTC
TCGCGGAGGGACAGCGGCTACGGGCCCGAGCTGTGCTTTCTCAGCGCCGCGCACGCGCGTCCACGGTGGTGGGGGTGCCGGGCGCC
GTGCGGGGGAGGGGGCGCGCTCCGCCTCTGCCGAGTCGCGCACGCGCGCCGGGACTGCCTGCCCTCTCTGTGACTTGCCCTGTG
TGTGTGCGTGTGTATGTGTGTGTGTGTTGTTGTGTGCGCGCGCGCTGAGTGAGAGAGGAGAGAGGGGAGAAGAGAGCGCGAGAGAGGGT
GAGTGTGTTGTGAGTGCATGGGAGGGTGTGAATATCCGAGACACTGGGACCACAGCGGCAGCTCCGCTGAAACTGCATTCAGCCAGTCC
TCCGGACTTCTGGAGCGGGGACAGGGCGCAGGGCATCAGCAGCCACCAGCAGGACCTGGGAAATAGGGATTTCTTCTGCCTCCACTTCAGGT
TTCAGGATTTCTGGAGCGGGGACAGGGCGCAGGGCATCAGCAGCCACCAGCAGGACCTGGGAAATAGGGATTTCTTCTGCCTCCACTTCAGGT
TTTAGCAGCTTGGTGCTAAATGTCTGTCTCAAATGCAGAGGATCTAATTTGCAGAGGAAAACGCCAAAGAAGGAGGAGGAAAAGGA
AAAAAAAGGGGTATATGTGGATGCTCTACTTTTCTTGAAAATGCAAAGATTATGCATATTTCTGTCTCTCTTCTCTCTGTTTTATGGG
GACTGATTTTTGGTGCTCTTCTAACAGCATAACAGATAGGTAGGTACCCTTTTGCTGTATGCTTTTGAATTGTGCATAATTTGGTGGTAAT-3'
    
```

Figura 15. Localización de las secuencias RE1 en los genes GRIA2 y GABRD. La secuencia de arriba muestra el sitio RE1 del gen GRIA2 en la posición +160 (caja gris) y en la posición 2016159 del cromosoma 1. La secuencia de abajo muestra la localización de la región RE1 en el sitio -3150 del promotor de GABRD (caja gris) y en la posición 157220826 del cromosoma 4. En ambos casos, el sitio de inicio de la transcripción se muestra con una caja azul y los sitios de hibridación de los cebadores utilizados para el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Al respecto, se ha descrito que, en diferentes tipos de células, incluyendo neuronas, los sitios RE1 se pueden localizar en diversos sitios del genoma. Si bien, la mayor parte se concentra en las regiones promotoras de los genes, también se encuentran en intrones, exones, regiones intergénicas y sitios distales (Rockowitz et al., 2014, Johnson et al., 2007).

6.3.1.2 Unión de REST/NRSF a las secuencias promotoras de GRIA2 y GABRD en hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM.

Tras haber determinado los sitios RE1 en los promotores de los genes GRIA2 y GABRD en tejido cortical humano, se evaluó la unión de REST/NRSF en tejido hipocampal de nuestros grupos de autopsias y pacientes con ELTM. Considerando al *input* como el 100%, para GRIA2 se encontró que en autopsias hay un 2.5% de unión, mientras que en pacientes es del 5.87% (Figura 16). Es decir, el enriquecimiento de REST/NRSF sobre la región RE1 es 3.37% mayor en pacientes que en autopsias. Con respecto a GABRD se encontró que en autopsias hay un 4.37% de señal y en pacientes un 11.48% (Figura 16), lo cual indica que en pacientes el enriquecimiento es 7.11% mayor

que en autopsias. El incremento en la expresión de REST/NRSF demostrado previamente (Figura 11) podría estar asociado con el enriquecimiento en los sitios RE1 de los genes GRIA2 y GABRD. Dicho incremento parece suponer una mayor disponibilidad del factor de transcripción para unirse a las secuencias RE1 en los genes blanco.

A pesar de que la expresión proteica de REST/NRSF se incrementó con la edad en nuestro grupo de autopsias (Figura 10), los niveles son bajos en cerebro maduro (Lu et al., 2014). Estos niveles bajos de REST/NRSF indican que la disponibilidad para unirse a los promotores es menor. Sin embargo, un estudio en ratas neonatales normales ha demostrado que cuanto más maduras son las células hipocampales hay una mayor especificidad de unión de REST/NRSF al sitio RE1 de GRIA2. Dicha especificidad de unión no cambia con situaciones estresantes como la deprivación maternal (Rodenas-Ruano et al., 2012). Es decir, en neuronas normales adultas, a pesar de los bajos niveles de REST/NRSF, su especificidad de unión al sitio RE1 de GRIA2 es alta y se mantiene constante incluso en situaciones estresantes. Por lo tanto, el enriquecimiento en GRIA2 de autopsias puede ser considerado como la unión basal de REST/NRSF al sitio RE1. Por otra parte, si bien no existen estudios que avalen el enriquecimiento basal en GABRD en autopsias, es posible considerar que la especificidad y disponibilidad de unión de REST/NRSF a un sitio RE1 sea similar en el mismo tejido (hipocampo) y bajo el mismo microambiente.

Nuestros resultados sugieren que el sitio RE1 del gen GRIA2 de nuestros pacientes con ELTM farmacorresistente tienen un mayor enriquecimiento de REST/NRSF con respecto a nuestro grupo de autopsias. Estos resultados están similares a lo encontrado en células humanas de gliomas en donde se observó el enriquecimiento de REST/NRSF en el sitio RE1 del gen GRIA2 (Ekici et al., 2012). También en modelos experimentales de isquemia, se observó el incremento de REST/NRSF en la región CA1 del hipocampo y el enriquecimiento de este factor en el sitio RE1 del gen GRIA2 (Noh et al., 2012, Calderone et al., 2003). Además, un estudio *in vitro* demostró que una vez que REST/NRSF se une a su secuencia consenso en el gen GRIA2, recluta correpresores como Sin3A y HDACs con lo cual lleva cabo la represión transcripcional (Huang et al., 1999). Por otra parte, un estudio mostró que en células neuronales y neuroendocrinas REST/NRSF no regula a GRIA2 debido al microambiente represivo que rodea a la cromatina (Hohl y Thiel, 2005). Con base en este estudio, es posible sugerir que la ELTM induce un microambiente no represor de la cromatina y que debido a ellos REST/NRSF puede unirse a RE1 de GRIA2.

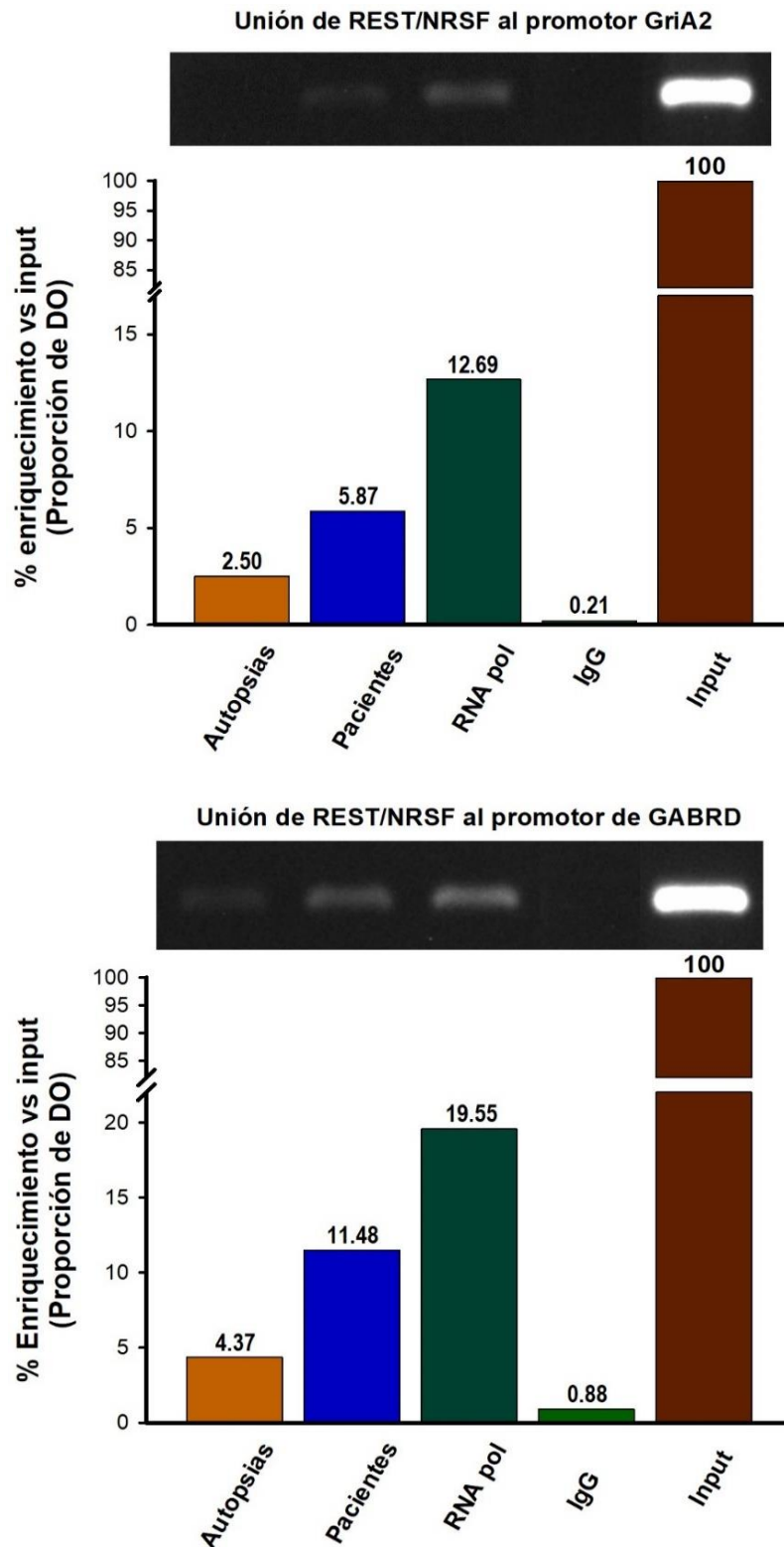


Figura 16. Unión de REST/NRSF a las secuencias RE1 de los genes GRIA2 y GABRD en hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM. Las gráficas muestran el porcentaje de enriquecimiento de REST/NRSF sobre la región RE1 de los genes GRIA2 (arriba) y GABRD (abajo), tanto para autopsias y pacientes con ELTM. También se muestran los porcentajes de enriquecimiento al inmunoprecipitar la cromatina con anti-RNA Pol II (control positivo) y anti-IgG (control negativo). El *input* es el ADN total, por lo que su amplificación se considera el 100%.

La unión de REST/NRSF a sitios RE1 del gen GABRD ha sido menos estudiado. Algunos estudios señalan la presencia de sitios RE1 en el gen GABRD de rata y mediante estudios *in vitro* se ha demostrado la unión de REST/NRSF a los mismos (Schoenherr et al., 1996, Mu y Burt, 1999). Más recientemente en un ensayo *in silico* de alineamientos se mostró que dichas secuencias están conservadas en el humano (Joyce, 2007). Estos datos, están de acuerdo con nuestros resultados, los cuales mostraron que, en nuestro grupo de pacientes, el sitio RE1 del gen GABRD tiene un mayor enriquecimiento de REST/NRSF en pacientes con ELTM que en nuestro grupo de autopsias.

Se ha demostrado que, bajo las condiciones experimentales planteadas, el ARNm y proteína de REST/NRSF están sobreexpresados en pacientes con ELTM y que dicho incremento correlaciona con el porcentaje de unión a los sitios RE1 en los genes GRIA2 y GABRD. Sin embargo, un estudio ha reportado que incluso cuando hay un *match* perfecto con el sitio RE1 canónico, la unión de REST/NRSF podría ocurrir de manera aleatoria y por lo tanto no necesariamente implica que sea funcional (Bruce et al., 2004). Con base en lo anterior, es importante determinar que la unión de REST/NRSF a los sitios RE1 de los genes GRIA2 y GABRD no sea un hecho aleatorio. Así, cabría esperar que los niveles transcripcionales de dichos genes se encuentren disminuidos como consecuencia de la sobreexpresión de REST/NRSF y el incremento en su unión a los sitios RE1. Al respecto, fue necesario evaluar los niveles de expresión de ARNm y proteína de GluR2 y GABA_{Aδ}.

6.4 Expresión transcripcional de GRIA2 y GABRD en hipocampo de pacientes con ELTM y su asociación con la sobreexpresión de REST/NRSF

Además de demostrar la sobreexpresión de REST/NRSF en hipocampo de pacientes con ELTM, nuestra evaluación experimental sugiere que dicho incremento podría estar asociado con un mayor enriquecimiento de este factor a sus secuencias RE1 en los genes GRIA2 y GABRD. Sin embargo, la unión de REST/NRSF a sus secuencias consenso no garantiza que sea parte de un mecanismo transcripcional funcional. Con base en lo anterior, fue importante evaluar la actividad transcripcional de los genes GRIA2 y GABRD en hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM. Para ello, en nuestros grupos de pacientes y autopsias, se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de GluR2 y GABA_{Aδ} mediante retrotranscripción seguida de PCR en tiempo real y se asociaron con el enriquecimiento de REST/NRSF en los respectivos genes. La expresión de ARNm de

GluR2 y GABA_{Aδ} se correlacionó con las variables clínicas y con las comorbilidades psiquiátricas.

Para la evaluación de los niveles de expresión de ARNm de GRIA2 y GABRD se tomaron las muestras de 13 hipocampos de autopsias y 28 hipocampos de pacientes con ELTM descritos previamente en las secciones 5.2 a 5.5. En dichas secciones se describen también los datos clínicos y demográficos de las autopsias y los pacientes. Bajo las condiciones experimentales plateadas, no se encontraron correlaciones significativas entre el IPM de las autopsias y los niveles de expresión de ARNm de GluR2 ($r=0.238$, $p>0.05$) y de GABA_{Aδ} ($r=-0.0609$, $p>0.05$) (Tablas 10). Estos resultados indican que el IPM no afectó la integridad del ARNm de las autopsias y, por lo tanto, los valores de expresión son viables para ser usados como controles.

Tabla 10. Correlaciones entre los niveles de ARNm de GluR2 y GABA_{Aδ} con las variables clínicas de las autopsias y pacientes con ELTM

Variables clínicas	GluR2		GABA _{Aδ}	
	Autopsias	Pacientes	Autopsias	Pacientes
Edad (años)	-0.574*	-0.483*	0.0696	-0.0356
Edad de inicio de crisis (años)	--	-0.105	--	-0.0895
Duración de la epilepsia (años)	--	-0.232	--	0.0213
Frecuencia de crisis (por mes)	--	-0.448*	--	-0.443*
Número de FAEs previos a la cirugía	--	-0.187	--	-0.142
Intervalo Post-Mortem (horas)	0.238	--	-0.0609	--

FAEs, Fármacos Antiepilepticos. Los valores son coeficientes de correlación de Pearson (r). * $p<0.05$

Los resultados mostraron que, en comparación con el grupo de autopsias, en hipocampo del grupo de pacientes con ELTM, los niveles de ARNm de GluR2 y GABA_{Aδ} disminuyen un 36.2% ($p<0.05$) y un 28.3% ($p<0.05$) respectivamente (Figura 17). Estos datos, junto con el incremento en la unión de REST/NRSF a los sitios RE1 asociado a su sobreexpresión, sugieren que dicho factor podría estar participando en el silenciamiento transcripcional de los genes GRIA2 y GABRD en pacientes con ELTM (Figura 17).

Con respecto a GluR2, son varios los estudios que reportan el decremento en los niveles de ARNm en hipocampo de modelos experimentales de crisis convulsivas asociado a la pérdida neuronal (Grooms et al., 2000, Huang et al., 2002, Friedman et al., 1994, Friedman, 1998). El mecanismo de represión transcripcional de GluR2 está influenciado por los diversos elementos regulatorios encontrados en la región 5' proximal

del promotor, en el cual se encuentra una zona rica en CpGs propensa a ser metilada, así como el sitio RE1 para la unión de REST/NRSF (Myers et al., 1998, Huang et al., 1999, Huang et al., 2002). La represión transcripcional ejercida por REST/NRSF ya se ha demostrado en diversos modelos *in vitro*, así como en modelos experimentales de isquemia y de daño excitotóxico neuronal (Noh et al., 2012, Myers et al., 1998, Jia et al., 2006). Además, se ha reportado que la represión transcripcional de GluR2 por parte REST/NRSF es mediada por los factores neurotróficos BDNF y GDNF (Brene et al., 2000). Se ha demostrado que una vez que REST/NRSF se une a su secuencia consenso en el gen GRIA2, recluta correpresores como Sin3A y HDACs con lo cual lleva cabo el silenciamiento génico (Huang et al., 1999). Por otra parte, existe un estudio que muestra que los niveles de ARNm de GluR2 (evaluado mediante southern blot) no cambian en pacientes con ELT (Grigorenko et al., 1997).

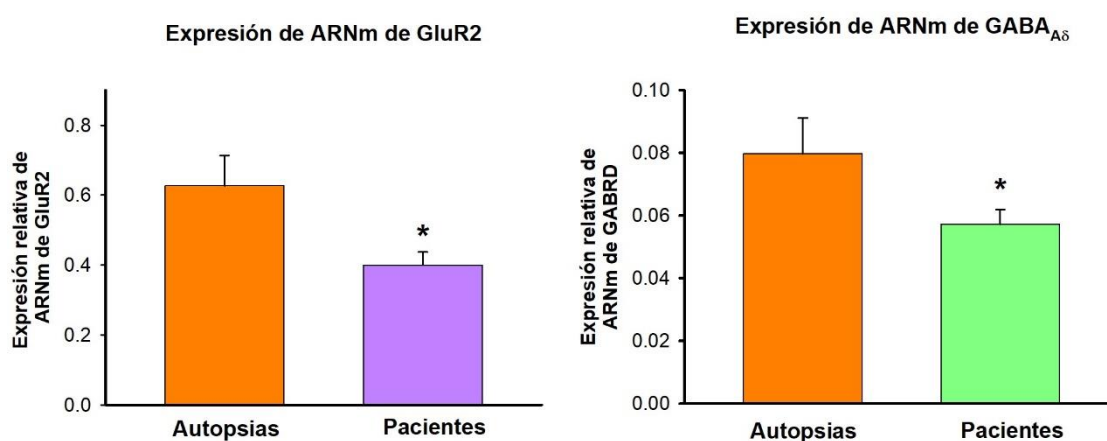


Figura 17. Expresión de ARNm de GluR2 y GABA_{Aδ} en hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM farmacorresistente. Las gráficas muestran la expresión relativa de ARNm de GluR2 (izquierda) y de GABA_{Aδ} (derecha). Los resultados están expresados como media ± EEM. T-test * p < 0.05.

Con respecto a GABA_{Aδ}, en un modelo experimental de epileptogénesis se demostró la disminución de los niveles de ARNm desde antes que ocurrieran crisis espontáneas (epilepsia) (Joshi et al., 2017). Dicha disminución en los niveles de ARNm de GABA_{Aδ} también se observa en pacientes con esquizofrenia (Maldonado-Aviles et al., 2009). En el mecanismo de represión transcripcional de GABA_{Aδ} participan diversos elementos regulatorios, tal como regiones ricas en CpG propensas a ser silenciadas por metilación, así como deficiencia de cajas TATA y CCAAT canónicas (Sommer et al., 1990b). Además, un análisis *in vitro* demostró una débil represión transcripcional de

GABA_{Aδ} mediada por REST/NRSF al unirse al sitio RE1 en la región regulatoria del promotor de GABRD (Schoenherr et al., 1996).

Una vez que REST/NRSF se une a los sitios RE1 a través de su dominio de dedos de zinc, recluta a otros factores represores. En el extremo -N terminal recluta a Sin3A y Sin 3B, los cuales son necesarios para reclutar HDACs, mientras que en el extremo -C terminal recluta a CoREST, un componente de los complejos HDAC (Roopra et al., 2001).

6.4.1 Correlación entre los niveles de ARNm de GRIA2 y GABRD con las variables clínicas y la sobreexpresión de REST/NRSF

El análisis de correlación reveló que, bajo las condiciones experimentales planteadas, la expresión de ARNm de GluR2 disminuye con la edad tanto en autopsias ($r=-0.574$, $p<0.05$) como en pacientes con ELTM ($r=-0.483$, $p<0.05$) (Figura 18, Tabla 10).

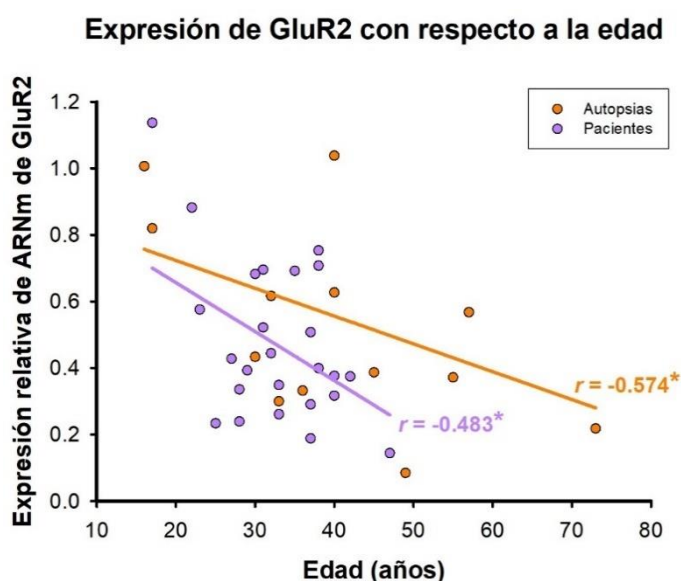


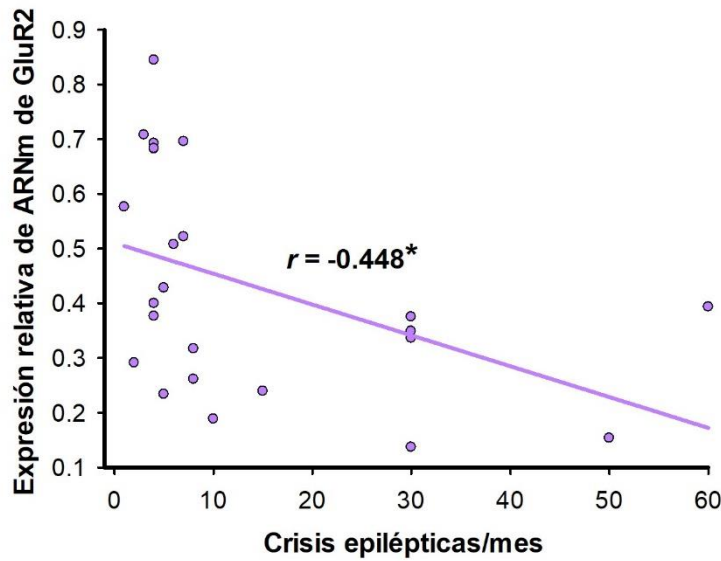
Figura 18. Correlación de la edad con la expresión de ARNm de GluR2 en hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM farmacorresistente. La gráfica muestra las correlaciones entre la expresión relativa de ARNm de GluR2 con respecto a la edad de las autopsias (puntos y línea naranja) y de los pacientes (puntos y línea morados). r indica el valor del coeficiente de correlación de Pearson. * $p < 0.05$.

En autopsias estos datos correlacionan con un estudio previo en que se demostró que en ratones hay un incremento gradual de ARNm de GluR2 en etapas tempranas del desarrollo el cual disminuye en la etapa adulta (Pandey et al., 2003). Además, es importante notar que estos resultados son inversamente proporcionales a los niveles proteicos de REST/NRSF asociados a la edad de las autopsias (Figura 10, Tabla 9) y que dicho factor se une a su secuencia RE1 en el gen GRIA2 (Figura 16). Consideremos que los factores de transcripción son elementos de naturaleza proteica que regulan el proceso transcripcional (Aerts, 2012). Por lo tanto, es de esperarse que el incremento de la proteína

REST/NRSF, un factor de transcripción represor conlleva a una disminución en los niveles de ARNm de GluR2 y otros genes blanco. En cuanto a los pacientes, no hay evidencia que relacionen a la edad con los niveles de ARNm de GluR2, sin embargo, nuestros resultados parecen sugerir un efecto conjunto entre la edad y la sobreexpresión de REST/NRSF. Es decir, aunado al efecto represor de REST/NRSF, cuya sobreexpresión parece ser un proceso propio de la ELTM e independiente de la edad (Figura 10, Tabla 9), están los mecanismos que de manera normal inducen el decremento en el ARNm de GluR2 asociado al envejecimiento. Por otra parte, es importante considerar que GluR2 es un factor asociado con la respuesta al estrés oxidativo y por tanto asociado a los procesos de envejecimiento (Patel y Li, 2003). Dicha situación no ocurre con GABA_{Aδ}, el cual de manera normal tiene una baja expresión en el hipotálamo (una zona de respuesta al estrés) y, por lo tanto, no se considera un factor fundamental en el proceso de envejecimiento (Whissell et al., 2015). Con base en lo anterior, era de esperarse que, bajo las condiciones experimentales planteadas, nuestros resultados no muestren correlación significativa entre los niveles de ARNm de GABA_{Aδ} y la edad de autopsias y pacientes.

El análisis de correlación mostró que, bajo las condiciones experimentales planteadas, a mayor frecuencia de crisis epilépticas los niveles de ARNm de GluR2 y GABA_{Aδ} disminuyen ($r=-0.448$, $p<0.05$ y $r=-0.443$, $p<0.05$, respectivamente) (Figura 19, Tabla 10). Estos resultados son inversamente proporcionales a los niveles proteicos de REST/NRSF asociados a la frecuencia de crisis (Figura 12, Tabla 9). Por lo tanto, es de suponer que, si la ocurrencia de las crisis epilépticas conlleva a un incremento proteico de REST/NRSF, los niveles de ARNm de GluR2 y GABA_{Aδ} disminuyan en función de dicho incremento, sobre todo, teniendo en consideración que el incremento en la expresión de REST/NRSF también se asocia con una mayor unión a las secuencias RE1 de GRIA2 y GABRD (Figura 16). Al respecto, en un estudio previo en ratones, se determinó que la expresión de GluR2, como marcador de células musgosas glutamatérgicas, disminuye con la frecuencia y duración de las crisis convulsivas (Hester y Danzer, 2013). Dichos resultados no concuerdan con un estudio similar realizado en ratones, en el cual no encontraron correlación significativa entre la expresión de GluR2 y la frecuencia de crisis (Buckmaster et al., 2017).

Expresión de ARNm de GluR2 con respecto a la frecuencia de crisis epilépticas



Expresión de ARNm de GABA_{Aδ} con respecto a la frecuencia de crisis epilépticas

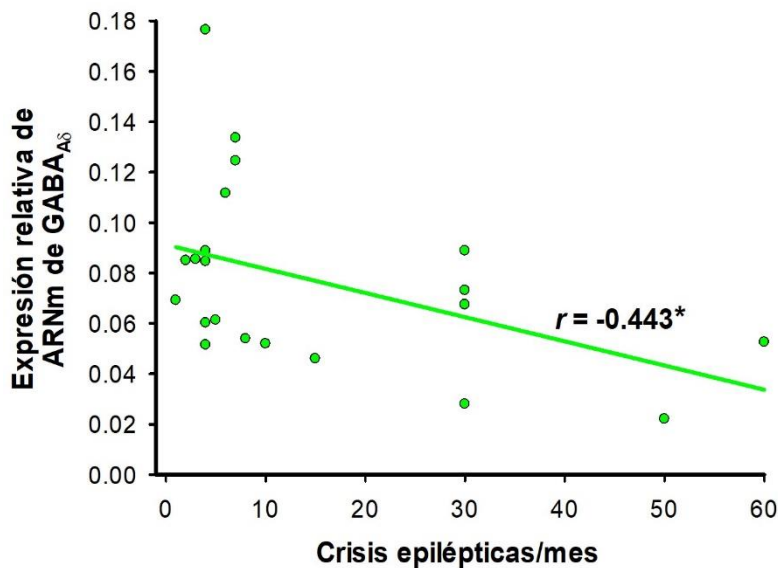


Figura 19. Correlación entre la frecuencia de crisis epilépticas y la expresión de ARNm de GluR2 y GABA_{Aδ} en pacientes con ELTM farmacorresistente. Las gráficas muestran la correlación entre la expresión relativa de ARNm de GluR2 (arriba) y GABA_{Aδ} (abajo) y el número de crisis epilépticas por mes. r indica el valor del coeficiente de correlación de Pearson. * $p < 0.05$.

Por otra parte, no existen evidencias previas que asocien directamente la expresión del ARNm de GABA_{Aδ} con la frecuencia de crisis epilépticas. En un estudio se evaluó el efecto de ganaloxxona, un neuroesteroide agonista de los receptores GABA_A

extrasinápticos, el cual a dosis altas se une a los receptores que poseen la subunidad δ . La administración de ganaxoxona a pacientes con espasmos infantiles redujo la frecuencia de crisis en al menos el 50% en un tercio de los pacientes (Kerrigan et al., 2000). En otro estudio en ratones evaluaron el efecto de los neuroesteroides derivados de la progesterona en el ciclo ovárico, demostrando que en la fase de diestro (altos niveles de progesterona), la expresión de los GABA_{A δ} aumenta y la latencia de las crisis se incrementa (Maguire et al., 2005).

Nuestros resultados sugieren la participación de REST/NRSF en el silenciamiento transcripcional de GRIA2 y GABRD, sin embargo, futuros estudios deberán ser conducidos para confirmar esta hipótesis. La utilización de modelos transgénicos cuya expresión de REST/NRSF se vea modificada (*knock down* o *knock out*) se presenta como una opción viable para evaluar la regulación de dichos genes bajo niveles definidos de REST/NRSF. Así también, interferir la expresión o función de REST/NRSF mediante el uso de antagonistas, miRNAs, oligonucleótidos u otros compuestos, es otra forma de dirigir estas aproximaciones.

7 Discusión general

Este estudio estuvo enfocado en evaluar la expresión del factor de transcripción REST/NRSF y su participación en la regulación de la expresión génica de GluR2 y GABA_{A δ} en el hipocampo de autopsias y pacientes con ELTM fármacorresistente.

En nuestro grupo de autopsias, la expresión proteica de REST/NRSF fue dependiente de la edad, situación que no ocurre en pacientes con ELTM. Por otra parte, se demostró la sobreexpresión de REST/NRSF en hipocampo epiléptico bajo condiciones experimentales planteadas, aunque solo la sobreexpresión proteica correlacionó con la frecuencia de crisis. Además, la alta expresión de REST/NRSF fue más evidente en el grupo de pacientes sin ansiedad y depresión. Por otro lado, bajo las condiciones experimentales planteadas, se determinaron los sitios RE1 de los genes GRIA2 y GABRD humanos, los cuales están relacionados con procesos de excitabilidad e inhibición. Con base en lo anterior, se mostró por primera vez en tejido humano y bajo las condiciones experimentales planteadas que, la sobreexpresión de REST/NRSF en ELTM farmacorresistente podría estar asociada con el incremento en su unión a las secuencias RE1 de los genes GRIA2 y GABRD. Dicha situación correlacionó con un decremento en la actividad transcripcional de los genes mencionados. Además, el decremento en los

niveles de ARNm de GRIA2 y GABRD dependiente de la frecuencia de crisis epilépticas fue inversamente proporcional a los niveles de expresión proteica de REST/NRSF bajo las condiciones experimentales planteadas.

En acuerdo con nuestros resultados, las evidencias experimentales muestran que, tras la inducción de crisis convulsivas y epilepsia, los niveles de REST/NRSF se incrementan (Palm et al., 1998, Spencer et al., 2006). Dicha sobreexpresión de REST/NRSF induce la represión de genes requeridos para la homeostasis neuronal, lo cual acentúa la sobreexcitación de los circuitos neuronales e induce neurodegeneración (Hwang y Zukin, 2018). Al respecto se sabe que genes que codifican para canales iónicos de sodio y potasio (SCNA2, KCNQ2 y 3) son reprimidos por REST/NRSF, lo que contribuye a la progresión de la epilepsia (Chong et al., 1995, Mucha et al., 2010). Esto correlaciona con nuestros resultados que demuestran que a mayor frecuencia de crisis epilépticas los niveles proteicos de REST/NRSF incrementan, ya que dicha variable clínica es un marcador de severidad y de daño cognitivo (Thompson y Duncan, 2005, Hester y Danzer, 2013). Si consideramos que, a su vez, el incremento en la frecuencia de crisis y la severidad correlacionan con un aumento de células granulares del giro dentado anormales (Hester y Danzer, 2013), se podría sugerir la participación de REST/NRSF en el desarrollo de dicho evento fisiopatológico característico de la esclerosis mesial en ELT. Futuros estudios deberán ser conducidos para determinar esta hipótesis. En contraste, también se ha demostrado que la sobreexpresión de REST/NRSF es un mecanismo neuroprotector, ya que inhibe los canales y las corrientes de sodio acoplados a voltaje, con lo que las neuronas reajustan la actividad de disparo a un estado fisiológico. De esta forma, REST/NRSF dirige el control homeostático inhibitorio para controlar la excitabilidad intrínseca (Pozzi et al., 2013).

Por otra parte, se ha demostrado que la expresión aberrante de REST/NRSF está involucrada con la fisiopatología de diversos desordenes psiquiátricos, tales como esquizofrenia (Loe-Mie et al., 2010) y depresión (Otsuki et al., 2010). En un estudio realizado en sangre periférica de pacientes con Desorden Depresivo Mayor, se encontró que los niveles de REST/NRSF estaban disminuidos, mientras que genes que ‘inductores’ de depresión estaban aumentados (hormona liberadora de corticotropina, adenilato ciclasa 5 y factor de necrosis tumoral 12 y 13) (Otsuki et al., 2010). Lo anterior correlaciona con nuestros resultados al mostrar que los pacientes con ELTM con comorbilidades psiquiátricas tienen una menor sobreexpresión de REST/NRSF. De acuerdo con lo anterior, es posible sugerir la función dual de REST/NRSF en ELTM, ya que su

sobreexpresión parece favorecer la hiperexcitabilidad de las redes neuronales y a la vez disminuye los síntomas psiquiátricos. Dicha función dual representa una oportunidad en la búsqueda de opciones terapéuticas para ELTM, las cuales modulen la expresión de REST/NRSF para mantenerlo en niveles fisiológicos. Una de las estrategias experimentales ha utilizado silenciamiento de REST/NRSF mediante miRNAs, con lo cual se evitó la proliferación y migración de las células de glioblastoma (Zhang et al., 2016). En un estudio realizado en ratas, se realizó la administración intraventricular de oligodeoxinucleótidos que se unen selectivamente a REST/NRSF, evitando que se una a sus sitios RE1 en sus genes blanco y restaurando la expresión de estos (McClelland et al., 2014). Tal vez uno de los más prometedores es el uso de un derivado del benzoimidazol-5-carboxamida, denominado X5050, el cual al ser usado en un modelo *in vivo*, indujo la degradación proteica de REST/NRSF con una baja toxicidad (Charbord et al., 2013). También es importante mencionar un estudio en ratones en el cual se demostró que tras 8 semanas de ejercicio físico la expresión génica de REST/NRSF disminuye, teniendo un efecto benéfico sobre el envejecimiento (Dallagnol et al., 2017).

Considerando que en el genoma de mamíferos se han encontrado cerca de 2000 sitios RE1 en genes neuronales (Bruce et al., 2004), la modulación de los efectos de REST/NRSF es importante en ELTM. Es decir, REST/NRSF es un regulador maestro a nivel genómico, pero de manera específica regula un gran número de genes involucrados en la neurotransmisión excitatoria y en epileptogénesis (McClelland et al., 2014, Roopra et al., 2001). En este estudio mostramos, por primera vez en tejido humano epiléptico, datos preliminares de la unión de REST/NRSF a las secuencias RE1 de los genes GRIA2 y GABRD involucrados en procesos de neurotransmisión excitatoria e inhibitoria respectivamente. Este resultado sugiere que REST/NRSF podría participar activamente en la represión de dichos genes, lo cual correlaciona con la disminución en los niveles de ARNm. Adicionalmente el incremento de REST/NRSF es inversamente proporcional al decremento en el ARNm de GluR2 y GABA_{Aδ} asociados a la frecuencia de crisis. Al respecto se ha demostrado en cultivos de neuronas corticales que tras la exposición a ácido kainico, REST/NRSF media la represión de GluR2 a través de mecanismos epigenéticos, ya que induce la desacetilación de la histona 3 y 4 (Jia et al., 2006). Nuestros datos y las evidencias parecen indicar que en pacientes con ELTM, REST/NRSF forma parte de los diversos factores que regulan a dichos genes y sobre todo que participa como regulador maestro de la transcripción.

Si bien no existen estudios previos en humanos con ELTM, la evidencia experimental sugiere que la disminución en la expresión del ARNm que codifica para las subunidades GluR2 y GABA_{Aδ} podría acentuar las características fisiopatológicas del padecimiento. Se ha demostrado que en ratones transgénicos con una deficiente edición de GluR2, se reducen los niveles de ARNm, lo cual se asocia con el incremento en las corrientes de Ca²⁺ en neuronas piramidales del hipocampo, haciendo a los animales más susceptibles a las crisis convulsivas (Brusa et al., 1995). Por otra parte, en modelos de EE se ha demostrado que el ARNm de GluR2 disminuye tras las crisis convulsivas, pero se induce la transcripción de otras subunidades GluR, dando lugar a receptores AMPA permeables a Ca²⁺, lo cual vuelve a las neuronas más vulnerables a las crisis (Grooms et al., 2000, Friedman, 1998). Con respecto a GABA_{Aδ}, se ha demostrado que la disminución de su ARNm correlaciona con una disminución en las corrientes tónicas, evocando una respuesta epileptiforme secundaria a la pérdida de inhibición neuronal (Spigelman et al., 2002).

Como ya se ha descrito, los mecanismos funcionales de REST/NRSF no se restringen a su unión a los sitios RE1, pues solo es el inicio de toda una serie de eventos orquestados por este factor de transcripción. Uno de los mecanismos regulatorios de REST/NRSF es la remodelación epigenética, la cual ocurre como consecuencia del reclutamiento de factores correpresores como coREST y mSin3A (Ballas et al., 2001, Grimes et al., 2000), los cuales a su vez reclutan a HDACs que remueven a los grupos acetilo silenciando a los genes (Hwang et al., 2017) tal como ocurre con GluR2. REST/NRSF también se asocia con la metiltransferasa G9a (induciendo silenciamiento a largo plazo), con la demetilasa LSD1 y con MeCP2 (Proteína de Unión a Metil-CpG) (Roopra et al., 2004, Shi et al., 2005, Lombardi et al., 2015). Al respecto se ha demostrado que, en dolor neuropático, la asociación de REST/NRSF con G9a induce la marca epigenética represiva H3K9me2 en varios genes que codifican para canales de potasio (Laumet et al., 2015). Por otra parte, algunas mutaciones en el Dominio Proteico LIM de Interacción con REST (RILP, por sus siglas en inglés) evitan su interacción con REST/NRSF, lo cual produce un síndrome de epilepsia-ataxia mioclónica progresiva autosómica recesiva (Bassuk et al., 2008). También las mutaciones en KDM5C, una demetilasa de histonas, se ha asociado con epilepsia y retraso mental del cromosoma X, situación mediada por la interacción entre KDM5C y REST/NRSF (Tahiliani et al., 2007).

Con base en nuestros resultados y la evidencia presentada bajo las condiciones experimentales planteadas, se sugiere que REST/NRSF es un factor importante en

fisiopatología de la ELTM al participar de la regulación transcripcional de genes como GRIA2 y GABRD. Sin embargo, no podemos dejar de lado que los mecanismos funcionales de REST/NRSF permiten ampliar el panorama en la búsqueda de mejores opciones terapéuticas para la mejora en la calidad de vida de los pacientes con ELTM.

8 Conclusiones

Los resultados de este estudio indican que el factor de transcripción REST/NRSF está sobreexpresado en el grupo de pacientes con ELTM farmacorresistente en comparación con el de autopsias y que dicha sobreexpresión es menor en aquellos pacientes que presentan ansiedad o depresión comórbidas. Bajo las condiciones experimentales descritas, la sobreexpresión de REST/NRSF en pacientes con ELTM farmacorresistente correlaciona con un mayor enriquecimiento (versus autopsias) del factor de transcripción en los sitios RE1 de los genes GRIA2 y GABRD, los cuales codifican para la subunidad GluR2 de los receptores AMPA y para la subunidad δ de los receptores GABA_A respectivamente. La disminución en los niveles de ARNm de GluR2 y GABA_{A δ} en el grupo de pacientes comparado con el de autopsias, sugiere que el enriquecimiento de REST/NRSF en sus sitios consenso podría ser parte funcional del proceso transcripcional, y por lo tanto participa activamente en la regulación transcripcional de dichos genes. Esta situación se hace evidente con la relación inversa encontrada entre la sobreexpresión proteica de REST/NRSF y la disminución de los niveles transcripcionales de GluR2 y GABA_{A δ} asociados al incremento en el número de crisis epilépticas (Figura 20).

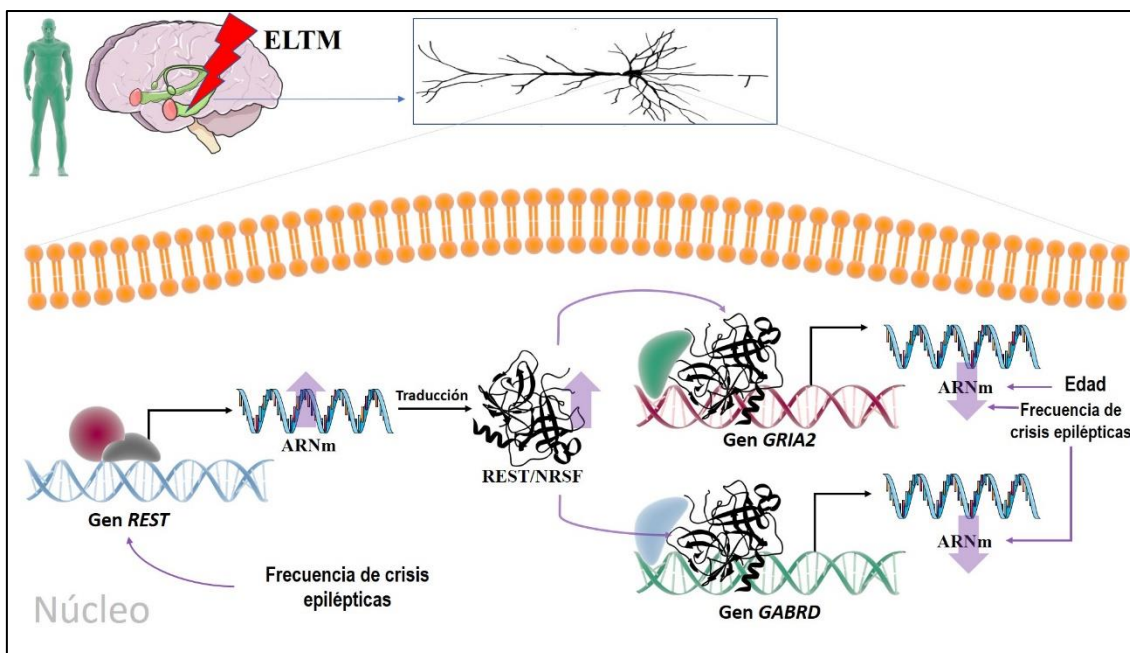


Figura 20. Modelo de regulación transcripcional de los genes GRIA2 y GABRD mediada por REST/NRSF en hipocampo de pacientes con ELTM.

9 Perspectivas

En este estudio se determinó por primera vez la sobreexpresión de REST/NRSF en un grupo de pacientes con ELTM y su posible asociación con la regulación transcripcional sobre los genes GRIA2 y GABRD. Teniendo en consideración que las aproximaciones experimentales sugieren que REST/NRSF es un regulador maestro que participa en diversos procesos neuronales, tanto en condiciones normales como patológicas, cabría esperar que su función regulatoria sea mucho más amplia. De tal forma que:

- Para evaluar su papel como regulador maestro en procesos epilépticos, se deberá evaluar la expresión de otros genes blanco y la unión a sus promotores, en pacientes con ELTM farmacorresistente. Éstos deberían ser genes no solo relacionados con excitabilidad e inhibición, si no con procesos fisiopatológicos como esclerosis mesial (SCN1A, RELN), neurogénesis aberrante (FOXP2) y farmacorresistencia (ABCB1). Dichas evaluaciones se realizarían con un enfoque experimental similar al utilizado en este estudio (determinación de expresión de ARNm, proteínas, unión a promotores y asociaciones clínicas).
- Si bien hemos mostrado una disminución en la expresión del ARNm de las subunidades GluR2 en nuestra cohorte de pacientes con ELTM, es importante determinar si el ARNm que está siendo transcrito es codificante para

subunidades permeables o impermeables a Ca^{2+} . Para ello se evaluaría la proporción de ARNm Q/R editado, mediante RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa) seguida por un ensayo con las enzimas de restricción *BbvI* y *AciI*, las cuales reconocen las secuencias 5'-GCAGC-3' y 5'-GCGG-3' (sitios Q/R) respectivamente. Dichas enzimas realizan cortes de tamaños específicos que son detectados mediante electroforesis en gel de agarosa. De tal forma se podrá asociar no solo la represión transcripcional, sino también la funcionalidad de los receptores AMPA con GluR2 en pacientes con ELTM.

- Para determinar si los mecanismos funcionales de REST/NRSF en autopsias pacientes con ELTM son similares a los descritos en estudios experimentales se determinarán y evaluarán las interacciones con otros factores de transcripción (LSD1, co-REST, SMCX, BRG1, Sin3A, SWI/SNF y HDAC1/2). Inicialmente se harán los cálculos de interacción *in silico* (docking) y eventualmente de manera experimental a través de co-inmunoprecipitación proteína-proteína. Se realizará la comparación de los porcentajes de unión de los factores de transcripción entre autopsias y pacientes y se correlacionaran con las variables clínicas y demográficas.
- Considerando que serán positivas las interacciones de REST/NRSF con factores de transcripción como HDAC1/2 y LSD1 (remodeladores de la cromatina) será importante evaluar las diferencias entre autopsias y pacientes con ELTM a nivel epigenético. Para ello se realizará un análisis de metilación global del ADN, PCR específica de metilación para evaluar genes específicos (GRIA1/2, GABRD/B, HCN1, SCNA1, ABCB1, RELN y FOXP2). De tal forma, que se logre una asociación entre los niveles de expresión, las modificaciones epigenéticas de los genes en estudio y la función transcripcional/remodeladora de la cromatina de REST/NRSF.
De ser posible se analizará la reorganización de la cromatina en 3D, mediante Hi-C (método de captura de conformación de los cromosomas) y se analizaran los cambios asociados a la ELTM (vs autopsias).
- Con el fin de evaluar los efectos de la intervención farmacológica sobre los niveles de REST/NRSF y sus genes blanco, se utilizará un modelo de epilepsia límbica inducida con litio-pilocarpina en ratas, a las cuales se les administraría el compuesto X5050 que induce la degradación de dicho factor. Se deberán

evaluar los cambios en la expresión de REST/NRSF y de sus genes blanco, así como la toxicidad a diferentes dosis y tiempos de administración del X5050.

- Para determinar el efecto de la modulación de REST/NRSF sobre las características fisiopatológicas, se evaluarían los cambios citológicos e histológicos en el desarrollo de esclerosis mesial en el modelo de epilepsia límbica descrito anteriormente y de farmacorresistencia en el modelo de epilepsia resistente a fenitoína.
- Para determinar los efectos epigenéticos de la actividad controlada de REST/NRSF y/o del uso mismo del modulador X5050, se deberán realizar las evaluaciones epigenéticas mencionadas previamente (metilación global, PRC metilo específica y Hi-C), antes y después de la administración del X5050 tanto ratas con epilepsia límbica, como en ratas control.

10 Bibliografía

- AERTS, S. 2012. Computational strategies for the genome-wide identification of cis-regulatory elements and transcriptional targets. *Curr Top Dev Biol*, 98, 121-45.
- AMBROSIO, A. F., SILVA, A. P., MALVA, J. O., SOARES-DA-SILVA, P., CARVALHO, A. P. & CARVALHO, C. M. 2001. Inhibition of glutamate release by BIA 2-093 and BIA 2-024, two novel derivatives of carbamazepine, due to blockade of sodium but not calcium channels. *Biochem Pharmacol*, 61, 1271-5.
- ARONICA, E. & GORTER, J. A. 2007. Gene expression profile in temporal lobe epilepsy. *Neuroscientist*, 13, 100-8.
- ARSLAN, A., VON ENGELHARDT, J. & WISDEN, W. 2014. Cytoplasmic domain of delta subunit is important for the extra-synaptic targeting of GABAA receptor subtypes. *J Integr Neurosci*, 13, 617-31.
- ASCONAPE, J. J. 2013. Epilepsy: new drug targets and neurostimulation. *Neurol Clin*, 31, 785-98.
- ASHTON, N. J., HYE, A., LECKEY, C. A., JONES, A. R., GARDNER, A., ELLIOTT, C., WETHERELL, J. L., LENZE, E. J., KILLICK, R. & MARCHANT, N. L. 2017. Plasma REST: a novel candidate biomarker of Alzheimer's disease is modified by psychological intervention in an at-risk population. *Transl Psychiatry*, 7, e1148.
- BALLAS, N., BATTAGLIOLI, E., ATOUF, F., ANDRES, M. E., CHENOWETH, J., ANDERSON, M. E., BURGER, C., MONIWA, M., DAVIE, J. R., BOWERS, W. J., FEDEROFF, H. J., ROSE, D. W., ROSENFELD, M. G., BREHM, P. & MANDEL, G. 2001. Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron*, 31, 353-65.
- BARROT, M., WALLACE, D. L., BOLANOS, C. A., GRAHAM, D. L., PERROTTI, L. I., NEVE, R. L., CHAMBLISS, H., YIN, J. C. & NESTLER, E. J. 2005. Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8357-62.
- BASIC, S. 2016. Epilepsy Pharmacoresistance – Where Are We Now? *Journal of Neurology & Stroke*, 4, 00161.
- BASSANI, S., VALNEGRI, P., BERETTA, F. & PASSAFARO, M. 2009. The GLUR2 subunit of AMPA receptors: synaptic role. *Neuroscience*, 158, 55-61.
- BASSUK, A. G., WALLACE, R. H., BUHR, A., BULLER, A. R., AFAWI, Z., SHIMOJO, M., MIYATA, S., CHEN, S., GONZALEZ-ALEGRE, P., GRIESBACH, H. L., WU, S., NASHIELSKY, M., VLADAR, E. K., ANTIC, D., FERGUSON, P. J., CIRAK, S., VOIT, T., SCOTT, M. P., AXELROD, J. D., GURNETT, C., DAOUD, A. S., KIVITY, S., NEUFELD, M. Y., MAZARIB, A., STRAUSSBERG, R., WALID, S., KORCZYN, A. D., SLUSARSKI, D. C., BERKOVIC, S. F. & EL-SHANTI, H. I. 2008. A homozygous mutation in human PRICKLE1 causes an autosomal-recessive progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome. *Am J Hum Genet*, 83, 572-81.
- BEAN, B. P. 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci*, 8, 451-65.
- BELL, B., LIN, J. J., SEIDENBERG, M. & HERMANN, B. 2011. The neurobiology of cognitive disorders in temporal lobe epilepsy. *Nat Rev Neurol*, 7, 154-64.
- BEN-ARI, Y., WOODIN, M. A., SERNAGOR, E., CANCEDDA, L., VINAY, L., RIVERA, C., LEGENDRE, P., LUHMANN, H. J., BORDEY, A., WENNER, P., FUKUDA, A., VAN DEN POL, A. N., GAIARSA, J. L. & CHERUBINI, E. 2012. Refuting the challenges of the developmental shift of polarity of GABA actions: GABA more exciting than ever! *Front Cell Neurosci*, 6, 35.
- BENARROCH, E. E. 2007. GABAA receptor heterogeneity, function, and implications for epilepsy. *Neurology*, 68, 612-4.
- BERNASCONI, N., BERNASCONI, A., CARAMANOS, Z., ANTEL, S. B., ANDERMANN, F. & ARNOLD, D. L. 2003. Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. *Brain*, 126, 462-9.
- BIRDSILL, A. C., WALKER, D. G., LUE, L., SUE, L. I. & BEACH, T. G. 2011. Postmortem interval effect on RNA and gene expression in human brain tissue. *Cell Tissue Bank*, 12, 311-8.
- BLUMCKE, I., BECK, H., SCHEFFLER, B., HOF, P. R., MORRISON, J. H., WOLF, H. K., SCHRAMM, J., ELGER, C. E. & WIESTLER, O. D. 1996. Altered distribution of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit GluR2(4) and the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol*, 92, 576-87.
- BOUCHER, B. A. 1996. Fosphenytoin: a novel phenytoin prodrug. *Pharmacotherapy*, 16, 777-91.
- BOWIE, D. & MAYER, M. L. 1995. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron*, 15, 453-62.
- BRENE, S., MESSER, C., OKADO, H., HARTLEY, M., HEINEMANN, S. F. & NESTLER, E. J. 2000. Regulation of GluR2 promoter activity by neurotrophic factors via a neuron-restrictive silencer element. *Eur J Neurosci*, 12, 1525-33.
- BRICKLEY, S. G. & MODY, I. 2012. Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron*, 73, 23-34.
- BRIELLMANN, R. S., JACKSON, G. D., MITCHELL, L. A., FITT, G. J., KIM, S. E. & BERKOVIC, S. F. 1999. Occurrence of hippocampal sclerosis: is one hemisphere or gender more vulnerable? *Epilepsia*, 40, 1816-20.

- BRODIE, M. J., BESAG, F., ETTINGER, A. B., MULA, M., GOBBI, G., COMAI, S., ALDENKAMP, A. P. & STEINHOFF, B. J. 2016a. Epilepsy, Antiepileptic Drugs, and Aggression: An Evidence-Based Review. *Pharmacol Rev*, 68, 563-602.
- BRODIE, M. J., CHUNG, S., WADE, A., QUELEN, C., GUIRAUD-DIAWARA, A., FRANCOIS, C., VERPILLAT, P., SHEN, V. & ISOJARVI, J. 2016b. Clobazam and clonazepam use in epilepsy: Results from a UK database incident user cohort study. *Epilepsy Res*, 123, 68-74.
- BROOKS-KAYAL, A. R., SHUMATE, M. D., JIN, H., RIKHTER, T. Y. & COULTER, D. A. 1998. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med*, 4, 1166-72.
- BROWN, N., KERBY, J., BONNERT, T. P., WHITING, P. J. & WAFFORD, K. A. 2002. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol*, 136, 965-74.
- BRUCE, A. W., DONALDSON, I. J., WOOD, I. C., YERBURY, S. A., SADOWSKI, M. I., CHAPMAN, M., GOTTGENS, B. & BUCKLEY, N. J. 2004. Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 10458-63.
- BRUSA, R., ZIMMERMANN, F., KOH, D. S., FELDMEYER, D., GASS, P., SEEBURG, P. H. & SPRENGEL, R. 1995. Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science*, 270, 1677-80.
- BRYANS, J. S., DAVIES, N., GEE, N. S., DISSANAYAKE, V. U., RATCLIFFE, G. S., HORWELL, D. C., KNEEN, C. O., MORRELL, A. I., OLES, R. J., O'TOOLE, J. C., PERKINS, G. M., SINGH, L., SUMAN-CHAUHAN, N. & O'NEILL, J. A. 1998. Identification of novel ligands for the gabapentin binding site on the alpha2delta subunit of a calcium channel and their evaluation as anticonvulsant agents. *J Med Chem*, 41, 1838-45.
- BUCKMASTER, P. S., ABRAMS, E. & WEN, X. 2017. Seizure frequency correlates with loss of dentate gyrus GABAergic neurons in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol*, 525, 2592-2610.
- CABO-DE LA VEGA, C., VILLANUEVA-HERNANDEZ, P. & PRIETO-MARTIN, A. 2006. [The neurochemistry of epilepsy, inhibitory neurotransmission and experimental models: new perspectives]. *Rev Neurol*, 42, 159-68.
- CALDERONE, A., JOVER, T., NOH, K. M., TANAKA, H., YOKOTA, H., LIN, Y., GROOMS, S. Y., REGIS, R., BENNETT, M. V. & ZUKIN, R. S. 2003. Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die. *J Neurosci*, 23, 2112-21.
- CARTER, R. B., WOOD, P. L., WIELAND, S., HAWKINSON, J. E., BELELLI, D., LAMBERT, J. J., WHITE, H. S., WOLF, H. H., MIRSADEGHI, S., TAHIR, S. H., BOLGER, M. B., LAN, N. C. & GEE, K. W. 1997. Characterization of the anticonvulsant properties of ganaxolone (CCD 1042; 3alpha-hydroxy-3beta-methyl-5alpha-pregnan-20-one), a selective, high-affinity, steroid modulator of the gamma-aminobutyric acid(A) receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 280, 1284-95.
- COPE, D. W., DI GIOVANNI, G., FYSON, S. J., ORBAN, G., ERRINGTON, A. C., LORINCZ, M. L., GOULD, T. M., CARTER, D. A. & CRUNELLI, V. 2009. Enhanced tonic GABA inhibition in typical absence epilepsy. *Nat Med*, 15, 1392-8.
- COTTERMAN-HART, S. 2015. Antiepileptic Drugs: First Generation. In: NEWTON, H. B. & MASCHIO, M. (eds.) *Epilepsy and Brain Tumors*. 1 ed. USA: Elsevier Inc.
- COULTER, D. A., HUGUENARD, J. R. & PRINCE, D. A. 1989. Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Ann Neurol*, 25, 582-93.
- CRAIG, A. M., BLACKSTONE, C. D., HUGANIR, R. L. & BANKER, G. 1993. The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron*, 10, 1055-68.
- CZAPINSKI, P., BLASZCZYK, B. & CZUCZWAR, S. J. 2005. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr Top Med Chem*, 5, 3-14.
- CHARBORD, J., POYDENOT, P., BONNEFOND, C., FEYEU, M., CASAGRANDE, F., BRINON, B., FRANCELLE, L., AUREGAN, G., GUILLERMIER, M., CAILLERET, M., VIEGAS, P., NICOLEAU, C., MARTINAT, C., BROUILLET, E., CATTANEO, E., PESCHANSKI, M., LECHUGA, M. & PERRIER, A. L. 2013. High throughput screening for inhibitors of REST in neural derivatives of human embryonic stem cells reveals a chemical compound that promotes expression of neuronal genes. *Stem Cells*, 31, 1816-28.
- CHEN, A. C., SHIRAYAMA, Y., SHIN, K. H., NEVE, R. L. & DUMAN, R. S. 2001. Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect. *Biol Psychiatry*, 49, 753-62.
- CHONG, J. A., TAPIA-RAMIREZ, J., KIM, S., TOLEDO-ARAL, J. J., ZHENG, Y., BOUTROS, M. C., ALTSHULLER, Y. M., FROHMAN, M. A., KRANER, S. D. & MANDEL, G. 1995. REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*, 80, 949-57.
- DALLAGNOL, K. M. C., REMOR, A. P., DA SILVA, R. A., PREDIGER, R. D., LATINI, A. & AGUIAR, A. S., JR. 2017. Running for REST: Physical activity attenuates neuroinflammation in the hippocampus of aged mice. *Brain Behav Immun*, 61, 31-35.

- DE PETROCELLIS, L., LIGRESTI, A., MORIELLO, A. S., ALLARA, M., BISOGNO, T., PETROSINO, S., STOTT, C. G. & DI MARZO, V. 2011. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*, 163, 1479-94.
- DE SARRO, G., ONGINI, E., BERTORELLI, R., AGUGLIA, U. & DE SARRO, A. 1994. Excitatory amino acid neurotransmission through both NMDA and non-NMDA receptors is involved in the anticonvulsant activity of felbamate in DBA/2 mice. *Eur J Pharmacol*, 262, 11-9.
- DE WEER, P. 1980. Phenytoin: blockage of resting sodium channels. *Adv Neurol*, 27, 353-61.
- DELGADO-ESCUETA, A. V., KOELEMAN, B. P., BAILEY, J. N., MEDINA, M. T. & DURON, R. M. 2013. The quest for juvenile myoclonic epilepsy genes. *Epilepsy Behav*, 28 Suppl 1, S52-7.
- DESHPANDE, L. S., NAGARKATTI, N., SOMBATI, S. & DELORENZO, R. J. 2008. The novel antiepileptic drug carisbamate (RWJ 333369) is effective in inhibiting spontaneous recurrent seizure discharges and blocking sustained repetitive firing in cultured hippocampal neurons. *Epilepsy Res*, 79, 158-65.
- DIAZ, R. S. 2004. [Antiepilépticos: Aportación de los nuevos fármacos]. *Informacion Terapeutica del Sistema Nacional de Salud*, 28, 33-40.
- DIBBENS, L. M., FENG, H. J., RICHARDS, M. C., HARKIN, L. A., HODGSON, B. L., SCOTT, D., JENKINS, M., PETROU, S., SUTHERLAND, G. R., SCHEFFER, I. E., BERKOVIC, S. F., MACDONALD, R. L. & MULLEY, J. C. 2004. GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet*, 13, 1315-9.
- DICHTER, M. A. 2009. Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. *Arch Neurol*, 66, 443-7.
- DOOLEY, D. J., DONOVAN, C. M., MEDER, W. P. & WHETZEL, S. Z. 2002. Preferential action of gabapentin and pregabalin at P/Q-type voltage-sensitive calcium channels: inhibition of K⁺-evoked [3H]-norepinephrine release from rat neocortical slices. *Synapse*, 45, 171-90.
- DOOLEY, D. J., DONOVAN, C. M. & PUGSLEY, T. A. 2000. Stimulus-dependent modulation of [(3)H]norepinephrine release from rat neocortical slices by gabapentin and pregabalin. *J Pharmacol Exp Ther*, 295, 1086-93.
- DOWLATSHAHI, D., MACQUEEN, G. M., WANG, J. F. & YOUNG, L. T. 1998. Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *Lancet*, 352, 1754-5.
- DURING, M. J. & SPENCER, D. D. 1993. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet*, 341, 1607-10.
- EKICI, M., KEIM, A., ROSSLER, O. G., HOHL, M. & THIEL, G. 2012. Chromatin structure and expression of the AMPA receptor subunit Glur2 in human glioma cells: major regulatory role of REST and Sp1. *J Cell Biochem*, 113, 528-43.
- ELENA, M. R. 2005. Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Anuario Jurídico y Económico Escurialense*, X X X V I I I, 315-332.
- ELGER, C. E. 2002. Epilepsy: disease and model to study human brain function. *Brain Pathol*, 12, 193-8.
- ENGEL, J., JR., BRAGIN, A., STABA, R. & MODY, I. 2009. High-frequency oscillations: what is normal and what is not? *Epilepsia*, 50, 598-604.
- ERRINGTON, A. C., STOHR, T., HEERS, C. & LEES, G. 2008. The investigational anticonvulsant lacosamide selectively enhances slow inactivation of voltage-gated sodium channels. *Mol Pharmacol*, 73, 157-69.
- FENG, H. J., KANG, J. Q., SONG, L., DIBBENS, L., MULLEY, J. & MACDONALD, R. L. 2006. Delta subunit susceptibility variants E177A and R220H associated with complex epilepsy alter channel gating and surface expression of alpha4beta2delta GABAA receptors. *J Neurosci*, 26, 1499-506.
- FINK, K., DOOLEY, D. J., MEDER, W. P., SUMAN-CHAUHAN, N., DUFFY, S., CLUSMANN, H. & GOTHERT, M. 2002. Inhibition of neuronal Ca(2+) influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex. *Neuropharmacology*, 42, 229-36.
- FRENCH, J. A. & GAZZOLA, D. M. 2011. New generation antiepileptic drugs: what do they offer in terms of improved tolerability and safety? *Ther Adv Drug Saf*, 2, 141-58.
- FRIEDMAN, D. & DEVINSKY, O. 2016. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy. *N Engl J Med*, 374, 94-5.
- FRIEDMAN, L. K. 1998. Selective reduction of GluR2 protein in adult hippocampal CA3 neurons following status epilepticus but prior to cell loss. *Hippocampus*, 8, 511-25.
- FRIEDMAN, L. K., PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E., SPERBER, E. F., BENNETT, M. V., MOSHE, S. L. & ZUKIN, R. S. 1994. Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABAA receptor gene expression in adult rat hippocampus: an in situ hybridization study. *J Neurosci*, 14, 2697-707.
- FRUCHTER, E., KAPARA, O., REICHENBERG, A., YOFFE, R., FONO-YATIV, O., KREISS, Y., DAVIDSON, M. & WEISER, M. 2014. Longitudinal association between epilepsy and schizophrenia: a population-based study. *Epilepsy Behav*, 31, 291-4.
- GAITATZIS, A., TRIMBLE, M. R. & SANDER, J. W. 2004. The psychiatric comorbidity of epilepsy. *Acta Neurol Scand*, 110, 207-20.
- GARRIGA-CANUT, M., SCHOENIKE, B., QAZI, R., BERGENDAHL, K., DALEY, T. J., PFENDER, R. M., MORRISON, J. F., OCKULY, J., STAFSTROM, C., SUTULA, T. & ROOPRA, A. 2006. 2-Deoxy-D-glucose reduces

- epilepsy progression by NRSF-CtBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure. *Nat Neurosci*, 9, 1382-7.
- GEE, N. S., BROWN, J. P., DISSANAYAKE, V. U., OFFORD, J., THURLOW, R. & WOODRUFF, G. N. 1996. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. *J Biol Chem*, 271, 5768-76.
- GLYKYS, J., MANN, E. O. & MODY, I. 2008. Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J Neurosci*, 28, 1421-6.
- GORTER, J. A., PETROZZINO, J. J., ARONICA, E. M., ROSENBAUM, D. M., OPITZ, T., BENNETT, M. V., CONNOR, J. A. & ZUKIN, R. S. 1997. Global ischemia induces downregulation of GluR2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J Neurosci*, 17, 6179-88.
- GRIGORENKO, E., GLAZIER, S., BELL, W., TYTELL, M., NOSEL, E., PONS, T. & DEADWYLER, S. A. 1997. Changes in glutamate receptor subunit composition in hippocampus and cortex in patients with refractory epilepsy. *J Neurol Sci*, 153, 35-45.
- GRIMES, J. A., NIELSEN, S. J., BATTAGLIOLI, E., MISKA, E. A., SPEH, J. C., BERRY, D. L., ATOUF, F., HOLDENER, B. C., MANDEL, G. & KOUZARIDES, T. 2000. The co-repressor mSin3A is a functional component of the REST-CoREST repressor complex. *J Biol Chem*, 275, 9461-7.
- GROOMS, S. Y., OPITZ, T., BENNETT, M. V. & ZUKIN, R. S. 2000. Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3631-6.
- GROSS, V., ANDUS, T., CASTELL, J., VOM BERG, D., HEINRICH, P. C. & GEROK, W. 1989. O- and N-glycosylation lead to different molecular mass forms of human monocyte interleukin-6. *FEBS Lett*, 247, 323-6.
- GUNTHORPE, M. J., LARGE, C. H. & SANKAR, R. 2012. The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K⁺ channel opener for the treatment of epilepsy. *Epilepsia*, 53, 412-24.
- GUTIÉRREZ-MANJARREZ, F. A. & GARCÍA-RAMOS, G. 2010. [Estado epiléptico convulsivo en el adulto]. *Rev Eviden Invest Clin*, 3, 26-36.
- HAGLID, K. G., WANG, S., QINER, Y. & HAMBERGER, A. 1994. Excitotoxicity. Experimental correlates to human epilepsy. *Mol Neurobiol*, 9, 259-63.
- HANADA, T., HASHIZUME, Y., TOKUHARA, N., TAKENAKA, O., KOHMURA, N., OGASAWARA, A., HATAKEYAMA, S., OHGOH, M., UENO, M. & NISHIZAWA, Y. 2011. Perampanel: a novel, orally active, noncompetitive AMPA-receptor antagonist that reduces seizure activity in rodent models of epilepsy. *Epilepsia*, 52, 1331-40.
- HANAYA, R. & ARITA, K. 2016. The New Antiepileptic Drugs: Their Neuropharmacology and Clinical Indications. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 56, 205-20.
- HARTMAN, A. L. 2013. Arg! Post-translational modifications in mitochondrial proteins after status epilepticus. *Epilepsy Curr*, 13, 127-8.
- HARTY, T. P. & ROGAWSKI, M. A. 2000. Felbamate block of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors: selectivity for the NR2B subunit. *Epilepsy Res*, 39, 47-55.
- HERDON, H. J., JERMAN, J. C., STEAN, T. O., MIDDLEMISS, D. N., CHAN, W. N., VONG, A. K., EVANS, J. M., THOMPSON, M. & UPTON, N. 1997. Characterization of the binding of [3H]-SB-204269, a radiolabelled form of the new anticonvulsant SB-204269, to a novel binding site in rat brain membranes. *Br J Pharmacol*, 121, 1687-91.
- HESTER, M. S. & DANZER, S. C. 2013. Accumulation of abnormal adult-generated hippocampal granule cells predicts seizure frequency and severity. *J Neurosci*, 33, 8926-36.
- HO, V. M., DALLALZADEH, L. O., KARATHANANIS, N., KELES, M. F., VANGALA, S., GROGAN, T., POIRAZI, P. & MARTIN, K. C. 2014. GluA2 mRNA distribution and regulation by miR-124 in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*, 61, 1-12.
- HOF, P. R., DUAN, H., PAGE, T. L., EINSTEIN, M., WICINSKI, B., HE, Y., ERWIN, J. M. & MORRISON, J. H. 2002. Age-related changes in GluR2 and NMDAR1 glutamate receptor subunit protein immunoreactivity in corticocortically projecting neurons in macaque and patas monkeys. *Brain Res*, 928, 175-86.
- HOHL, M. & THIEL, G. 2005. Cell type-specific regulation of RE-1 silencing transcription factor (REST) target genes. *Eur J Neurosci*, 22, 2216-30.
- HOLTKAMP, M., MCMURRAY, R., BAGUL, M., SOUSA, R. & KOCKELMANN, E. 2016. Real-world data on eslicarbazepine acetate as add-on to antiepileptic monotherapy. *Acta Neurologica Scandinavica*, 134, 76-82.
- HOLLMANN, M. & HEINEMANN, S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 17, 31-108.
- HOSIE, A. M., WILKINS, M. E., DA SILVA, H. M. & SMART, T. G. 2006. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, 444, 486-9.
- HOUSER, C. R., ZHANG, N. & PENG, Z. 2012. Alterations in the Distribution of GABAA Receptors in Epilepsy. In: TH, NOEBELS, J. L., AVOLI, M., ROGAWSKI, M. A., OLSEN, R. W. & DELGADO-ESCUETA, A. V. (eds.) *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. Bethesda (MD).
- HOVINGA, C. A. 2001. Levetiracetam: a novel antiepileptic drug. *Pharmacotherapy*, 21, 1375-88.
- HOWES, J. F. & BELL, C. 2007. Talampanel. *Neurotherapeutics*, 4, 126-9.

- HUANG, C. W., HUANG, C. C., LIN, M. W., TSAI, J. J. & WU, S. N. 2008. The synergistic inhibitory actions of oxcarbazepine on voltage-gated sodium and potassium currents in differentiated NG108-15 neuronal cells and model neurons. *Int J Neuropsychopharmacol*, 11, 597-610.
- HUANG, Y., DOHERTY, J. J. & DINGLEDINE, R. 2002. Altered histone acetylation at glutamate receptor 2 and brain-derived neurotrophic factor genes is an early event triggered by status epilepticus. *J Neurosci*, 22, 8422-8.
- HUANG, Y., MYERS, S. J. & DINGLEDINE, R. 1999. Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat Neurosci*, 2, 867-72.
- HWANG, J. Y., AROMOLARAN, K. A. & ZUKIN, R. S. 2013. Epigenetic mechanisms in stroke and epilepsy. *Neuropsychopharmacology*, 38, 167-82.
- HWANG, J. Y., AROMOLARAN, K. A. & ZUKIN, R. S. 2017. The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. *Nat Rev Neurosci*, 18, 347-361.
- HWANG, J. Y. & ZUKIN, R. S. 2018. REST, a master transcriptional regulator in neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurobiol*, 48, 193-200.
- IBEAS BIH, C., CHEN, T., NUNN, A. V., BAZELOT, M., DALLAS, M. & WHALLEY, B. J. 2015. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*, 12, 699-730.
- ILAE 1989. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, 30, 389-99.
- JENNER, P., PRATT, J. A. & MARSDEN, C. D. 1986. Mechanism of action of clonazepam in myoclonus in relation to effects on GABA and 5-HT. *Adv Neurol*, 43, 629-43.
- JIA, Y. H., ZHU, X., LI, S. Y., NI, J. H. & JIA, H. T. 2006. Kainate exposure suppresses activation of GluR2 subunit promoter in primary cultured cerebral cortical neurons through induction of RE1-silencing transcription factor. *Neurosci Lett*, 403, 103-8.
- JIRUSKA, P., DE CURTIS, M., JEFFERYS, J. G., SCHEVON, C. A., SCHIFF, S. J. & SCHINDLER, K. 2013. Synchronization and desynchronization in epilepsy: controversies and hypotheses. *J Physiol*, 591, 787-97.
- JOHNSON, D. S., MORTAZAVI, A., MYERS, R. M. & WOLD, B. 2007. Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science*, 316, 1497-502.
- JOSHI, S. & KAPUR, J. 2013. N-methyl-D-aspartic acid receptor activation downregulates expression of delta subunit-containing GABAA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*, 84, 1-11.
- JOSHI, S., RAJASEKARAN, K., WILLIAMSON, J. & KAPUR, J. 2017. Neurosteroid-sensitive delta-GABAA receptors: A role in epileptogenesis? *Epilepsia*, 58, 494-504.
- JOYCE, C. J. 2007. In silico comparative genomic analysis of GABAA receptor transcriptional regulation. *BMC Genomics*, 8, 203.
- JUNG, M. J., LIPPERT, B., METCALF, B. W., BOHLEN, P. & SCHECHTER, P. J. 1977. gamma-Vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new selective irreversible inhibitor of GABA-T: effects on brain GABA metabolism in mice. *J Neurochem*, 29, 797-802.
- KANEKO, S., OKADA, M., HIRANO, T., KONDO, T., OTANI, K. & FUKUSHIMA, Y. 1993. Carbamazepine and zonisamide increase extracellular dopamine and serotonin levels in vivo, and carbamazepine does not antagonize adenosine effect in vitro: mechanisms of blockade of seizure spread. *Jpn J Psychiatry Neurol*, 47, 371-3.
- KEEZER, M. R., SISODIYA, S. M. & SANDER, J. W. 2016. Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol*, 15, 106-15.
- KELLINGHAUS, C. 2009. Lacosamide as treatment for partial epilepsy: mechanisms of action, pharmacology, effects, and safety. *Ther Clin Risk Manag*, 5, 757-66.
- KELLY, K. M., GROSS, R. A. & MACDONALD, R. L. 1990. Valproic acid selectively reduces the low-threshold (T) calcium current in rat nodose neurons. *Neurosci Lett*, 116, 233-8.
- KERRIGAN, J. F., SHIELDS, W. D., NELSON, T. Y., BLUESTONE, D. L., DODSON, W. E., BOURGEOIS, B. F., PELLOCK, J. M., MORTON, L. D. & MONAGHAN, E. P. 2000. Ganaxolone for treating intractable infantile spasms: a multicenter, open-label, add-on trial. *Epilepsy Res*, 42, 133-9.
- KHARLAMOV, E. A., LEPSVERIDZE, E., MEPARISHVILI, M., SOLOMONIA, R. O., LU, B., MILLER, E. R., KELLY, K. M. & MCHEDLISHVILI, Z. 2011. Alterations of GABA(A) and glutamate receptor subunits and heat shock protein in rat hippocampus following traumatic brain injury and in posttraumatic epilepsy. *Epilepsy Res*, 95, 20-34.
- KITO, M., MAEHARA, M. & WATANABE, K. 1996. Mechanisms of T-type calcium channel blockade by zonisamide. *Seizure*, 5, 115-9.
- KOHLER, M., KORNAU, H. C. & SEEBURG, P. H. 1994. The organization of the gene for the functionally dominant alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor subunit GluR-B. *J Biol Chem*, 269, 17367-70.
- KOSTYUK, P. G., MOLOKANOVA, E. A., PRONCHUK, N. F., SAVCHENKO, A. N. & VERKHRATSKY, A. N. 1992. Different action of ethosuximide on low- and high-threshold calcium currents in rat sensory neurons. *Neuroscience*, 51, 755-8.

- KREISLER, A., STRISSEL, P. L., STRICK, R., NEUMANN, S. B., SCHUMACHER, U. & BECKER, C. M. 2010. Regulation of the NRSF/REST gene by methylation and CREB affects the cellular phenotype of small-cell lung cancer. *Oncogene*, 29, 5828-38.
- KULIG, K. & MALAWSKA, B. 2007. Carisbamate, a new carbamate for the treatment of epilepsy. *IDrugs*, 10, 720-7.
- LAROCHE, S. M. & HELMERS, S. L. 2004. The new antiepileptic drugs: clinical applications. *JAMA*, 291, 615-20.
- LAUMET, G., GARRIGA, J., CHEN, S. R., ZHANG, Y., LI, D. P., SMITH, T. M., DONG, Y., JELINEK, J., CESARONI, M., ISSA, J. P. & PAN, H. L. 2015. G9a is essential for epigenetic silencing of K(+) channel genes in acute-to-chronic pain transition. *Nat Neurosci*, 18, 1746-55.
- LEE, J. H., SHIMOJO, M., CHAI, Y. G. & HERSH, L. B. 2000. Studies on the interaction of REST4 with the cholinergic repressor element-1/neuron restrictive silencer element. *Brain Res Mol Brain Res*, 80, 88-98.
- LIU, P., SMITH, P. F. & DARLINGTON, C. L. 2008. Glutamate receptor subunits expression in memory-associated brain structures: regional variations and effects of aging. *Synapse*, 62, 834-41.
- LIU, Y., YOHLING, G. J., WANG, Y., HUTCHINSON, T. L., BRENNEMAN, D. E., FLORES, C. M. & ZHAO, B. 2009. Carisbamate, a novel neuromodulator, inhibits voltage-gated sodium channels and action potential firing of rat hippocampal neurons. *Epilepsy Res*, 83, 66-72.
- LOE-MIE, Y., LEPAGNOL-BESTEL, A. M., MAUSSION, G., DORON-FAIGENBOIM, A., IMBEAUD, S., DELACROIX, H., AGGERBECK, L., PUPKO, T., GORWOOD, P., SIMONNEAU, M. & MOALIC, J. M. 2010. SMARCA2 and other genome-wide supported schizophrenia-associated genes: regulation by REST/NRSF, network organization and primate-specific evolution. *Hum Mol Genet*, 19, 2841-57.
- LOMBARDI, L. M., BAKER, S. A. & ZOGHBI, H. Y. 2015. MECP2 disorders: from the clinic to mice and back. *J Clin Invest*, 125, 2914-23.
- LU, T., ARON, L., ZULLO, J., PAN, Y., KIM, H., CHEN, Y., YANG, T. H., KIM, H. M., DRAKE, D., LIU, X. S., BENNETT, D. A., COLAIACOVO, M. P. & YANKNER, B. A. 2014. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 507, 448-54.
- LUKYANETZ, E. A., SHKRYL, V. M. & KOSTYUK, P. G. 2002. Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam. *Epilepsia*, 43, 9-18.
- LUSCHER, B., HAUSELMANN, R., LEITGEB, S., RULICKE, T. & FRITSCHY, J. M. 1997. Neuronal subtype-specific expression directed by the GABA(A) receptor delta subunit gene promoter/upstream region in transgenic mice and in cultured cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 51, 197-211.
- LUSZCZKI, J. J. 2009. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Rep*, 61, 197-216.
- LUTGEN, V., NARASIPURA, S. D., SHARMA, A., MIN, S. & AL-HARTHI, L. 2016. beta-Catenin signaling positively regulates glutamate uptake and metabolism in astrocytes. *J Neuroinflammation*, 13, 242.
- LYNCH, B. A., LAMBENG, N., NOCKA, K., KENSEL-HAMMES, P., BAJJALIEH, S. M., MATAGNE, A. & FUKS, B. 2004. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9861-6.
- MACDONALD, R. L. & BARKER, J. L. 1977. Phenobarbital enhances GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurons. *Trans Am Neurol Assoc*, 102, 139-40.
- MACDONALD, R. L. & BERGEY, G. K. 1978. Valproic acid: effect on GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons. *Trans Am Neurol Assoc*, 103, 254-6.
- MADEJA, M., MARGINEANU, D. G., GORJI, A., SIEP, E., BOERRIGTER, P., KLITGAARD, H. & SPECKMANN, E. J. 2003. Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? *Neuropharmacology*, 45, 661-71.
- MAGUIRE, J. L., STELL, B. M., RAFIZADEH, M. & MODY, I. 2005. Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci*, 8, 797-804.
- MAHAJAN, S. S., THAI, K. H., CHEN, K. & ZIFF, E. 2011. Exposure of neurons to excitotoxic levels of glutamate induces cleavage of the RNA editing enzyme, adenosine deaminase acting on RNA 2, and loss of GLUR2 editing. *Neuroscience*, 189, 305-15.
- MALDONADO-AVILES, J. G., CURLEY, A. A., HASHIMOTO, T., MORROW, A. L., RAMSEY, A. J., O'DONNELL, P., VOLK, D. W. & LEWIS, D. A. 2009. Altered markers of tonic inhibition in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 166, 450-9.
- MALINOW, R. & MALENKA, R. C. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 25, 103-26.
- MALKKI, H. 2014. Epilepsy-burning questions and emerging therapies. *Nat Rev Neurol*, 10, 243.
- MARTELLA, G., BONSI, P., SCIAMANNA, G., PLATANIA, P., MADEO, G., TASSONE, A., CUOMO, D. & PISANI, A. 2009. Seletacetam (ucb 44212) inhibits high-voltage-activated Ca2+ currents and intracellular Ca2+ increase in rat cortical neurons in vitro. *Epilepsia*, 50, 702-10.
- MAY, P. C., ROBISON, P. M. & FUSON, K. S. 1999. Stereoselective neuroprotection by novel 2,3-benzodiazepine non-competitive AMPA antagonist against non-NMDA receptor-mediated excitotoxicity in primary rat hippocampal cultures. *Neurosci Lett*, 262, 219-21.

- MCCLELLAND, S., BRENNAN, G. P., DUBE, C., RAJPARA, S., IYER, S., RICHICHI, C., BERNARD, C. & BARAM, T. Z. 2014. The transcription factor NRSF contributes to epileptogenesis by selective repression of a subset of target genes. *Elife*, 3, e01267.
- MCCLELLAND, S., FLYNN, C., DUBE, C., RICHICHI, C., ZHA, Q., GHESTEM, A., ESCLAPEZ, M., BERNARD, C. & BARAM, T. Z. 2011. Neuron-restrictive silencer factor-mediated hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channelopathy in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 70, 454-64.
- MONAGHAN, E. P., MCAULEY, J. W. & DATA, J. L. 1999. Ganaxolone: a novel positive allosteric modulator of the GABA(A) receptor complex for the treatment of epilepsy. *Expert Opin Investig Drugs*, 8, 1663-1671.
- MONYER, H., SEEBURG, P. H. & WISDEN, W. 1991. Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron*, 6, 799-810.
- MORI, A., NODA, Y. & PACKER, L. 1998. The anticonvulsant zonisamide scavenges free radicals. *Epilepsy Res*, 30, 153-8.
- MOTEJLEK, K., HAUSELMANN, R., LEITGEB, S. & LUSCHER, B. 1994. BSF1, a novel brain-specific DNA-binding protein recognizing a tandemly repeated purine DNA element in the GABAA receptor delta subunit gene. *J Biol Chem*, 269, 15265-73.
- MTCHEDLISHVILI, Z., BERTRAM, E. H. & KAPUR, J. 2001. Diminished allopregnanolone enhancement of GABA(A) receptor currents in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *J Physiol*, 537, 453-65.
- MU, W. & BURT, D. R. 1999. Transcriptional regulation of GABAA receptor gamma2 subunit gene. *Brain Res Mol Brain Res*, 67, 137-47.
- MUCHA, M., OOI, L., LINLEY, J. E., MORDAKA, P., DALLE, C., ROBERTSON, B., GAMPER, N. & WOOD, I. C. 2010. Transcriptional control of KCNQ channel genes and the regulation of neuronal excitability. *J Neurosci*, 30, 13235-45.
- MULA, M., CAVANNA, A. E. & MONACO, F. 2006. Psychopharmacology of topiramate: from epilepsy to bipolar disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2, 475-88.
- MULLIGAN, P., WESTBROOK, T. F., OTTINGER, M., PAVLOVA, N., CHANG, B., MACIA, E., SHI, Y. J., BARRETINA, J., LIU, J., HOWLEY, P. M., ELLEDGE, S. J. & SHI, Y. 2008. CDYL bridges REST and histone methyltransferases for gene repression and suppression of cellular transformation. *Mol Cell*, 32, 718-26.
- MYERS, S. J., PETERS, J., HUANG, Y., COMER, M. B., BARTHEL, F. & DINGLEDINE, R. 1998. Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neural-specific expression, multiple promoters, and regulatory elements. *J Neurosci*, 18, 6723-39.
- NAKAMURA, F., SUZUKI, S., NISHIMURA, S., YAGI, K. & SEINO, M. 1996. Effects of clobazam and its active metabolite on GABA-activated currents in rat cerebral neurons in culture. *Epilepsia*, 37, 728-35.
- NICOLAS, J. M., HANNESTAD, J., HOLDEN, D., KERVYN, S., NABULSI, N., TYTGAT, D., HUANG, Y., CHANTEUX, H., STAELENS, L., MATAGNE, A., MATHY, F. X., MERCIER, J., STOCKIS, A., CARSON, R. E. & KLITGAARD, H. 2016. Brivaracetam, a selective high-affinity synaptic vesicle protein 2A (SV2A) ligand with preclinical evidence of high brain permeability and fast onset of action. *Epilepsia*, 57, 201-9.
- NIELSEN, E. B., SUZDAK, P. D., ANDERSEN, K. E., KNUITSEN, L. J., SONNEWALD, U. & BRAESTRUP, C. 1991. Characterization of tiagabine (NO-328), a new potent and selective GABA uptake inhibitor. *Eur J Pharmacol*, 196, 257-66.
- NISHIHARA, S., TSUDA, L. & OGURA, T. 2003. The canonical Wnt pathway directly regulates NRSF/REST expression in chick spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*, 311, 55-63.
- NISHIMURA, T., SCHWARZER, C., GASSER, E., KATO, N., VEZZANI, A. & SPERK, G. 2005. Altered expression of GABA(A) and GABA(B) receptor subunit mRNAs in the hippocampus after kindling and electrically induced status epilepticus. *Neuroscience*, 134, 691-704.
- NOH, K. M., HWANG, J. Y., FOLLENZI, A., ATHANASIADOU, R., MIYAWAKI, T., GREALLY, J. M., BENNETT, M. V. & ZUKIN, R. S. 2012. Repressor element-1 silencing transcription factor (REST)-dependent epigenetic remodeling is critical to ischemia-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E962-71.
- NOHRIA, V. & GILLER, E. 2007. Ganaxolone. *Neurotherapeutics*, 4, 102-5.
- OKAMOTO, H., VOLETI, B., BANASR, M., SARHAN, M., DURIC, V., GIRGENTI, M. J., DILEONE, R. J., NEWTON, S. S. & DUMAN, R. S. 2010. Wnt2 expression and signaling is increased by different classes of antidepressant treatments. *Biol Psychiatry*, 68, 521-7.
- OLSEN, R. W. & SIEGHART, W. 2009. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56, 141-8.
- OOKUBO, M., KANAI, H., AOKI, H. & YAMADA, N. 2013. Antidepressants and mood stabilizers effects on histone deacetylase expression in C57BL/6 mice: Brain region specific changes. *J Psychiatr Res*, 47, 1204-14.
- OTSUKI, K., UCHIDA, S., WAKABAYASHI, Y., MATSUBARA, T., HOBARA, T., FUNATO, H. & WATANABE, Y. 2010. Aberrant REST-mediated transcriptional regulation in major depressive disorder. *J Psychiatr Res*, 44, 378-84.
- OTTO, J. F., KIMBALL, M. M. & WILCOX, K. S. 2002. Effects of the anticonvulsant retigabine on cultured cortical neurons: changes in electroresponsive properties and synaptic transmission. *Mol Pharmacol*, 61, 921-7.

- PALM, K., BELLUARDO, N., METSIS, M. & TIMMUSK, T. 1998. Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J Neurosci*, 18, 1280-96.
- PANDEY, S. C., ROY, A. & ZHANG, H. 2003. The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 27, 396-409.
- PANDEY, S. P., RAI, R., GAUR, P. & PRASAD, S. 2015. Development- and age-related alterations in the expression of AMPA receptor subunit GluR2 and its trafficking proteins in the hippocampus of male mouse brain. *Biogerontology*, 16, 317-28.
- PARADA, A. & SOARES-DA-SILVA, P. 2002. The novel anticonvulsant BIA 2-093 inhibits transmitter release during opening of voltage-gated sodium channels: a comparison with carbamazepine and oxcarbazepine. *Neurochem Int*, 40, 435-40.
- PARK, S. A., KIM, T. S., CHOI, K. S., PARK, H. J., HEO, K. & LEE, B. I. 2003. Chronic activation of CREB and p90RSK in human epileptic hippocampus. *Exp Mol Med*, 35, 365-70.
- PATEL, M. & LI, Q. Y. 2003. Age dependence of seizure-induced oxidative stress. *Neuroscience*, 118, 431-7.
- PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E., GORTER, J. A., BENNETT, M. V. & ZUKIN, R. S. 1997. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci*, 20, 464-70.
- PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E., ZUKIN, R. S., BENNETT, M. V., CHO, S. & PULSINELLI, W. A. 1992. Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10499-503.
- PENG, Z., HAUER, B., MIHALEK, R. M., HOMANICS, G. E., SIEGHART, W., OLSEN, R. W. & HOUSER, C. R. 2002. GABA(A) receptor changes in delta subunit-deficient mice: altered expression of alpha4 and gamma2 subunits in the forebrain. *J Comp Neurol*, 446, 179-97.
- PERUCCA, E. 2017. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy: Hard Evidence at Last? *J Epilepsy Res*, 7, 61-76.
- PERUCCA, E., CLOYD, J., CRITCHLEY, D. & FUSEAU, E. 2008. Rufinamide: clinical pharmacokinetics and concentration-response relationships in patients with epilepsy. *Epilepsia*, 49, 1123-41.
- PLOSKER, G. L. 2012. Perampanel: as adjunctive therapy in patients with partial-onset seizures. *CNS Drugs*, 26, 1085-96.
- POLLARD, J. R. 2008. Seletacetam, a small molecule SV2A modulator for the treatment of epilepsy. *Curr Opin Investig Drugs*, 9, 101-7.
- POZZI, D., LIGNANI, G., FERREA, E., CONTESTABILE, A., PAONESSA, F., D'ALESSANDRO, R., LIPPIELLO, P., BOIDO, D., FASSIO, A., MELDOLESI, J., VALTORTA, F., BENFENATI, F. & BALDELLI, P. 2013. REST/NRSF-mediated intrinsic homeostasis protects neuronal networks from hyperexcitability. *EMBO J*, 32, 2994-3007.
- QI, J. S., YAO, J., FANG, C., LUSCHER, B. & CHEN, G. 2006. Downregulation of tonic GABA currents following epileptogenic stimulation of rat hippocampal cultures. *J Physiol*, 577, 579-90.
- QU, Z., SU, F., QI, X., SUN, J., WANG, H., QIAO, Z., ZHAO, H. & ZHU, Y. 2017. Wnt/beta-catenin signalling pathway mediated aberrant hippocampal neurogenesis in kainic acid-induced epilepsy. *Cell Biochem Funct*, 35, 472-476.
- RAJASEKARAN, K., KAPUR, J. & BERTRAM, E. H. 2007. Alterations in GABA(A) receptor mediated inhibition in adjacent dorsal midline thalamic nuclei in a rat model of chronic limbic epilepsy. *J Neurophysiol*, 98, 2501-8.
- RAJASEKARAN, K., SUN, C. & BERTRAM, E. H. 2009. Altered pharmacology and GABA-A receptor subunit expression in dorsal midline thalamic neurons in limbic epilepsy. *Neurobiol Dis*, 33, 119-32.
- REKTOR, I. 2013. Perampanel, a novel, non-competitive, selective AMPA receptor antagonist as adjunctive therapy for treatment-resistant partial-onset seizures. *Expert Opin Pharmacother*, 14, 225-35.
- RHO, J. M., DONEVAN, S. D. & ROGAWSKI, M. A. 1994. Mechanism of action of the anticonvulsant felbamate: opposing effects on N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acidA receptors. *Ann Neurol*, 35, 229-34.
- RHO, J. M., DONEVAN, S. D. & ROGAWSKI, M. A. 1997. Barbiturate-like actions of the propanediol dicarbamates felbamate and meprobamate. *J Pharmacol Exp Ther*, 280, 1383-91.
- RIGO, J. M., HANS, G., NGUYEN, L., ROCHER, V., BELACHEW, S., MALGRANGE, B., LEPRINCE, P., MOONEN, G., SELAK, I., MATAGNE, A. & KLITGAARD, H. 2002. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents. *Br J Pharmacol*, 136, 659-72.
- ROCKOWITZ, S., LIEN, W. H., PEDROSA, E., WEI, G., LIN, M., ZHAO, K., LACHMAN, H. M., FUCHS, E. & ZHENG, D. 2014. Comparison of REST cistromes across human cell types reveals common and context-specific functions. *PLoS Comput Biol*, 10, e1003671.
- RODENAS-RUANO, A., CHAVEZ, A. E., COSSIO, M. J., CASTILLO, P. E. & ZUKIN, R. S. 2012. REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci*, 15, 1382-90.
- ROOPRA, A., DINGLEDINE, R. & HSIEH, J. 2012. Epigenetics and epilepsy. *Epilepsia*, 53 Suppl 9, 2-10.

- ROOPRA, A., HUANG, Y. & DINGLEDINE, R. 2001. Neurological disease: listening to gene silencers. *Mol Interv*, 1, 219-28.
- ROOPRA, A., QAZI, R., SCHOENIKE, B., DALEY, T. J. & MORRISON, J. F. 2004. Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol Cell*, 14, 727-38.
- SANCHEZ, R. G., PARRISH, R. R., RICH, M., WEBB, W. M., LOCKHART, R. M., NAKAO, K., IANOV, L., BUCKINGHAM, S. C., BROADWATER, D. R., JENKINS, A., DE LANEROLLE, N. C., CUNNINGHAM, M., EID, T., RILEY, K. & LUBIN, F. D. 2019. Human and rodent temporal lobe epilepsy is characterized by changes in O-GlcNAc homeostasis that can be reversed to dampen epileptiform activity. *Neurobiol Dis*, 124, 531-543.
- SCIMEMI, A., SEMYANOV, A., SPERK, G., KULLMANN, D. M. & WALKER, M. C. 2005. Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *J Neurosci*, 25, 10016-24.
- SCHAUF, C. L. 1987. Zonisamide enhances slow sodium inactivation in *Myxicola*. *Brain Res*, 413, 185-8.
- SCHEFFER, I. E., BERKOVIC, S., CAPOVILLA, G., CONNOLLY, M. B., FRENCH, J., GUILHOTO, L., HIRSCH, E., JAIN, S., MATHERN, G. W., MOSHE, S. L., NORDLI, D. R., PERUCCA, E., TOMSON, T., WIEBE, S., ZHANG, Y. H. & ZUBERI, S. M. 2017. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58, 512-521.
- SCHOENHERR, C. J., PAQUETTE, A. J. & ANDERSON, D. J. 1996. Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9881-6.
- SCHOFIELD, P. R., DARLISON, M. G., FUJITA, N., BURT, D. R., STEPHENSON, F. A., RODRIGUEZ, H., RHEE, L. M., RAMACHANDRAN, J., REALE, V., GLENCORSE, T. A. & ET AL. 1987. Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*, 328, 221-7.
- SCHWARZER, C., TSUNASHIMA, K., WANZENBOCK, C., FUCHS, K., SIEGHART, W. & SPERK, G. 1997. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus II: altered distribution in kainic acid-induced temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 80, 1001-17.
- SEIDENBERG, M., PULSIPHER, D. T. & HERMANN, B. 2009. Association of epilepsy and comorbid conditions. *Future Neurol*, 4, 663-668.
- SHANGGUAN, Y., LIAO, H. & WANG, X. 2015. Clonazepam in the treatment of status epilepticus. *Expert Rev Neurother*, 15, 733-40.
- SHEETS, P. L., HEERS, C., STOEHR, T. & CUMMINS, T. R. 2008. Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2R)-2-(acetyl-amino)-N-benzyl-3-methoxypropanamide], lidocaine, and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther*, 326, 89-99.
- SHI, Y. J., MATSON, C., LAN, F., IWASE, S., BABA, T. & SHI, Y. 2005. Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell*, 19, 857-64.
- SIEGHART, W. 1995. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev*, 47, 181-234.
- SIEGHART, W., FUCHS, K., TRETTER, V., EBERT, V., JECHLINGER, M., HOGER, H. & ADAMIKER, D. 1999. Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int*, 34, 379-85.
- SIMON, J., WAKIMOTO, H., FUJITA, N., LALANDE, M. & BARNARD, E. A. 2004. Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem*, 279, 41422-35.
- SOMMER, B., KEINANEN, K., VERDOORN, T. A., WISDEN, W., BURNASHEV, N., HERB, A., KOHLER, M., TAKAGI, T., SAKMANN, B. & SEEBURG, P. H. 1990a. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*, 249, 1580-5.
- SOMMER, B., POUSTKA, A., SPURR, N. K. & SEEBURG, P. H. 1990b. The murine GABAA receptor delta-subunit gene: structure and assignment to human chromosome 1. *DNA Cell Biol*, 9, 561-8.
- SPENCER, E. M., CHANDLER, K. E., HADDLEY, K., HOWARD, M. R., HUGHES, D., BELYAEV, N. D., COULSON, J. M., STEWART, J. P., BUCKLEY, N. J., KIPAR, A., WALKER, M. C. & QUINN, J. P. 2006. Regulation and role of REST and REST4 variants in modulation of gene expression in in vivo and in vitro in epilepsy models. *Neurobiol Dis*, 24, 41-52.
- SPERK, G., SCHWARZER, C., TSUNASHIMA, K., FUCHS, K. & SIEGHART, W. 1997. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neuroscience*, 80, 987-1000.
- SPIGELMAN, I., LI, Z., BANERJEE, P. K., MIHALEK, R. M., HOMANICS, G. E. & OLSEN, R. W. 2002. Behavior and physiology of mice lacking the GABAA-receptor delta subunit. *Epilepsia*, 43 Suppl 5, 3-8.
- STAFSTROM, C. E. 2010. Pathophysiological Mechanisms of Seizures and Epilepsy: A Primer. In: RHO, J. M., SANKAR, R. & STAFSTROM, C. E. (eds.) *Epilepsy : mechanisms, models, and translational perspectives*. United States of America: CRC Press Taylor & Francis Group.
- STEFANI, A., SPADONI, F., SINISCALCHI, A. & BERNARDI, G. 1996. Lamotrigine inhibits Ca²⁺ currents in cortical neurons: functional implications. *Eur J Pharmacol*, 307, 113-6.
- STELL, B. M., BRICKLEY, S. G., TANG, C. Y., FARRANT, M. & MODY, I. 2003. Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14439-44.

- STOHR, T., KUPFERBERG, H. J., STABLES, J. P., CHOI, D., HARRIS, R. H., KOHN, H., WALTON, N. & WHITE, H. S. 2007. Lacosamide, a novel anti-convulsant drug, shows efficacy with a wide safety margin in rodent models for epilepsy. *Epilepsy Res*, 74, 147-54.
- SUCKSDORFF, D., BROWN, A. S., CHUDAL, R., JOKIRANTA-OLKONIEMI, E., LEIVONEN, S., SUOMINEN, A., HEINIMAA, M. & SOURANDER, A. 2015. Parental and comorbid epilepsy in persons with bipolar disorder. *J Affect Disord*, 188, 107-11.
- SWINKELS, W. A., DUIJSENS, I. J. & SPINHOVEN, P. 2003. Personality disorder traits in patients with epilepsy. *Seizure*, 12, 587-94.
- TAGLIALATELA, M., ONGINI, E., BROWN, A. M., DI RENZO, G. & ANNUNZIATO, L. 1996. Felbamate inhibits cloned voltage-dependent Na⁺ channels from human and rat brain. *Eur J Pharmacol*, 316, 373-7.
- TAHILIANI, M., MEI, P., FANG, R., LEONOR, T., RUTENBERG, M., SHIMIZU, F., LI, J., RAO, A. & SHI, Y. 2007. The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature*, 447, 601-5.
- TAMBUCCI, R., BASTI, C., MARESCA, M., COPPOLA, G. & VERROTTI, A. 2016. Update on the role of eslicarbazepine acetate in the treatment of partial-onset epilepsy. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 12, 1251-60.
- TANG, X., HERNANDEZ, C. C. & MACDONALD, R. L. 2010. Modulation of spontaneous and GABA-evoked tonic alpha4beta3delta and alpha4beta3gamma2L GABAA receptor currents by protein kinase A. *J Neurophysiol*, 103, 1007-19.
- TAYLOR, C. P., ANGELOTTI, T. & FAUMAN, E. 2007. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res*, 73, 137-50.
- THOMPSON, P. J. & DUNCAN, J. S. 2005. Cognitive decline in severe intractable epilepsy. *Epilepsia*, 46, 1780-7.
- TOLOU GHAMARI, Z., MEHAVARI HABIBABADI, J. & PALIZBAN, A. A. 2015. Evidence-Based Pharmacotherapy of Epilepsy. *Arch Neurosci*, 2, e18468.
- TSUNASHIMA, K., SCHWARZER, C., KIRCHMAIR, E., SIEGHART, W. & SPERK, G. 1997. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus III: altered messenger RNA expression in kainic acid-induced epilepsy. *Neuroscience*, 80, 1019-32.
- UEDA, Y., DOI, T., TOKUMARU, J. & WILLMORE, L. J. 2003. Effect of zonisamide on molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins during epileptogenesis in rats with hippocampal seizures. *Brain Res Mol Brain Res*, 116, 1-6.
- UNAL, E. S., ZHAO, R., QIU, A. & GOLDMAN, I. D. 2008. N-linked glycosylation and its impact on the electrophoretic mobility and function of the human proton-coupled folate transporter (HsPCFT). *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1407-14.
- UPTON, N., BLACKBURN, T. P., CAMPBELL, C. A., COOPER, D., EVANS, M. L., HERDON, H. J., KING, P. D., RAY, A. M., STEAN, T. O., CHAN, W. N., EVANS, J. M. & THOMPSON, M. 1997. Profile of SB-204269, a mechanistically novel anticonvulsant drug, in rat models of focal and generalized epileptic seizures. *Br J Pharmacol*, 121, 1679-86.
- VAN RIJN, C. M. & WILLEMS-VAN BREE, E. 2003. Synergy between retigabine and GABA in modulating the convulsant site of the GABAA receptor complex. *Eur J Pharmacol*, 464, 95-100.
- VANHOUTTE, P., BARNIER, J. V., GUIBERT, B., PAGES, C., BESSON, M. J., HIPSKIND, R. A. & CABOCHE, J. 1999. Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol*, 19, 136-46.
- WALLACE, D. L., HAN, M. H., GRAHAM, D. L., GREEN, T. A., VIALOU, V., INIGUEZ, S. D., CAO, J. L., KIRK, A., CHAKRAVARTY, S., KUMAR, A., KRISHNAN, V., NEVE, R. L., COOPER, D. C., BOLANOS, C. A., BARROT, M., MCCLUNG, C. A. & NESTLER, E. J. 2009. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. *Nat Neurosci*, 12, 200-9.
- WANG, C. & NIU, L. 2013. Mechanism of inhibition of the GluA2 AMPA receptor channel opening by talampanel and its enantiomer: the stereochemistry of the 4-methyl group on the diazepine ring of 2,3-benzodiazepine derivatives. *ACS Chem Neurosci*, 4, 635-44.
- WELLINGTON, K. & GOA, K. L. 2001. Oxcarbazepine: an update of its efficacy in the management of epilepsy. *CNS Drugs*, 15, 137-63.
- WENTHOLD, R. J., PETRALIA, R. S., BLAHOS, J., II & NIEDZIELSKI, A. S. 1996. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci*, 16, 1982-9.
- WHISSELL, P. D., LECKER, I., WANG, D. S., YU, J. & ORSER, B. A. 2015. Altered expression of deltaGABAA receptors in health and disease. *Neuropharmacology*, 88, 24-35.
- WHITE, H. S., FRANKLIN, M. R., KUPFERBERG, H. J., SCHMUTZ, M., STABLES, J. P. & WOLF, H. H. 2008. The anticonvulsant profile of rufinamide (CGP 33101) in rodent seizure models. *Epilepsia*, 49, 1213-20.
- WILLOW, M., KUENZEL, E. A. & CATTERALL, W. A. 1984. Inhibition of voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells and synaptosomes by the anticonvulsant drugs diphenylhydantoin and carbamazepine. *Mol Pharmacol*, 25, 228-34.

- WINDPASSINGER, C., KROISEL, P. M., WAGNER, K. & PETEK, E. 2002. The human gamma-aminobutyric acid A receptor delta (GABRD) gene: molecular characterisation and tissue-specific expression. *Gene*, 292, 25-31.
- WLODARCZYK, A. I., SYLANTYEV, S., HERD, M. B., KERSANTE, F., LAMBERT, J. J., RUSAKOV, D. A., LINTHORST, A. C., SEMYANOV, A., BELELLI, D., PAVLOV, I. & WALKER, M. C. 2013. GABA-independent GABAA receptor openings maintain tonic currents. *J Neurosci*, 33, 3905-14.
- WONG, P. T. & TEO, W. L. 1986. The effect of phenytoin on glutamate and GABA transport. *Neurochem Res*, 11, 1379-82.
- WRIGHT, A. & VISSSEL, B. 2012. The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Front Mol Neurosci*, 5, 34.
- WU, J. & XIE, X. 2006. Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome Biol*, 7, R85.
- WUTTKE, T. V., SEEBOHM, G., BAIL, S., MALJEVIC, S. & LERCHE, H. 2005. The new anticonvulsant retigabine favors voltage-dependent opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to its activation gate. *Mol Pharmacol*, 67, 1009-17.
- XIE, X., LANCASTER, B., PEAKMAN, T. & GARTHWAITE, J. 1995. Interaction of the antiepileptic drug lamotrigine with recombinant rat brain type IIA Na⁺ channels and with native Na⁺ channels in rat hippocampal neurones. *Pflugers Arch*, 430, 437-46.
- YAMADA, S., YAMAMOTO, M., OZAWA, H., RIEDERER, P. & SAITO, T. 2003. Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Neural Transm (Vienna)*, 110, 671-80.
- YU, D. F., WU, P. F., FU, H., CHENG, J., YANG, Y. J., CHEN, T., LONG, L. H., CHEN, J. G. & WANG, F. 2011. Aging-related alterations in the expression and distribution of GluR2 and PICK1 in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 497, 42-5.
- ZHANG, D., LI, Y., WANG, R., LI, Y., SHI, P., KAN, Z. & PANG, X. 2016. Inhibition of REST Suppresses Proliferation and Migration in Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci*, 17.
- ZHANG, N., WEI, W., MODY, I. & HOUSER, C. R. 2007. Altered localization of GABA(A) receptor subunits on dentate granule cell dendrites influences tonic and phasic inhibition in a mouse model of epilepsy. *J Neurosci*, 27, 7520-31.
- ZHU, J. J., ESTEBAN, J. A., HAYASHI, Y. & MALINOW, R. 2000. Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci*, 3, 1098-106.
- ZONA, C., PIERI, M., CARUNCHIO, I., CURCIO, L., KLITGAARD, H. & MARGINEANU, D. G. 2010. Brivaracetam (ucb 34714) inhibits Na⁺ current in rat cortical neurons in culture. *Epilepsy Res*, 88, 46-54.

11 Anexos

11.1 Anexo 1. Carta de autorización para la obtención de tejido hipocampal de autopsias



Instituto de Ciencias Forenses
Tribunal Superior de Justicia del D.F.

“Por la Autonomía e Independencia del Poder Judicial para una ciudad de vanguardia”

SUBDIRECCION PERICIAL
SP/INV/004/2013

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
SECRETARIA GENERAL DE LA FACULTAD
DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
P R E S E N T E.

En atención a su oficio FMED/SG/RGG/189/05/14, de fecha 06 de mayo de 2014 recibido en esta Dirección el mismo día por medio del cual solicita se autorice la continuidad para la obtención de muestras de hipocampos y bulbos olfatorios de cadáveres autopsiados de personas que no hayan padecido enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central y para ello esta Dirección le requirió que fueran proporcionados los avances del proyecto de investigación en cuestión, toda vez que se autorizó desde hace más de un año solamente obtener 15 muestras del tejido ya referido. Después de haber entregado los avances y explicar la etapa experimental en la que se encuentra dicho proyecto y que sólo se han obtenido cinco muestras de las quince autorizadas; Al respecto me permito hacer de su conocimiento que puede continuar con la obtención de las 10 muestras restantes en la inteligencia que será deseable efectuarlo durante el periodo del 15 de mayo al 15 de noviembre del año en curso ya que existen otros grupos de investigadores que están en espera de un espacio para iniciar su proyecto de investigación.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para reiterarle las seguridades de mi atenta consideración y respeto.



ATENTAMENTE,
Ciudad de México, 07 de mayo de 2014.

DR. FELIPE E. TAKAJASHI MEDICINA
DIRECTOR

c.c.p. DR. JAIME CÁRDENAS CAMACHO, SUBDIRECTOR PERICIAL INCIFO, PARA SU CONOCIMIENTO
c.c.p. DR. JOSÉ LUIS RAÚL DORANTES RAMÍREZ, JUD. ANFITEATRO Y PATOLOGÍA INCIFO, PARA SU CONOCIMIENTO

11.2 Anexo 2. Carta de aprobación del proyecto y protocolos relacionados.

SIRELCIS

Página 1 de 1



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



10 de octubre del 2017

Ref. 09-B5-61-2800/201700/

Dr. Orozco Suárez Sandra Adela
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas Siglo XXI (U INVEST MED ENF NEUROL S XXI)
Nivel Central

2507

Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Evaluación de la expresión de REST/NRSF, GluR2, GABAA? y HCN1 en la Epilepsia del Lóbulo Temporal: acercamiento básico y clínico.**, fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: R-2017-785-100.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación al Comité de Ética en Investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Atentamente,

Dr. Fabio Salazar García Gómez
Presidente
Comisión Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

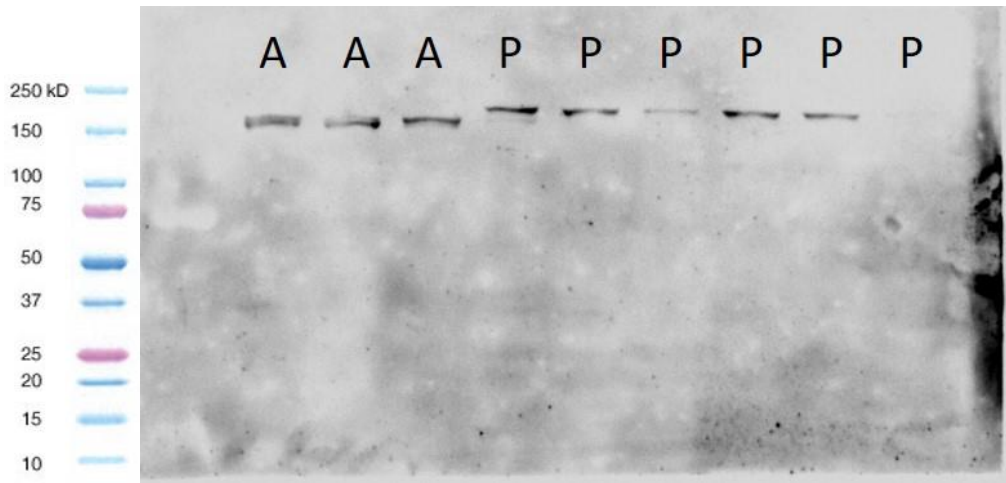
SNN/ iah. F-CNIC-2015-174

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Bloque "E" de la Unidad de Congresos Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores México 06720 56276900 ext 21210 coruse@cis.gob.mx

11.3 Anexo 3. Membrana completa de western blot para REST/NRSF

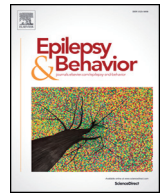


Anexo3. Imagen representativa del gel completo, en el que se muestra la especificidad del reconocimiento antigénico por parte del anticuerpo anti-REST/NRSF (Abcam ab75785). A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular. A, autopsias y P, pacientes.



Contents lists available at ScienceDirect

Epilepsy & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yebeh

REST/NRSF transcription factor is overexpressed in hippocampus of patients with drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy

Victor Navarrete-Modesto^{a,b}, Sandra Orozco-Suárez^b, Mario Alonso-Vanegas^c,
Iris A. Feria-Romero^{b,*}, Luisa Rocha^{d,*}

^a Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

^b Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

^c Departamento de Neurocirugía, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez", Ciudad de México, Mexico

^d Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2019

Revised 6 February 2019

Accepted 8 February 2019

Available online xxx

Keywords:

REST/NRSF

Mesial temporal lobe epilepsy

Hippocampus

Seizure frequency

Psychiatric comorbidities

ABSTRACT

The Repressor Element-1 Silencing Transcription factor or Neuron-Restrictive Silencer Factor (REST/NRSF) is a zinc finger repressor transcription factor of the Kruppel family. Several studies in experimental models have shown that overexpression of REST/NRSF occurs after the induction of seizures. In the present study, the expression of REST/NRSF (messenger ribonucleic acid (mRNA) and protein) was evaluated in the hippocampus of 28 patients with drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) and their correlation with clinical variables and comorbid anxiety and depression. The REST/NRSF protein expression was augmented in an age-dependent manner in the hippocampus of autopsied subjects. However, this condition was not observed in patients with MTLE, in whom overexpression of this transcription factor occurred at both the mRNA and protein levels. The correlations with clinical variables showed that the frequency of epileptic seizures was proportional to the protein expression of REST/NRSF. The results revealed that the overexpression of REST/NRSF was more evident in patients with MTLE without anxiety and depression. Our data indicate that the expression of REST/NRSF is modified in patients with MTLE. This condition has implications in the pathophysiology of this disorder, making it a potential candidate for the optimization of clinical treatments.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The Repressor Element-1 Silencing Transcription factor or Neuron-Restrictive Silencer Factor (REST/NRSF) is a protein of approximately 121 kDa that belongs to the family of transcription-factors type GLI-Krüppel Repressor Class of Zinc Fingers [1]. The REST/NRSF has a deoxy-ribonucleic acid (DNA)-binding domain consisting of eight zinc fingers and carries out its repressor function by binding its consensus sequence (Repressor Element 1/Neuron-Restrictive Silencing Element (RE1/NRSE)), a 17–33 bp site found in the regulatory regions of several genes [2]. Once REST/NRSF binds the RE1/NRSE site, it recruits repressor cofactors, histone deacetylases, and histone methyltransferases, which induce chromatin remodeling around the target genes [3,4].

The expression of REST/NRSF is high in nonneural tissues and in undifferentiated neuronal precursors during brain development, and decreases as the development process progresses [5]. The REST/NRSF expression is low in the adult brain and is associated with

neuroprotective processes [6]. The REST/NRSF is found in brain areas such as olfactory system, cerebral cortex, hippocampal formation, diencephalon, midbrain, brain stem, and cerebellum [5]. It is a master regulator in the expression of more than 2000 neuronal genes [7]. Some of these genes are involved in axonal growth, vesicular transport and release, and ionic conductance [8,9].

Studies support that REST/NRSF represses genes related to the depression- and anxiety-like behaviors [10]. Indeed, REST/NRSF expression is low in subjects with cognitive deterioration whereas its high expression is associated with a low incidence of psychiatric disorders such as major depression [11,12]. Other studies indicate that the repression of genes induced by REST/NRSF is associated with neurological disorders such as the Parkinson's disease [13,14], Huntington's disease [15,16] and the reduced dendritic growth and complexity in Down syndrome [17]. This information indicates that REST/NRSF is involved in different process, and its effects depend on the cell type-specific necessities and the genetic context.

Studies indicate that REST/NRSF is overexpressed as a consequence of seizure activity [5,18] and exacerbates the epileptogenesis process, a situation associated with the low expression of miR-124 [19]. Indeed, the overexpression of REST/NRSF may facilitate the neuronal

* Corresponding authors.

E-mail addresses: iris.feria@imss.gob.mx (I.A. Feria-Romero), lrocha@cinvestav.mx (L. Rocha).

excitability due to the transcriptional silencing of genes such as hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1 (*HCN1*), glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2 (*GluA2*), calbindin 1 (*Calb1*), glycine receptor alpha 2 (*Gla2*) and potassium voltage-gated channel subfamily C member 2 (*Kcnc2*) [20–22]. Other studies support that the overexpression of REST/NRSF contributes to antiepileptic effects. Concerning this issue, it is described that REST/NRSF prevents hyperexcitability in mature hippocampal neurons by the reduced expression of voltage-gated Na⁺ channels [23]. The REST/NRSF participates in the antiepileptogenic effects of 2-deoxyglucose through the repression of genes, such as brain derived neurotrophic factor (*BDNF*) and neurotrophic receptor tyrosine kinase 2 (*TrkB*) [4]. In addition, the seizure-induced overexpression of REST/NRSF represses some genes related to epileptogenesis in the mature rat hippocampus [22]. The information described above supports the notion that REST/NRSF is associated in both pro- and antiepileptic processes.

At present, it is unknown whether REST/NRSF is overexpressed in the hippocampus of patients with drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy (MTLE), a frequently neurological disorder [24] with a high psychiatric comorbidity [25–27]. This situation is relevant because the hippocampus of subjects with MTLE exhibits changes that facilitate the epileptic activity and mood disorders [28–30]. Some of these changes include the modulation of genes [31], which can be associated with the severity of the seizure activity, clinical variables, and/or psychiatric comorbidities. The aim of the present study was to elucidate changes in the messenger ribonucleic acid (mRNA) and protein expression of REST/NRSF in the hippocampus of patients with drug-resistant MTLE and their correlation with clinical variables and comorbid anxiety and depression.

2. Materials and methods

2.1. Patient criteria and surgical samples

Hippocampal samples were obtained from 28 patients diagnosed with drug-resistant MTLE (15 males and 13 females) undergoing surgery according to the protocol established by the Epilepsy Surgery Program of the National Institute of Neurology and Neurosurgery in Mexico City. The patients underwent a presurgical evaluation consisting of neurological, neuropsychiatric, and neuropsychological inspections, as well as electroencephalogram (EEG)-video recording and magnetic resonance imaging (MRI). In all patients, the presence of hippocampal mesial sclerosis was confirmed through histopathological and MRI evaluation.

Hippocampal biopsies were collected immediately after resection during epilepsy surgery, frozen rapidly in powdered dry ice and stored at –70 °C until processing. The experimental protocol was previously approved by the scientific committees of the institutions involved in the present study, and informed consent was obtained from each

patient. Table 1 presents a summary of clinical data of the patients included in this study.

As a control condition, hippocampus samples were obtained from the autopsies of 13 subjects (7 males and 6 females) who were deceased because of different causes, without evidence of neurological diseases (Table 1). After resection, the samples were handled and stored as previously described.

2.2. mRNA evaluation for REST/NRSF

2.2.1. mRNA extraction and cDNA synthesis

The hippocampal tissue (100 mg) was homogenized in 0.5 ml of phenol and guanidine isothiocyanate solution (TRIzol®, Invitrogen, Cat. No.15596026), and the procedure was performed according to the manufacturer's protocol. Each mRNA sample was quantified spectrophotometrically (Biotech Epoch™ spectrophotometer), and the purity was determined by the 260/280 nm ratio, with an acceptable index in the range of 1.8 to 2.0. All samples exhibited an index between 1.9 and 2.0. The integrity of samples was also evaluated by agarose/formaldehyde gel electrophoresis, which allowed observation of the presence of the eukaryotic ribosomal subunits 18S and 28S, indicating high integrity of the mRNA samples. To ensure integrity and purity, repurification was performed using the Agencourt® RNAClean™ XP kit (Beckman Coulter) according to the manufacturer's protocol.

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of mRNA and random hexamers in a total volume of 20 µl, according to the manufacturer's protocol, using Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT, Promega).

2.2.2. Real-time PCR

Real time quantitative PCR was performed on a LightCycler 2.0 Real-time Polymerase chain reaction (PCR) platform (Roche), where each reaction contained a volume equivalent to 500 ng of cDNA, 0.5 µg of each primer, 0.2 µM TaqMan probe, 2 µl of TaqMan Master Mix (Roche) and ddH₂O to a final volume of 10 µl. The primers used for the amplification of REST/NRSF were as follows: Fw: 5'-GCATCAGGTGCTCCAGATATT-3', Rv: 3'-GCTTCATATTGGCATGGCTTAC-5'. Additionally, enolase-2 (*ENO2*, Fw: 5'-CAGGACTTTGTCAGGGACTATC-3', Rv: 3'-CCCTACATTGGCTGTGAACT-5') was amplified as an endogenous gene. The amplification program consisted of 1 cycle at 95 °C held for 10 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 10 s, 62 °C for 30 s, and 72 °C for 1 s. Standard qPCR curves were prepared with dilutions at known concentrations of gBlocks® fragments (Integrated DNA Technologies) of the sequences to be amplified for REST/NRSF and *ENO2*, which had been previously transiently transfected in chemocompetent DH5-α *Escherichia coli*. The detection of transcripts was sensitive to concentrations of 30 ng to 3 fg. Normalization of the expression values was conducted by calculating the changes in expression relative to the *ENO2* gene. The experimental data were analyzed using LightCycler software version 4.05 (Roche).

Table 1

Summary of clinical data of patients with MTLE and autopsied subjects and their correlations with REST/NRSF expression.

Clinical variables	Patients			Autopsies		
	Subjects (n = 28)	mRNA Correlation (r)	Protein Correlation (r)	Subjects (n = 13)	mRNA Correlation (r)	Protein Correlation (r)
Gender (M:F)	15:13	–	–	7:6	–	–
Age (years)	32 ± 1.4	–0.227	0.0779	34.5 ± 3.2	–0.417	0.646*
Age of onset of seizures (years)	13.3 ± 2.05	0.0505	0.227	DNA	–	–
Duration of epilepsy (years)	20.2 ± 2.3	0.0406	–0.151	DNA	–	–
Seizure frequency (per month)	13.8 ± 3.3	–0.176	0.658*	DNA	–	–
Focus laterality (R:L)	14:14	–	–	DNA	–	–
Number of drugs prior to surgery	4.4 ± 0.48	0.111	0.0977	DNA	–	–
Post-Mortem Interval (h)	DNA	–	–	15.58 ± 0.8	0.435	–0.0704

M, male; F, female; R, right; L, left; h, hours; DNA, Does not apply. Values are mean ± SEM, and values *r* are Pearson correlation Coefficients.

* *p* < 0.05 indicated by bold values.

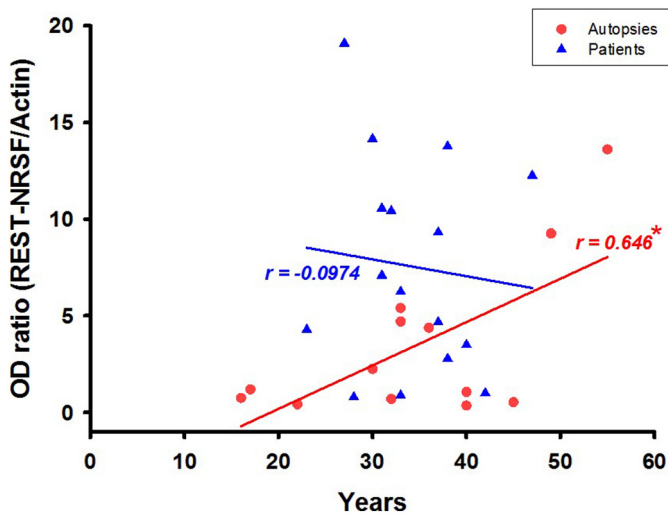


Fig. 1. Correlation of age with the REST/NRSF mRNA expression in human hippocampus. The graph shows the correlation of the relative expression of REST/NRSF mRNA with the age of autopsies and patients. Notice that the significant correlation found in autopsies is not evident in patients with drug-resistant MTLE. r indicates the value of the Pearson coefficient, * $p < 0.05$.

2.3. Evaluation of REST/NRSF protein expression

2.3.1. Protein extraction

The hippocampal tissue was mechanically homogenized in a 1:5 ratio (weight/volume) with NP-40 lysis buffer supplemented with the cOmplete (Roche) cocktail of protease inhibitors. The homogenate was centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min at 4°C , and the supernatant was separated and stored at -80°C until processing. The integrity was determined by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) with Coomassie blue staining, which allowed the evaluation of bands of all molecular weights. The concentration of proteins was determined by the Bradford method, using the Pierce™ Coomassie Protein Assay kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol.

2.3.2. Western blot

A volume equivalent to $100 \mu\text{g}$ of protein was separated by electrophoresis on an 8% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane, which was blocked with albumin and skim milk (1:5) diluted in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) for 1 h at room temperature. Subsequently, the membranes were incubated with primary antibodies against REST/NRSF (150 kDa, 1:1000, ab75785, Abcam) and β -actin as loading control (42 kDa, 1:1000, sc-69879, Santa Cruz Biotechnology) at 4°C overnight. After three washes

with TBST, the membranes were incubated with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase in TBST (1:5000) for 90 min at room temperature. After three washes with TBST, the membranes were washed with a solution of sodium chloride (NaCl) (0.5 M) and reacted for 2 min with the chemiluminescence reagent Luminata Crescendo Western HRP substrate (Millipore). Images were acquired with a FUSION-FX7 Advanced photodocumenter (ThermoFisher). The optical density of the bands was determined using ImageJ software (National Institutes of Health, NIH).

2.4. Statistical analysis

The values obtained from patients and autopsied subjects were compared using Mann–Whitney test. Pearson's correlation coefficients between the expression of REST/NRSF (mRNA and protein) and clinical factors were determined. The REST/NRSF mRNA and protein expression was also estimated according to psychiatric comorbidities and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with a post hoc Dunn–Sidak test (Bonferroni). SigmaPlot 12.5 software was used for all statistical analyses. A p -value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Clinical characteristics of the experimental subjects

The clinical data of the autopsies were as follows ((mean \pm Standard Error of the Mean (SEM)): age, 34.5 ± 3.2 years and the postmortem interval (PMI), 15.58 ± 0.88 h. The age of the autopsied subjects was not significantly different when compared with that of patients with MTLE (32 ± 1.4 years, $p > 0.05$) (Table 1).

Patients with MTLE used 2 or more antiepileptic drugs (AEDs) during the presurgical period. Their clinical data were as follows: age of disorder onset, 13.3 ± 2.05 years; duration of epilepsy, 20.2 ± 2.3 years; and frequency of epileptic seizures, 13.8 ± 3.3 per month (Table 1).

3.2. Expression of REST/NRSF in the hippocampus of autopsied subjects

No significant correlation was found between the PMI and the REST/NRSF mRNA and protein expression values ($r = 0.435$, $p > 0.05$; and 0.0704 , $p > 0.05$, respectively) (Table 1). These results indicate that the PMI range of the autopsied subjects evaluated in the present study did not influence the expression of REST/NRSF.

The protein expression of REST/NRSF was positively correlated with the age of the autopsied subjects ($r = 0.646$, $p < 0.05$), i.e., the older the age, the higher the protein expression of REST/NRSF in hippocampus. This condition was not evident for mRNA expression ($r = -0.417$, $p > 0.05$) (Table 1, Fig. 1). No other significant correlations were found.

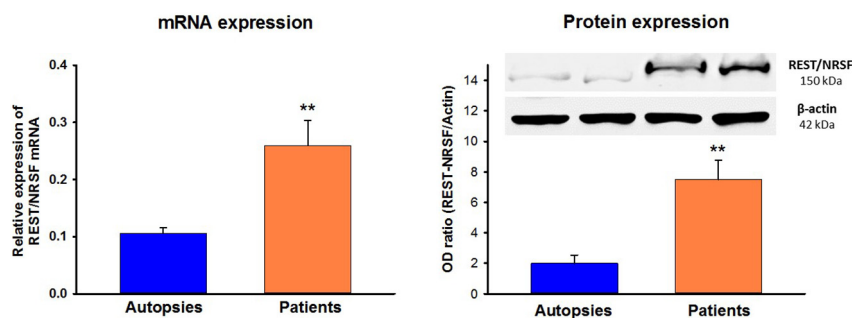


Fig. 2. REST/NRSF expression in the hippocampus of autopsies and patients with pharmacoresistant MTLE. The left graph shows the relative expression of REST/NRSF mRNA. The right graph presents the optical density ratio between protein expression of REST/NRSF and the β -actin, and representative images obtained from the western blots. The results are expressed as mean \pm SEM. T-test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

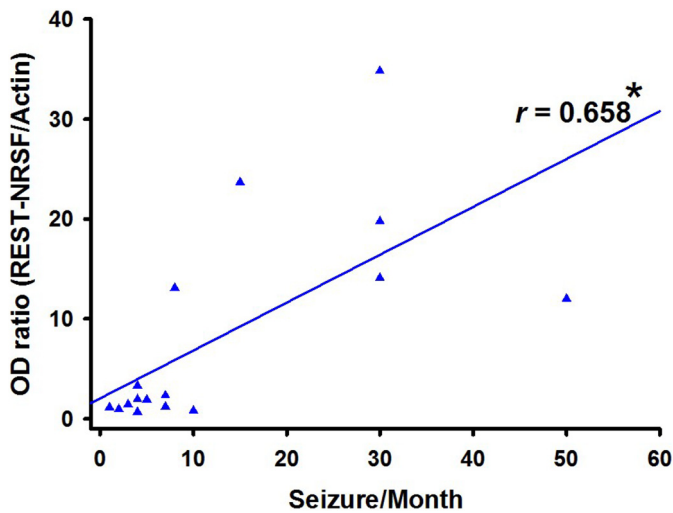


Fig. 3. Correlation between the frequency of epileptic seizures and the protein expression of REST/NRSF in the hippocampus of patients with pharmacoresistant MTLE. The graph shows the correlation between the protein expression of REST/NRSF expressed as optical density and the frequency of seizures per month. r indicates the value of the Pearson coefficient, * $p < 0.05$.

3.3. Expression of REST/NRSF in the hippocampus of patients with MTLE

Compared with autopsied subjects, the hippocampus of patients with MTLE showed an increase in REST/NRSF expression for both mRNA (146%, $p < 0.01$) and protein (273%, $p < 0.01$) (Fig. 2).

The correlation analysis of the results obtained with the clinical variables revealed that the higher frequency of seizures was associated with the higher protein expression of REST/NRSF in the hippocampus ($r = 0.658$, $p < 0.05$) (Table 1, Fig. 3). No significant correlations were found between the expression of REST/NRSF and other clinical variables. It is important to mention that the positive correlation between the protein expression of REST/NRSF and age that was found in autopsied subjects was not evident in patients with MTLE (Table 1, Fig. 1).

Clinical evaluation revealed that 13 patients with MTLE presented comorbid mood alterations: 3 patients had anxiety, 5 had depression, and 5 underwent anxiety plus depression. These patients with MTLE plus mood disorders exhibited an overexpression of REST/NRSF in mRNA (55% vs autopsies, $p > 0.05$) and protein (148% vs autopsies, $p < 0.05$). Fifteen patients had MTLE without psychiatric disorders. The hippocampus of these patients showed a more evident overexpression of REST/NRSF (mRNA, 171%, $p < 0.001$ vs autopsies; protein, 230%, $p <$

0.001 vs autopsies) (Fig. 4). No clinical conditions correlate with the overexpression of REST/NRSF in patients with and without mood disorders.

4. Discussion

The present study was focused to evaluate the expression of the transcription factor REST/NRSF in the hippocampus of autopsies and patients with pharmacoresistant MTLE. In autopsies, the protein expression of REST/NRSF was age-dependent, a condition not evident in the hippocampus of patients with MTLE. An important finding was that REST/NRSF was overexpressed in the epileptic hippocampus. The protein overexpression correlated with the seizure frequency. In addition, the higher expression of REST/NRSF was more evident in patients with MTLE without anxiety and depression.

For the present study, it was essential to verify the viability and quality of the autopsy samples in order to consider them as control condition. In this regard, the spectrophotometric and integrity assessments were consistent with the established criteria (see **Materials and methods** section) [32,33]. It is known that the integrity of mRNA can be affected by a prolonged PMI [34]. Under our experimental conditions, we did not find a significant correlation between the PMI (range of 10 to 18 h) of autopsies and their mRNA and protein expression. These findings support that the values obtained from the autopsies can be considered as a control condition.

During brain development, REST/NRSF activity is high because it regulates the differentiation of nonneuronal cells to neurons through the silencing of proneuronal genes [5]. In the mature brain, neurodevelopmental activity decreases, and the levels of REST/NRSF are low [6]. The results obtained from autopsies support the low expression of REST/NRSF in mature brain, a condition that can be regulated by epigenetic factors. Concerning this issue, it is known that the silencing of the REST gene results from the methylation of its promoter in three regions with high frequency of cytosines and guanines prone to be methylated (CpG islands). [35]. The expression of REST/NRSF is also repressed by miR-124 [19]. In spite of its low expression, REST/NRSF plays an important role in the mature brain. A previous study indicates that the expression of REST/NRSF in the human prefrontal cortex and hippocampus positively correlates with a good preservation of cognitive functions during aging, a condition that is lost in subjects with Alzheimer's disease [6]. An interesting finding from our experiments was that age correlated with the REST/NRSF protein, but not mRNA expression, in the hippocampus of autopsies. This group of evidence supports the notion that the age-dependent protein expression of REST/NRSF may modulate neuroprotective mechanisms against toxic insults that increase with aging [6]. The mismatch between the expression of mRNA and protein of REST/NRSF in autopsies can be due to the participation of many posttranscriptional mechanisms involved in translating

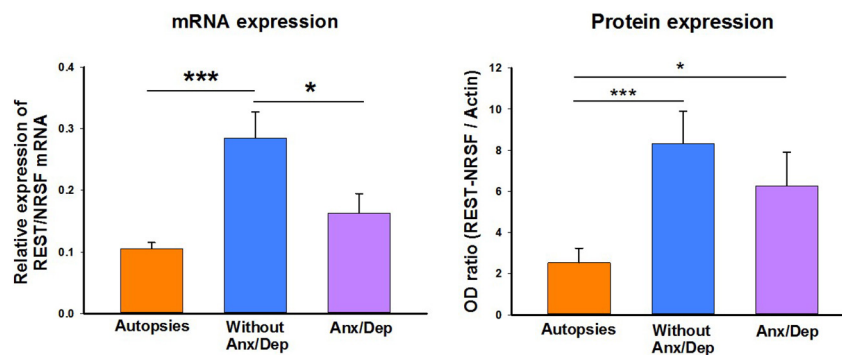


Fig. 4. REST/NRSF expression in the hippocampus of patients with drug-resistant MTLE with and without comorbid anxiety and depression. The graphs show the mRNA (left) and protein (right) expression of REST/NRSF in autopsies, patients with MTLE without mood disorders, and patients with MTLE and comorbid anxiety and depression. The results are expressed as mean \pm SEM. ANOVA and Dunn-Sidak post hoc test, * $p < 0.05$.

mRNA [36]. These mechanisms can modify the rate of transcription depending on the cellular necessities of protein expression. The above information suggests that under normal conditions, the transcription factor is translated according to cellular requirements, independently of mRNA levels.

Our results revealed that the epileptic hippocampus of patients with MTLE showed an overexpression of REST/NRSF. In contrast to autopsies, the REST/NRSF expression in patients with MTLE was not age-dependent. It is possible that in brain disorders such as epilepsy, the REST/NRSF expression depends on abnormal insults such as excessive oxidative stress. This situation leads to the silencing of target genes that are essential to prevent neuronal death [7].

The overexpression of REST/NRSF in epileptic tissue may result from the activation of the canonical Wingless/Integrated (WNT) pathway. In this pathway, β -catenin directly regulates the REST gene and other genes related to the control of progenitor cells [37]. The overexpression of β -catenin and other effectors of the WNT pathway is associated with aberrant hippocampal neurogenesis in MTLE [38]. In addition, Wnt/ β -catenin signaling is involved in seizure-induced neurogenesis, seizure susceptibility, and epileptogenesis [39]. Other studies indicate that the activation of WNT pathway is a mechanism that reduces the high extracellular levels of glutamate by the expression of Excitatory Amino Acid Transporter 2 (EAAT2) [40]. Further studies are necessary to determine how the REST/NRSF expression regulated by β -catenin modifies the epileptic activity.

It is known that the REST gene is positively regulated by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element-binding (CREB) protein [35]. The activation of CREB results from the increase in extracellular levels of glutamate [41], a condition found in the hippocampus of patients with drug-resistant MTLE [42]. In addition, the enhanced expression of CREB is a consequence of the decreased expression of miR-124 in epileptic tissue [43]. The chronic activation of CREB induced in the epileptic hippocampus [44] represents other possible trigger factor for the REST/NRSF overexpression found in the present study.

The results obtained revealed that subjects with the highest frequency of epileptic seizures exhibited the highest REST/NRSF protein expression. It is known that the induction of an ictal event produces an increase in REST/NRSF expression, which returns to baseline 24 h later [18]. Because the release of glutamate augments with each epileptic seizure [45], it is possible that a high frequency of ictal events maintains the elevated expression of REST/NRSF by increasing CREB and/or β -catenin. It is important to notice that both the overexpression of β -catenin and excess in glutamate augment the expression of P-glycoprotein in brain endothelial cells [46]. The overexpression of this multidrug transporter in the blood–brain barrier is a condition that facilitates the pharmacoresistant phenotype in epilepsy [47,48]. In the future, it will be important to determine the role of the overexpression of REST/NRSF in pharmacoresistant epilepsy.

One important finding from our experiments was that patients with MTLE without psychiatric comorbidities showed a more evident overexpression of the REST/NRSF. This result supports a previous study indicating that the increase in REST/NRSF is associated with the reduction of psychiatry symptoms associated with stress [11]. The overexpression of REST/NRSF related with the absence of psychiatric comorbidities also supports a regulation mediated by miR-124 and CREB in the manifestation of mood disorders. The hippocampus of subjects with depression presents a high expression of miR-124 [49], a condition associated with low expression of CREB, in both its native and phosphorylated forms [50–52]. On the other hand, the transcriptional induction of CREB in the hippocampus of mice has an antidepressant and anxiolytic effect [53], and treatment with antidepressants leads to an increase in CREB expression [54,55]. In addition, the chronic antidepressant administration modifies hippocampal expression of multiple components of the Wnt/ β -catenin cascade, including an increase of WNT2, a subtype of Wnts [56]. In contrast to patients with MTLE without comorbid

disorders, patients with MTLE plus anxiety and depression showed a less significant overexpression of REST/NRSF. Future studies should be carried out to determine the mechanism by which the REST/NRSF-induced silencing of genes avoids psychiatric disorders in MTLE.

The AEDs received by patients during the presurgical period are another factor that can explain the changes in REST/NRSF expression. Topiramate and oxcarbazepine positively regulate CREB and activate the WNT pathway through Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) [57–59]. In contrast, drugs such as levetiracetam and valproic acid negatively regulate CREB and inhibit GSK3 β [60–62]. Antiepileptic drugs such as clobazam and lamotrigine do not induce changes in regulatory molecules of the WNT pathway [62]. In the present study, it was not possible to identify the influence of each AED administered during the presurgical period because all patients received polytherapy. Future studies in experimental models should be designed to identify the role of AEDs in the overexpression of REST/NRSF.

5. Conclusions

The findings obtained in the present study indicate that REST/NRSF is overexpressed in the hippocampus of patients with pharmacoresistant MTLE and that its protein expression is dependent on the frequency of epileptic seizures. In addition, our results support the notion that the increased expression of REST/NRSF is associated with lower comorbid mood disorders. Finally, the overexpression of this repressor transcription factor may be important in the regulation of genes that actively participate in the excitatory or inhibitory processes that lead to the development of MTLE and its comorbidities.

Acknowledgments

This manuscript constitutes a partial requirement to obtain the Ph.D. degree in the postgraduate program of “Ciencias Biomédicas” at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Víctor Navarrete-Modesto received support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (CVU 377494, grant 243431). Luisa Rocha received support from CONACyT (grant 220365). Sandra Orozco-Suárez received support from Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (Project R-2017-785-100).

Conflict of interest

None of the authors has any conflict of interest to disclose. We confirm that we have read the Journal’s position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

References

- [1] Roopra A, Huang Y, Dingleline R. Neurological disease: listening to gene silencers. *Mol Interv* 2001;1:219–28.
- [2] Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, Wold B. Genome-wide mapping of in vivo protein–DNA interactions. *Science* 2007;316:1497–502.
- [3] Mulligan P, Westbrook TF, Ottinger M, Pavlova N, Chang B, Macia E, et al. CDYL bridges REST and histone methyltransferases for gene repression and suppression of cellular transformation. *Mol Cell* 2008;32:718–26.
- [4] Garriga-Canut M, Schoenike B, Qazi R, Bergendahl K, Daley TJ, Pfender RM, et al. 2-Deoxy-D-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CTBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure. *Nat Neurosci* 2006;9:1382–7.
- [5] Palm K, Belluardo N, Metsis M, Timmusk T. Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J Neurosci* 1998;18:1280–96.
- [6] Lu T, Aron L, Zullo J, Pan Y, Kim H, Chen Y, et al. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer’s disease. *Nature* 2014;507:448–54.
- [7] Hwang JY, Zukin RS. REST, a master transcriptional regulator in neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurobiol* 2018;48:193–200.
- [8] Abrajano JJ, Qureshi IA, Gokhan S, Molero AE, Zheng D, Bergman A, et al. Corepressor for element-1-silencing transcription factor preferentially mediates gene networks underlying neural stem cell fate decisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:16685–90.

- [9] Sun YM, Greenway DJ, Johnson R, Street M, Belyaev ND, Deuchars J, et al. Distinct profiles of REST interactions with its target genes at different stages of neuronal development. *Mol Biol Cell* 2005;16:5630–8.
- [10] Singh-Taylor A, Molet J, Jiang S, Korosi A, Bolton JL, Noam Y, et al. NRSF-dependent epigenetic mechanisms contribute to programming of stress-sensitive neurons by neonatal experience, promoting resilience. *Mol Psychiatry* 2018;23:648–57.
- [11] Ashton NJ, Hye A, Leckey CA, Jones AR, Gardner A, Elliott C, et al. Plasma REST: a novel candidate biomarker of Alzheimer's disease is modified by psychological intervention in an at-risk population. *Transl Psychiatry* 2017;7:e1148.
- [12] Otsuki K, Uchida S, Wakabayashi Y, Matsubara T, Hobara T, Funato H, et al. Aberrant REST-mediated transcriptional regulation in major depressive disorder. *J Psychiatr Res* 2010;44:378–84.
- [13] Kim SM, Yang JW, Park MJ, Lee JK, Kim SU, Lee YS, et al. Regulation of human tyrosine hydroxylase gene by neuron-restrictive silencer factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:426–35.
- [14] Javoy-Agid F, Hirsch EC, Dumas S, Duyckaerts C, Mallet J, Agid Y. Decreased tyrosine hydroxylase messenger RNA in the surviving dopamine neurons of the substantia nigra in Parkinson's disease: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 1990;38:245–53.
- [15] Zuccato C, Belyaev N, Conforti P, Ooi L, Tartari M, Papadimitou E, et al. Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *J Neurosci* 2007;27:6972–83.
- [16] Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, et al. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 2003;35:76–83.
- [17] Lepagnol-Bestel AM, Zvara A, Maussion G, Quignon F, Ngimbou B, Ramoz N, et al. DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome. *Hum Mol Genet* 2009;18:1405–14.
- [18] Spencer EM, Chandler KE, Haddley K, Howard MR, Hughes D, Belyaev ND, et al. Regulation and role of REST and REST4 variants in modulation of gene expression in vivo and in vitro in epilepsy models. *Neurobiol Dis* 2006;24:41–52.
- [19] Brennan GP, Dey D, Chen Y, Patterson KP, Magnetta EJ, Hall AM, et al. Dual and opposing roles of microRNA-124 in epilepsy are mediated through inflammatory and NRSF-dependent gene networks. *Cell Rep* 2016;14:2402–12.
- [20] McClelland S, Flynn C, Dube C, Richichi C, Zha Q, Ghestem A, et al. Neuron-restrictive silencer factor-mediated hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channelopathy in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2011;70:454–64.
- [21] Grigorenko E, Glazier S, Bell W, Tytell M, Nosel E, Pons T, et al. Changes in glutamate receptor subunit composition in hippocampus and cortex in patients with refractory epilepsy. *J Neurol Sci* 1997;153:35–45.
- [22] McClelland S, Brennan GP, Dube C, Rajpara S, Iyer S, Richichi C, et al. The transcription factor NRSF contributes to epileptogenesis by selective repression of a subset of target genes. *Elife* 2014;3:e01267.
- [23] Pozzi D, Lignani G, Ferrea E, Contestabile A, Paonessa F, D'Alessandro R, et al. REST/NRSF-mediated intrinsic homeostasis protects neuronal networks from hyperexcitability. *EMBO J* 2013;32:2994–3007.
- [24] Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, Gleiss A, Dal-Bianco A, Zimprich A, et al. Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2004;63:1087–9.
- [25] Tellez-Zenteno JF, Patten SB, Jette N, Williams J, Wiebe S. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia* 2007;48:2336–44.
- [26] Hitiris N, Mohanraj R, Norrie J, Sills GJ, Brodie MJ. Predictors of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsy Res* 2007;75:192–6.
- [27] Petrovski S, Szoek CE, Jones NC, Salzberg MR, Sheffield LJ, Huggins RM, et al. Neuropsychiatric symptomatology predicts seizure recurrence in newly treated patients. *Neurology* 2010;75:1015–21.
- [28] Aronica E, Gorter JA. Gene expression profile in temporal lobe epilepsy. *Neuroscientist* 2007;13:100–8.
- [29] Quiske A, Helmstaedter C, Lux S, Elger CE. Depression in patients with temporal lobe epilepsy is related to mesial temporal sclerosis. *Epilepsy Res* 2000;39:121–5.
- [30] Rocha L, Alonso-Vanegas M, Martinez-Juarez IE, Orozco-Suarez S, Escalante-Santiago D, Feria-Romero IA, et al. GABAergic alterations in neocortex of patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy can explain the comorbidity of anxiety and depression: the potential impact of clinical factors. *Front Cell Neurosci* 2014;8:442.
- [31] Salzmann A, Malafosse A. Genetics of temporal lobe epilepsy: a review. *Epilepsy Res Treat* 2012;2012:863702.
- [32] Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. *Biotechniques* 1995;18:62–3.
- [33] Aranda PS, Lajoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 2012;33:366–9.
- [34] Birdsill AC, Walker DG, Lue L, Sue LI, Beach TG. Postmortem interval effect on RNA and gene expression in human brain tissue. *Cell Tissue Bank* 2011;12:311–8.
- [35] Kreisler A, Strissel PL, Strick R, Neumann SB, Schumacher U, Becker CM. Regulation of the NRSF/REST gene by methylation and CREB affects the cellular phenotype of small-cell lung cancer. *Oncogene* 2010;29:5828–38.
- [36] Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 2003;4:117.
- [37] Nishihara S, Tsuda L, Ogura T. The canonical Wnt pathway directly regulates NRSF/REST expression in chick spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:55–63.
- [38] Qu Z, Su F, Qi X, Sun J, Wang H, Qiao Z, et al. Wnt/beta-catenin signalling pathway mediated aberrant hippocampal neurogenesis in kainic acid-induced epilepsy. *Cell Biochem Funct* 2017;35:472–6.
- [39] Hodges SL, Lugo JN. Wnt/beta-catenin signaling as a potential target for novel epilepsy therapies. *Epilepsy Res* 2018;146:9–16.
- [40] Lutgen V, Narasipura SD, Sharma A, Min S, Al-Harthi L. Beta-catenin signaling positively regulates glutamate uptake and metabolism in astrocytes. *J Neuroinflammation* 2016;13:242.
- [41] Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pages C, Besson MJ, Hipskind RA, et al. Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol* 1999;19:136–46.
- [42] During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 1993;341:1607–10.
- [43] Wang W, Wang X, Chen L, Zhang Y, Xu Z, Liu J, et al. The microRNA miR-124 suppresses seizure activity and regulates CREB1 activity. *Expert Rev Mol Med* 2016;18:e4.
- [44] Park SA, Kim TS, Choi KS, Park HJ, Heo K, Lee BI. Chronic activation of CREB and p90RSK in human epileptic hippocampus. *Exp Mol Med* 2003;35:365–70.
- [45] Haglid KG, Wang S, Qiner Y, Hamberger A. Excitotoxicity. Experimental correlates to human epilepsy. *Mol Neurobiol* 1994;9:259–63.
- [46] Lim JC, Kania KD, Wijesuriya H, Chawla S, Sethi JK, Pulaski L, et al. Activation of beta-catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *J Neurochem* 2008;106:1855–65.
- [47] Kubota H, Ishihara H, Langmann T, Schmitz G, Stieger B, Wieser HG, et al. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res* 2006;68:213–28.
- [48] Bauer B, Hartz AM, Pekcec A, Toellner K, Miller DS, Potschka H. Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Mol Pharmacol* 2008;73:1444–53.
- [49] Bahi A, Chandrasekar V, Dreyer JL. Selective lentiviral-mediated suppression of microRNA124a in the hippocampus evokes antidepressant-like effects in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2014;46:78–87.
- [50] Yamada S, Yamamoto M, Ozawa H, Riederer P, Saito T. Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Neural Transm (Vienna)* 2003;110:671–80.
- [51] Barrot M, Wallace DL, Bolanos CA, Graham DL, Perrotti LI, Neve RL, et al. Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8357–62.
- [52] Pandey SC, Roy A, Zhang H. The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:396–409.
- [53] Chen AC, Shirayama Y, Shin KH, Neve RL, Neuman RS. Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect. *Biol Psychiatry* 2001;49:753–62.
- [54] Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *Lancet* 1998;352:1754–5.
- [55] Wallace DL, Han MH, Graham DL, Green TA, Vialou V, Iniguez SD, et al. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. *Nat Neurosci* 2009;12:200–9.
- [56] Okamoto H, Voleti B, Banasr M, Sarhan M, Duric V, Girgenti MJ, et al. Wnt2 expression and signaling is increased by different classes of antidepressant treatments. *Biol Psychiatry* 2010;68:521–7.
- [57] Motaghinejad M, Motevalian M, Abdollahi M, Heidari M, Madjd Z. Topiramate confers neuroprotection against methylphenidate-induced neurodegeneration in dentate gyrus and CA1 regions of hippocampus via CREB/BDNF pathway in rats. *Neurotox Res* 2017;31:373–99.
- [58] Motaghinejad M, Motevalian M, Babalouei F, Abdollahi M, Heidari M, Madjd Z. Possible involvement of CREB/BDNF signaling pathway in neuroprotective effects of topiramate against methylphenidate induced apoptosis, oxidative stress and inflammation in isolated hippocampus of rats: molecular, biochemical and histological evidence. *Brain Res Bull* 2017;132:82–98.
- [59] Arora T, Bhowmik M, Khanam R, Vohora D. Oxcarbazepine and fluoxetine protect against mouse models of obsessive compulsive disorder through modulation of cortical serotonin and CREB pathway. *Behav Brain Res* 2013;247:146–52.
- [60] Kikuyama H, Hanaoka T, Kanazawa T, Yoshida Y, Mizuno T, Toyoda H, et al. The mechanism of anti-epileptogenesis by levetiracetam treatment is similar to the spontaneous recovery of idiopathic generalized epilepsy during adolescence. *Psychiatry Invest* 2017;14:844–50.
- [61] Lin XP, Feng L, Xie CG, Chen DB, Pei Z, Liang XL, et al. Valproic acid attenuates the suppression of acetyl histone H3 and CREB activity in an inducible cell model of Machado-Joseph disease. *Int J Dev Neurosci* 2014;38:17–22.
- [62] Sani G, Napolitano F, Forte AM, Kotzalidis GD, Panaccione I, Porfiri GM, et al. The wnt pathway in mood disorders. *Curr Neuropharmacol* 2012;10:239–53.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Epilepsy Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/epilepsyres

Review article

The molecular hallmarks of epigenetic effects mediated by antiepileptic drugs



Victor Navarrete-Modesto^{a,b}, Sandra Orozco-Suárez^b, Iris A. Feria-Romero^b, Luisa Rocha^{c,*}

^a Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

^b Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano de Seguro Social, Ciudad de México, México

^c Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), México

ARTICLE INFO

Keywords:

Epigenetics
Chromatin
Epilepsy
Antiepileptic drugs

ABSTRACT

Epilepsy is associated with several epigenetic changes, such as DNA methylation, histone modification, and alterations in the synthesis and functioning of non-coding RNAs (ncRNAs). Paradoxically, antiepileptic drugs (AEDs) that are widely used to control epilepsy may also induce epigenetic modifications and alter the structure of chromatin. As a consequence, changes in the expression of various factors involved in the pathology of epilepsy may positively or negatively affect the course of the disease. It should be noted that while AEDs are widely used in the treatment of epilepsy and other neurological disorders, many of their epigenetic consequences are still unknown. Moreover, an improved understanding of AED-induced epigenetic alterations could provide new targets for future therapeutic interventions. In this review, we give a general overview of the current scientific evidence concerning the epigenetic effects of AEDs that are currently in clinic use and have been evaluated to date.

1. Introduction

Epilepsy is a neurological disorder with a high prevalence worldwide (4.7 to 12 per 1000) (Ngugi et al., 2010). People suffering from epilepsy present with spontaneous recurrent seizures that are a result of brain alterations. The quality of life for people with epilepsy can be impaired due to seizure activity, a high likelihood of mood and psychiatric disorders, cognitive alterations and the side effects of antiepileptic drugs (AEDs).

The purpose of any pharmacological anticonvulsant treatment is to control the epileptic activity and comorbid disorders, as well as to improve the quality of life for the patient (Wei et al., 2015). However, AEDs induce a number of side effects that include cognitive and behavioral disorders (Cavanna et al., 2010; Loring and Meador, 2001) and emotional (Brodie et al., 2016) and endocrine impairments (Hamed, 2016).

People with epilepsy present a high comorbidity of psychiatric disorders including psychosis, neuroses, mood disorders and behavioral changes with epilepsy (Tellez-Zenteno et al., 2007). Depression in epilepsy, the most common comorbidity, is associated with multiple risk factors, specific types of seizures and various biochemical alterations (Gaitatzis et al., 2004). Moreover, people with epilepsy are 2–11

times more likely to have schizophrenia than the people without epilepsy, depending upon the severity of seizures (Fruchter et al., 2014). Personality disorders, especially Borderline Personality Disorder (BPD) and bipolar disorder (BD), have a high prevalence (18%) in people with epilepsy. A number of explanations of the high comorbidity of psychiatric disorders in epilepsy have been put forth, including genetics, structural changes and pharmacological therapies (Sucksdorff et al., 2015; Swinkels et al., 2003). In addition, people with epilepsy may develop treatment-emergent psychiatric adverse events of AEDs, regardless of the mechanism of action of the drug (Mula, 2017; Mula et al., 2007). This information leads to suggest that epigenetic changes induced by AEDs in people with epilepsy may be involved in the high prevalence of comorbid psychiatric disorders (see Section 4), and they have to be considered during clinical therapy.

Epigenetic modifications at the level of DNA or histones that are associated with epilepsy, as well as other mediating factors, could represent new targets for the development of more selective and effective AEDs that have fewer side-effects (Wei et al., 2015). For example, the design of epigenetic therapies that selectively inhibit DNA methylation and thereby reactivate the expression of silenced genes represents an option for epilepsy treatment.

The first section of this review includes a general description of

* Corresponding author at: Department of Pharmacobiology, Center for Research and Advanced Studies, Mexico City, México.

E-mail address: lrocha@cinvestav.mx (L. Rocha).

<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2018.11.006>

Received 3 April 2018; Received in revised form 16 October 2018; Accepted 14 November 2018

Available online 16 November 2018

0920-1211/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

epigenetics. The next section presents information regarding the involvement of epigenetic regulation in human epilepsy. The last section focuses on the presentation of evidence of the induction of epigenetic changes by AEDs. This information was obtained through bibliographic searches of PubMed (NIH) and Google Scholar using the following search terms: “epigenetics and epilepsy”, “epilepsy and DNA methylation”, “epilepsy and histones modifications”, “epilepsy and... (each one of the most common histone modifications)”, “epilepsy and ncRNAs”, “epigenetics and AEDs” and “epigenetics and...(each one of the 33 AEDs in clinical use currently)” (Supplementary Table). This search found evidence of involvement in epigenetic changes for only 13 AEDs, while for the remainder (20 AEDs), no such evidence was found.

2. Epigenetic regulation of gene expression

DNA is compressed hierarchically into the cell nucleus via its association with positively charged small alkaline proteins known as *histones*. Each of the histones (H2A, H2B, H3 and H4) consists of a globular domain, a flexible domain, and a charged amino (NH₂)-terminal end that protrudes from the nucleosome, known as the “histone tail” (Fischle et al., 2003; Jenuwein and Allis, 2001; Marino-Ramirez et al., 2005). In addition, *histone variants* are isoforms of the four canonical histones that also can be incorporated into the nucleosome, undergo modifications and perform specific functions (Marino-Ramirez et al., 2005; Vaquero et al., 2003). Together, DNA and histones are part of the *nucleosomes*, each of which consists of ~147 bp of DNA wrapped 1.75 times around an octamer histone core and constitutes the first level of chromatin compaction (Devaskar and Raychaudhuri, 2007). The second level of chromatin organization is the *pearl necklace*, which is composed of 11-nm beads (nucleosomes) connected by a fragment of DNA of ~10–60 bp (Hansen, 2012; Vaquero et al., 2003). The third level of chromatin organization results when the “pearl necklace” is wrapped approximately six times to form a circular fibrillary structure of ~30 nm in diameter that is stabilized by a histone known as an H1 linker (Vaquero et al., 2003). The fourth level of chromatin compaction consists of 300-nm *loops*. The fifth level of compaction occurs when these *loops* are folded into 250-nm fibers that are packed together to form chromatids, which comprise one-half of the two identical threadlike strands that make up each chromosome (Annunziato, 2008) (Fig. 1).

The mechanism known as chromatin remodeling regulates the transcriptional state of DNA via a coordinated system of ATP-dependent protein complexes that are known as chromatin remodeling complexes (CRCs). These complexes regulate the degree of compaction of the chromatin by moving, expelling or restructuring the nucleosomes (Clapier and Cairns, 2009), in order to favor or prevent the binding of transcription factors to their specific binding sites within DNA (Li et al., 2015).

Chromatin is found in two states: a) *heterochromatin*, which is inaccessible to the transcription process due to its tightly packed condition, and b) *euchromatin*, which is less tightly packed in a way that facilitates the transcription process (Bannister and Kouzarides, 2011; Devaskar and Raychaudhuri, 2007; Grewal and Moazed, 2003) (Fig. 1). The conversion of heterochromatin into euchromatin and vice versa depends on the cell cycle and the environmental requirements of the cell (Bannister and Kouzarides, 2011).

Epigenetics, strictly speaking, is defined as “genetics out of the ordinary” (Jaenisch and Bird, 2003) and refers to heritable changes in gene expression and cell phenotype outside of modifications that affect the Watson-Crick pairing of bases (Goldberg et al., 2007). These modifications can regulate the structure of chromatin and provide a ‘fingerprint’ based on the environmental experiences of the cell (including its history of exposure to pharmaceuticals). The known epigenetic mechanisms that can modify gene expression without altering the DNA sequence are described below.

2.1. DNA methylation

Methylation is the covalent addition of methyl groups (–CH₃) to cytosine residues that reside predominantly in CpG islands. These are regions of greater than 500 bp that are rich in guanine and cytosine (G + C) and are usually located within promoter regions, which are sites involved in the initiation and regulation of transcription (Bannister and Kouzarides, 2011; Egger et al., 2004; Fazzari and Grealley, 2004). Over 60% of eukaryotic genes contain CpG islands in their promoters, and most are demethylated or hypomethylated (i.e., having a low proportion or loss of methyl groups) at all stages of development and in all tissues (Antequera, 2003). During aging or in several pathologies, however, a fraction of the CpG islands are liable to be methylated or hypermethylated (i.e., having excessive methyl groups) (Issa, 2000).

Methylation is carried out by DNA methyltransferases (DNMTs), proteins that are responsible for the *de novo* methylation of genes during the early stages of development (DNMT 3A and 3B) as well as the maintenance of established patterns of methylation (DNMT 1) (Bhutani et al., 2011; Tost, 2010). In contrast, the ten-eleven translocation (TET) protein family is primarily responsible for demethylation, which involves the removal or modification of 5mC methyl groups by hydroxylation via the formation of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) and other oxidation processes (Bhutani et al., 2011) (Fig. 1).

The methylation of CpG dinucleotides may induce the inhibition of transcription and thereby repress genes by stabilizing their inactivation (Bird, 2002). Indeed, gene coding regions can also be strongly methylated as a mechanism of silencing alternative promoters, retrotransposons and other functional elements in order to maintain transcriptional efficiency (Yang et al., 2014).

Various factors are involved in the methylation process. Methyl-CpG binding proteins (MBPs, complexes containing proteins such as MBD1, MBD2, MBD3 and MeCP2) mediate transcriptional repression via participation in three mechanisms: a) the addition of methyl groups that interfere with DNA-protein interactions, b) the methylation of CpG islands that attract inhibitory proteins; c) the recruitment of other associated proteins, such as histone deacetylases (HDACs), which are enzymes that remove acetyl groups (Bird, 2002; Nan et al., 1998; Tost, 2010).

2.2. Histone modifications

Histone modification is another type of epigenetic mechanism by which more than 100 different post-translational modifications may occur at the amino (N)-terminal ends of the histone tails in nucleosomes. Such modifications include methylation, acetylation, ubiquitination, phosphorylation, citrullination, ADP-ribosylation, sumoylation, and proline isomerization (Li et al., 2007) (Fig. 1). These modifications can result in the activation or repression of gene transcription, depending on the identity and location of the amino acid residue that is modified (Bernstein et al., 2007; Devaskar and Raychaudhuri, 2007; Li et al., 2007). Currently, the most commonly studied modifications are histone methylation, which leads to transcriptional silencing, and acetylation, which leads to transcriptional activation. There are a number of different types of effector proteins that mediate histone modification, including histone methyltransferases (HMTs), which are responsible for histone methylation, histone acetyltransferases (HATs), which mediate histone acetylation, and histone demethylases (HDMets), which remove methyl groups and HDACs (Devaskar and Raychaudhuri, 2007). In particular, the acetylation of lysine 9 in histone 3 (H3K9ac) and the trimethylation of lysine 4 in histone 3 (H3K4me3), as well as the general acetylation of H3, are associated with the active state of euchromatin, while the trimethylation of lysine 27 in histone 3 (H3K27me3) is associated with the silencing of heterochromatin (Lee et al., 2015).

ADP-ribosylation is another post-translational modification of histones that is mediated by ADP-ribose transferases, which transfer single

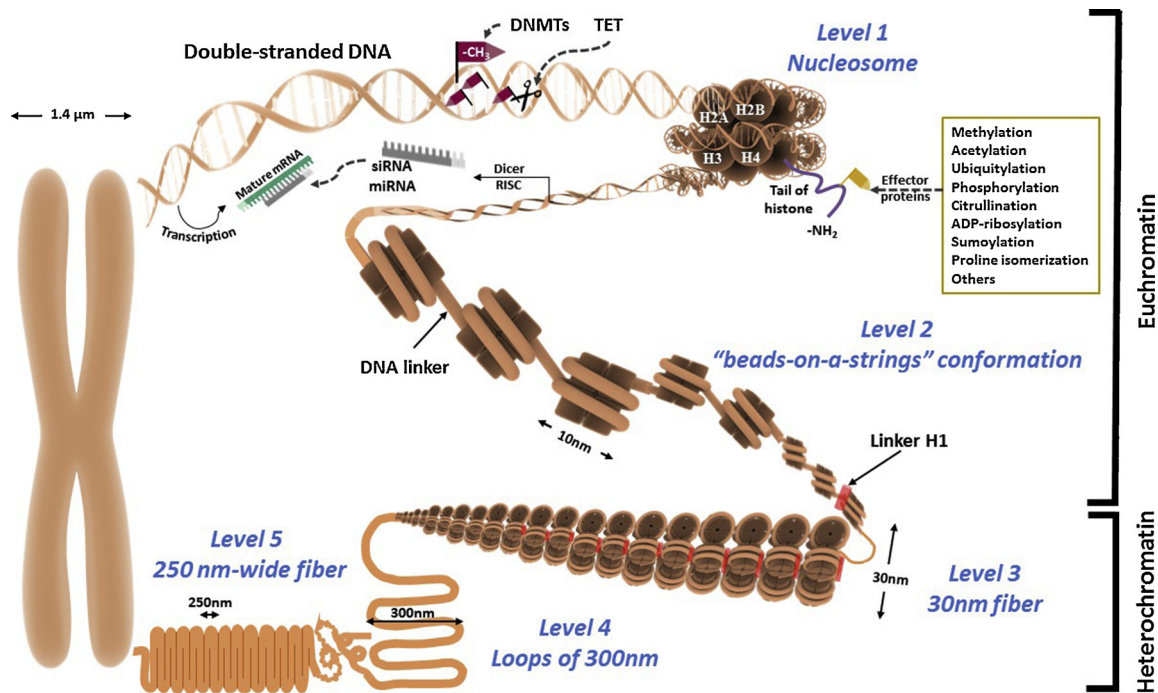


Fig. 1. Spatial organization of the genome and its epigenetic modifications. Chromosomes are formed from DNA "packaged" by histones into nucleosomes, and their structure depends on the degree of chromatin compaction, with heterochromatin being highly compacted and transcriptionally silent, while euchromatin has a more open structure and is transcriptionally active. The state of chromatin compaction can be regulated by epigenetic changes (DNA methylation via DNMTs; histone modifications through effector proteins; and the expression of ncRNAs) and depends on the transcriptional requirements of the cells. -NH₂, N (amino)-terminal group; -CH₃, methyl group; ncRNAs; DNMT, DNA methyltransferase; H1, histone 1, H2A, histone 2A; H2B, histone 2B; H3, histone 3; H4, histone 4; siRNA, miRNA, micro-RNA; non-coding RNAs; small interfering RNA; TET, Ten-Eleven traslocation protein.

or multiple ADP-ribose moieties from NAD⁺ to histone tails. This modification is of great biological importance due to its participation in the processes of DNA repair, cell proliferation, apoptosis, gene transcription and signal transduction (Liu and Yu, 2015; Messner and Hottiger, 2011).

In addition, there is a code that can be read and interpreted by the CRCs, known as the *histone code*, that transmits information about the presence of epigenetic changes and how they may influence other modifications (Jenuwein and Allis, 2001; Nightingale et al., 2006) and thereby modifies the rate of gene transcription (Egger et al., 2004; Strahl and Allis, 2000).

2.3. Non-coding RNAs

Non-coding RNAs (ncRNAs) are RNA transcripts that do not encode proteins and therefore cannot be translated (Saetrom et al., 2007). They can be classified as short/micro (< 200 nt) or long/macro (> 200 nt) ncRNAs, depending on their size (Henshall and Kobow, 2015). The most studied ncRNAs are small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs), which are both processed by the proteins Dicer and RISC but differ in their biogenesis (Fig. 1). In their mature form, these ncRNAs are 21–26 nucleotides in length and must be joined to the complementary mRNA sequence to induce effects (Valencia-Sanchez et al., 2006). The regulation of genes by siRNAs is via the highly specific (single target) endonucleolytic cleavage of mRNA. miRNAs, on the other hand, usually induce transcriptional repression via the degradation and proteolytic cleavage of mRNA within the 3'UTR region of as many as 100 target genes (Lam et al., 2015).

In addition to regulating the stability and translation of mRNAs, siRNAs and miRNAs induce gene silencing through the promotion of methylation and the alteration of the structure of chromatin (Castanotto et al., 2005; Godfrey et al., 2007; Holmes and Soloway, 2006; Morris et al., 2004; Suzuki et al., 2005). Specifically, miRNAs are able to bind to histones and induce DNA methylation at specific loci

(Egger et al., 2004; Godfrey et al., 2007; Wang et al., 2015), whereas siRNAs regulate the structure of chromatin via their interaction with the nuclease Dicer (Fukagawa et al., 2004)

The long non-coding RNAs (lncRNAs) are a family of molecules located primarily in the nucleus that includes enhancer RNAs (eRNAs), antisense transcripts and intergenic RNAs (Henshall and Kobow, 2015). These lncRNAs control the structure and function of chromatin via the promotion of DNA methylation through the recruitment of DNMTs, the positioning of the nucleosome and the formation of chromatin loops (Bohmdorfer and Wierzbicki, 2015). They also regulate, both positively and negatively, the transcriptional machinery and the stability of mRNA (Bohmdorfer and Wierzbicki, 2015; Kung et al., 2013). In the brain, the expression of lncRNAs differs depending on the region, stage of development, pluripotential conditions, and the status of neuronal and glial differentiation (Briggs et al., 2015; Quan et al., 2017). lncRNAs are involved in developmental processes, such as X-chromosome silencing and genomic imprinting, as well as diseases such as cancer (Kung et al., 2013) and α -thalassemia (Tufarelli et al., 2003). At present, lncRNAs are considered to be potential targets for the treatment of neurological disorders. In an experimental model of Dravet Syndrome that was caused by a heterozygous loss-of-function mutation in the *SCNA1* gene, Hsiao et al., (2016) demonstrated that the blockage of the repressor effect mediated by a lncRNA known as SCN1ANAT resulted in upregulation of the *SCNA1* gene, leading to subsequent improvement in the control of convulsive activity and the excitability of hippocampal interneurons.

3. Epigenetic regulation in human epilepsy

Epilepsy is a neurological disorder that is associated with great complexity in its epigenetic influences due to the presence of multiple etiologies (Qureshi and Mehler, 2010). The results of studies of both human and experimental models indicate that epileptogenesis and epilepsy itself are associated with the alteration of DNA methylation

Table 1
Epigenetic modifications induced by Antiepileptic Drugs (AEDs).

DNA methylation					
AED	Specific genes		DNMT		TET family
Hypermethylation		Hypomethylation			
CBZ	<i>GABRA1</i> gene 64 promoters in SK-N-SH neuroblastoma cells.	<i>SLC6A4</i> gene 14 promoters in SK-N-SH neuroblastoma cells.	NA		NA
LCM	NA	NA	NA		NA
LMT	Contradictory results	Contradictory results	NA		NA
OXC	<i>GABRB2</i> promoter	<i>MTHFR</i> amplicon	NA		NA
PHT	NA	Global	NA		NA
ESX	NA	NA	Induces DNMT 1 and DNMT 3 A		NA
GBP	NA	NA	NA		NA
PB	<i>CDKN2A</i> gene (tumor suppressor protein p16)	Global <i>HRAS</i> gene <i>CYP2D10</i> gene	Induces DNMT 1		NA
VGB	NA	NA	NA		NA
CBD	Global <i>KRT10</i> promoter	NA	Inhibit DNMT 1		NA
LVT	NA	NA	NA		NA
TPM	NA	NA	Inhibit DNMT 1, DNMT 3 A and DMAP1		NA
VPA	64 promoters in SK-N-SH neuroblastoma cells. <i>RELN</i> gene.	36 promoters in SK-N-SH neuroblastoma cells. <i>ALOX5</i> gene Global in epilepsy patients	NA		Inhibit mitochondrial TET1

Histones Modifications							
	H1	H2A	H2B	H3	H4	HDACs	
						Induction	Inhibition
CBZ	NA	NA	NA	NA	Induction of Acetylation	HDACs 2, 3, 5 and 8 Binding of HDAC1 to <i>CYP3A4</i> promoter	HDACs of class I & II
LCM	NA	NA	NA	NA	NA	NA	YES
LMT	NA	NA	NA	Induction of acetylation	Induction of acetylation	HDACs 2, 3, 5 and 8	YES HDACs 1 and 7
OXC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PHT	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NO
ESX	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NO
GBP	NA	NA	NA	NA	Does not induce acetylation	NA	NO
PB	Induction of ADP-ribosylation	Not dependent ADP-ribosylation	Induction of ADP-ribosylation	Induces H3K4me3 and inhibits H3K9me3 in <i>UGT1A</i> gene. Induces H3K27me3, H3K4me2 and H3K9ac and inhibits H3K27me3 in <i>CYP2B10</i> gene. Induces H3K4me3 in <i>CYP3A11</i> gene.	Not dependent ADP-ribosylation	NA	NA
VGB	NA	NA	NA	NA	Induction of acetylation	NA	NO
CBD	NA	NA	NA	Induces H3K9ac	NA	NA	NA
LVT	NA	NA	NA	Induction of acetylation	NA	HDACs 2, 3, 5 and 8	NA
TPM	NA	NA	NA	NA	Induction of acetylation	NA	NO
VPA	NA	Induction of acetylation.	NA	Induction of acetylation Induces H3K9ac and H3K4me3 in <i>LEPR</i> gene. Induces acetylation in <i>GAD1(67)</i> , <i>MAGEB2</i> and <i>MMP2</i> genes. Inhibits H3K27me3 in <i>LEPR</i> gene.	Induction of acetylation. Induction of acetylation in <i>CDKN1A</i> (p21WAF1/CIP1) gene. Induction of acetylation in, <i>MAGEB2</i> and <i>MMP2</i> genes	NA	HDACs of class I & II HDACs 1, 2, 3, 5 and 7

ncRNAs					
	Short RNAs miRNAs Induction		Inhibition		Long RNAs
				siRNAs	
CBZ	NA		NA		NA
LCM	NA		NA		NA
LMT	NA		NA		NA
OXC	NA		miR-134		NA
PHT	NA		NA		NA
ESX	NA		NA		NA

(continued on next page)

Table 1 (continued)

ncRNAs				Long RNAs	
Short RNAs					
miRNAs				siRNAs	
Induction		Inhibition			
GBP	NA	Does not induce miR-107		NA	NA
PB	miR-200a/200b/429 and miR-96/182	miR-122		NA	NA
VGB	NA	NA		NA	NA
CBD	NA	NA		NA	NA
LVT	miR-206, miR-374, miR-142-5p and miR-468	NA		NA	NA
TPM	NA	NA		NA	NA
VPA	miR-144, miR-331, miR-30a-5p, miR-20a, miR-34a, miR-449a, miR-221, miR-15a, miR-16, miR-129, miR-519e, miR-194, miR-214, miR-449a, miR-182, miR-206, miR-133a and miR-10a	let-7b, let-7c, miR-128a, miR-24a, miR-30c, miR-34a, miR-885-3p, miR-222, miR-15a, miR-16, miR-144, miR-451, miR-155, miR-127a, miR-124a, miR-128 and miR-137		NA	NA

ALOX5, 5-lipoxygenase gene; CBD, Cannabidiol; CBZ, Carbamacepine; *CDKN1A*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1 gene; *CDKN2A*, cyclin dependent kinase inhibitor 2 A gene; CYP3A4, Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A polypeptide 4 gene; CYP3A11, cytochrome P450 family 3 subfamily A polypeptide 11 gene; CYP2D10, cytochrome P450 family 2 subfamily D polypeptide 10 gene; *DMAP1*, Protein Associated with Dnmt1; DNMT, DNA methyltransferase; ESX, ethosuximide; GBP, gabapentin; GABRA1, GABA_A receptor subunit α 1 gene; GABRB2, GABA_A receptor subunit β 2 gene; GAD67, Glutamate Decarboxylase 1 (67 kDa) gene; H1, histone 1, H2A, histone 2A; H2B, histone 2B; H3, histone 3; H4, histone 4; HRAS, ha-ras proto-oncogene; HDAC, histone deacetylases; *KRT10*, keratin 10 gene; LCM, lacosamide; LEPR, Leptin Receptor gene; LMT, lamotrigine; LVT, levetiracetam; MAGEB2, Melanoma-associated antigen B2 gene; MMP2, Matrix Metalloproteinase 2 gene; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase gene; miRNA, micro-RNA; NA, No information Available; OXC, oxcarbazepine; PHT, phenytoin; PB, phenobarbital; RELN, reelin gene; siRNA, small interfering RNA; SLC6A4, solute carrier family 6 member 4 gene; TET, Ten-Eleven traslocation protein; TPM, topiramate; UGT1A, UDP-Glucuronosyltransferase Family 1 polypeptide A gene; VPA, valproic acid; VGB, vigabatrine.

signatures throughout the entire genome (Debski et al., 2016; Kobow and Blumcke, 2012). People with drug-resistant temporal lobe epilepsy (TLE) show an increase in the expression of DNMT1 and DNMT3A in the temporal neocortex, which is associated with alterations in the excitability of neural networks and synaptic plasticity (Zhu et al., 2012). Human TLE is also associated with aberrant methylation of the promoters of genes that are involved in the development of seizures (*Cpa6*) and the dispersion of hippocampal granule cells (*Reln*) (Belhedi et al., 2014; Kobow et al., 2009).

With regard to histone modification, epilepsy has been found to be associated with the overexpression of HDAC2, which is associated with an increase in deacetylase activity and inactivation of chromatin. These processes are involved in the regulation of genes associated with synaptic activity, plasticity and NMDA receptors, in both human (*BDNF*) and experimental models (*Erg1*, *Creb1*, *fos*) (Guan et al., 2009; Huang et al., 2012; Park et al., 2014).

Epilepsy has been associated with modifications of ncRNAs. It has been suggested that a polymorphism in the 3'-UTR of the *AP3M2* gene blocks the miR-422a binding site, which in turn facilitates epileptogenesis in humans (Huang et al., 2007). Fragile X syndrome people who develop epilepsy show changes in the expression of the *FMR4* and *ASFMR1* lncRNAs (Khalil et al., 2008; Ladd et al., 2007), as well as alterations in the function of FMRP (Fragile X Mental Retardation protein), which is associated with the deregulation of miRNA pathways (Qureshi and Mehler, 2010).

Seizure activity is also associated with the alteration of factors that are involved in regulating epigenetic modification. For example, in Rett syndrome, which is a neurodevelopmental disorder characterized by mental retardation, stereotypical behaviors, and recurrent seizures, there are mutations and duplications of the *MECP2* gene that have functional implications for DNA methylation processes (Amir et al., 1999; Jian et al., 2006; Kinde et al., 2016). Alpha-thalassemia X-linked intellectual disability (ATR-X) syndrome, characterized by mental retardation, altered facial and genital morphology, and the development of epilepsy in 30% of those affected, results from mutation of the *ATR-X* gene that encodes a CRC that is involved in the formation of heterochromatin at mammalian centromeres and telomeres (De La Fuente et al., 2011; Guerrini et al., 2000). People with Sotos syndrome, also known as cerebral gigantism, have a high risk of seizures that is associated with mutations and deletions in the *NSD1* gene, which encodes a histone methyltransferase (Baujat and Cormier-Daire, 2007). Mutations

in the *KDM5C* (*SMCX/JARID1C*) histone demethylase gene have been directly associated with epilepsy and X-linked mental retardation (Abidi et al., 2008; Tzschach et al., 2006). Repressor element 1 (RE1)-silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) represses the transcription of many neurological genes, including those related to epileptogenesis and epilepsy (Tahiliani et al., 2007). The absence of the interaction of REST/NRSF with the LIM domain protein as a consequence of mutations within the REST-interacting LIM domain protein (PRICKLE1/RILP) induces an autosomal-recessive, progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome (Bassuk et al., 2008).

Overall, there is much evidence to support the fact that epigenetic modifications commonly play a role in epilepsy. However, it is unknown at present whether or not epigenetic alterations are the consequence of treatment with AEDs.

4. Epigenetic modifications associated with AEDs

According to the International League Against Epilepsy (ILAE), there are four types of epilepsy: focal epilepsies, which include unifocal and multifocal syndromes as well as seizures comprising one hemisphere; generalized epilepsies, in which the epileptiform activity appears in the whole brain and is detected by EEG; combined generalized and focal epilepsy; this represents a combination of the first two types; and epilepsy of unknown type, a condition difficult to be determinate due to the lack of information (Scheffer et al., 2017).

Therapy with AEDs focuses on the reduction of excessively fast neural firing during seizures and the avoidance of the spread of epileptic activity to surrounding brain areas through activity against different targets that modulate neuronal activity.

The most important channels that are involved in maintaining neuronal function (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Cl^- channels) are critical targets for old and new AEDs (Brodie et al., 2016). The augmentation of inhibitory effects mediated by γ -aminobutyric acid (GABA) or the reduction of neuronal excitation through the blockade of glutamatergic effects are also mechanisms utilized by AEDs (Barker-Haliski and White, 2015). Additionally, AEDs may also induce epigenetic changes that modify the course of the disease. This section describes the presently known epigenetic effects of 13 AEDs that are in wide clinical use. Although other AEDs can induce epigenetic changes, there is not information to support this notion (Table 1, Figs. 2–4).

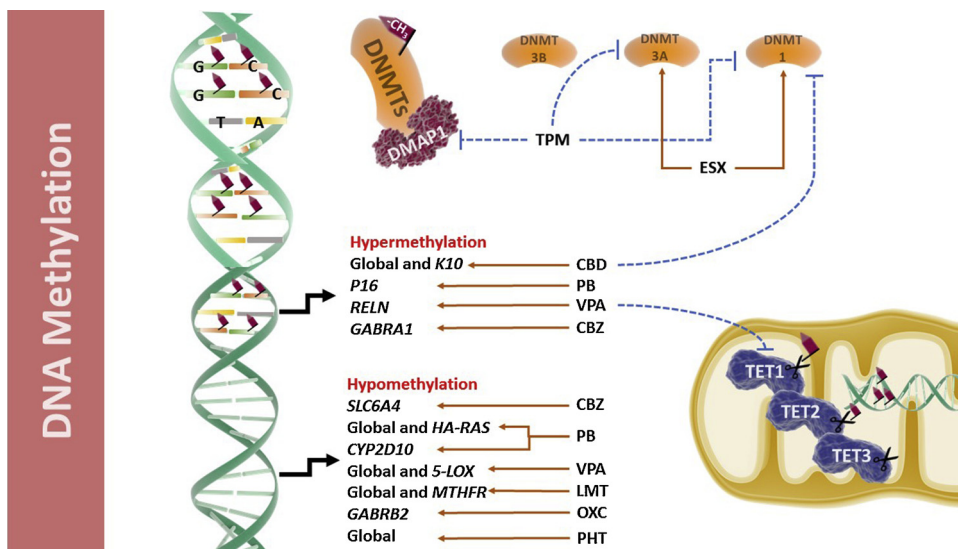


Fig. 2. Changes in DNA methylation elicited by AEDs. AEDs such as carbamazepine (CBZ), phenobarbital (PB) and valproic acid (VPA) can induce both genome-wide and gene-specific hypermethylation and hypomethylation. Cannabidiol (CBD) induces both genome-wide and gene-specific hypermethylation and the inhibition of DNA methyltransferase (DNMT) 1. Genome-wide and gene-specific hypomethylation is induced by lamotrigine (LMT), oxcarbazepine (OXC) and phenytoin (PHT). Ethosuximide (ESX) induces the expression of DNMT1 and 3 A; in contrast, topiramate (TPM) inhibits the expression of DNMT1 and the Protein Associated with Dnmt1 (DMAP1). VPA inhibits the expression of mitochondrial TET (Ten-Eleven traslocation protein) 1. Black arrows indicate active transcriptional processes; brown arrows indicate the induction of processes; and the dashed blue lines indicate inhibition. 5-LOX, 5-lipoxygenase gene; A, adenine; CYP2D10, cytochrome P450, family 2,

subfamily d, polypeptide 10 gene; C, cytosine; G, guanine; GABRA1, GABA_A receptor subunit α1 gene; GABRB2, GABA_A receptor subunit β2 gene; HA-RAS, ha-ras oncogene; K10, keratin 10 gene; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase gene; P16, P16 gene; RELN, reelin gene; SLC6A4, solute carrier family 6 member 4 gene; T, thymine.

4.1. AEDs that target voltage-dependent Na⁺ channels

4.1.1. Carbamazepine (CBZ)

The main mechanism of action of carbamazepine is the blockade of voltage-gated Na⁺ channels. It is used to control focal or generalized seizures (Cotterman-Hart, 2015a; Sheets et al., 2008; Willow et al., 1984). Regarding its epigenetic effects, there is evidence that CBZ has effects on DNA methylation; the results of an *in silico* study suggested that CBZ modifies the methylation patterns of the GABA_A receptor subunit α1 (GABRA1) gene (Houtepen et al., 2016). An *in vitro* genome-wide methylation study analyzing 14,475 genes in SK-N-SH neuroblastoma cells demonstrated that CBZ induced hyper- and

hypomethylation in CpGs in 64 and 14 gene promoters, respectively. One of the hypomethylated promoters is that of *SLC6A4*, which encodes a protein that transports serotonin in presynaptic neurons and could therefore affect the therapeutic efficacy of CBZ (Asai et al., 2013) (Table 1, Fig. 2).

Concerning histone modification, observations indicate that CBZ diluted in hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HBC) induces H4 acetylation and inhibition of HDAC I and II in HepG2 cells (human liver cancer cell line) (Beutler et al., 2005). However, this effect was not detected in HeLa cells when CBZ was diluted in DMSO (Eyal et al., 2004). In C57BL/6 mice, CBZ induced the synthesis of HDACs in the striatum (HDAC2, HDAC3, and HDAC8), nucleus accumbens (HDAC2 and

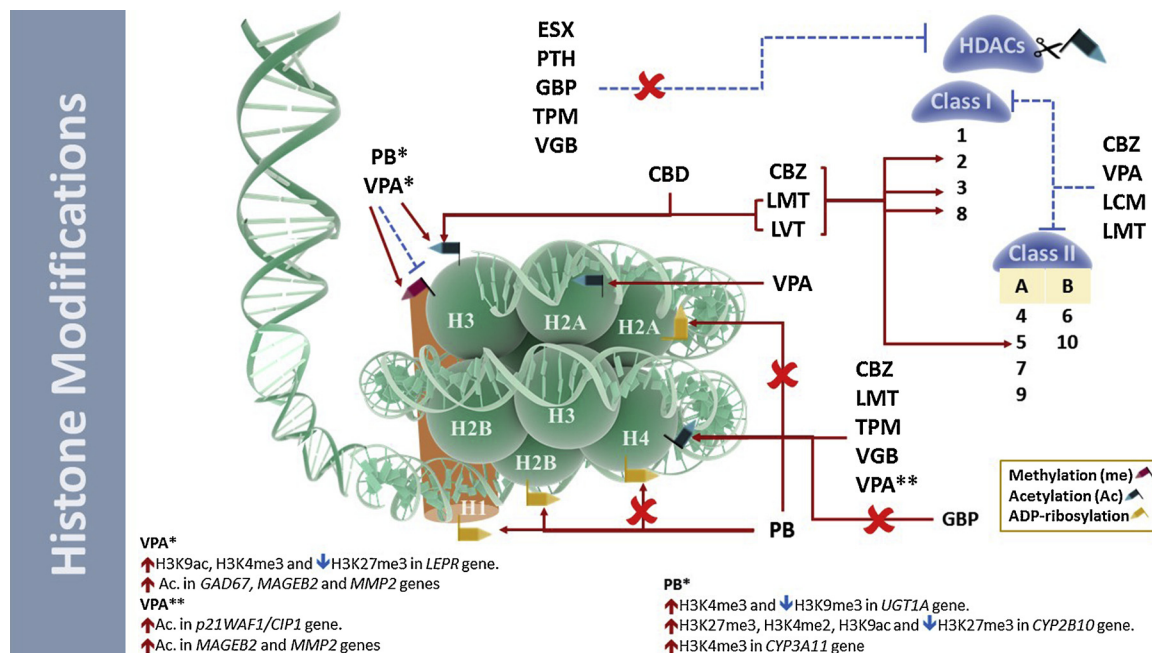


Fig. 3. Histone modifications mediated by AEDs. CBZ, LMT, TPM and vigabatrin (VGB) induce the acetylation (ac.) of H4, while VPA induces the acetylation of H2 A, H3 and H4. Acetylation of H3 is induced by LMT, levetiracetam (LVT) and CBD. PB can induce or inhibit the methylation (me) and acetylation of H3, and it can also affect the ADP-ribosylation of H1 and H2B, but not of H2 A and H4. Gabapentin (GBP) does not induce acetylation of H4. CBZ, LMT and LVT induce the expression of HDAC (Histone deacetylases) 2, 3 5 and 8. The expression of class I and II HDACs is reduced by CBZ, LMT, VPA and lacosamide (LCM). ESX, PHT, GBP, TPM and VGB do not inhibit (red X) HDACs. Some notations and abbreviations are the same as those used in Figs. 1–2 and Table 1.

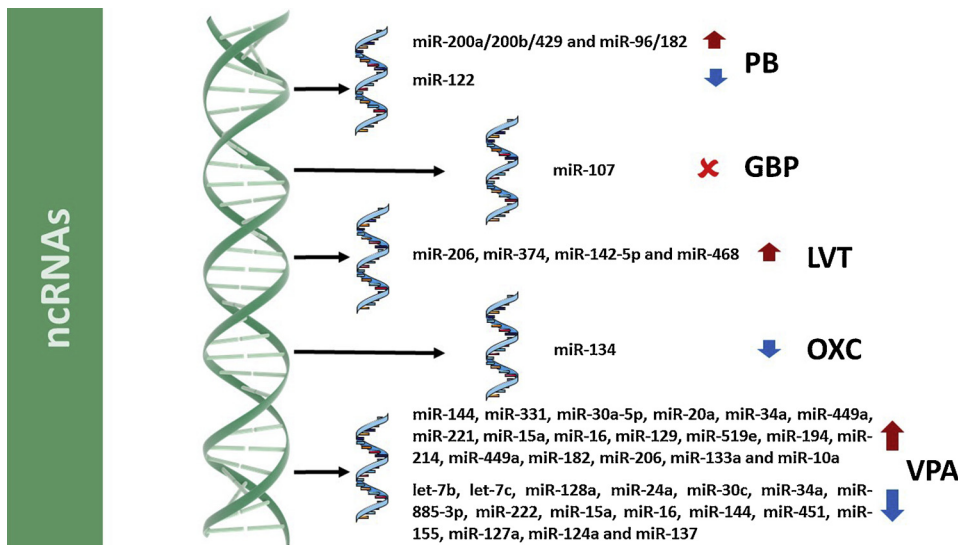


Fig. 4. Regulation of ncRNAs by AEDs. PB can induce and inhibit the expression of miRNAs related to hepatotoxicity. VPA reduces the expression of miRNAs related to neurogenesis, axonal orientation, neurite growth, neurodevelopment, ischemia, cancer, erythropoiesis, psychosis and BPD. LVT induces the expression of miRNAs associated with its pharmacological response. OXC inhibits miR134. GBP does not modify miR-107 expression. Some notations and abbreviations are the same as those used in Figs. 1–3.

HDAC3), and amygdala (HDAC3 and HDAC5) (Ookubo et al., 2013). Furthermore, it is known that CBZ induces the binding of HDAC1 to the *CYP3A4* promoter, which is an isoform of CYP3A that metabolizes various drugs (Wu et al., 2012) (Table 1, Fig. 3). At present, there is no evidence that CBZ regulates the synthesis or function of ncRNAs.

4.1.2. Lacosamide (LCM)

Its pharmacological mechanism involves the inactivation of voltage-gated Na^+ channels (Asconape, 2013; Errington et al., 2008; Sheets et al., 2008). Concerning its role in epigenetic processes, one study has demonstrated its ability to inhibit HDACs in the cerebral cortex of Wistar rats at a dosage of 30 mg/kg (Bang et al., 2015) (Table 1, Fig. 3). No evidence exists that LCM induces DNA methylation or changes in the synthesis or function of ncRNAs.

4.1.3. Lamotrigine (LMT)

The pharmacological activity of LMT involves the blockade of voltage-sensitive Na^+ channels, Ca^{2+} currents and the reduction of the release of excitatory amino acids (Stefani et al., 1996; Xie et al., 1995). It is used to control focal and generalized seizures, such as those associated with Lennox-Gastaut syndrome (Cotterman-Hart, 2015b; Rathaur et al., 2017). Some studies have suggested that LMT does not induce changes in DNA methylation patterns (Ni et al., 2015; Perisic et al., 2010). However, other studies have shown a decrease in genome-wide levels of methylation in the umbilical cord blood and placenta of infants prenatally exposed to LMT and other drugs (Smith et al., 2012). In the peripheral blood of people with epilepsy, LMT induced a reduction in the level of methylation of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) amplicon (Ni et al., 2015). LMT modifies DNA methylation levels in blood cells of people with BPD, supporting epigenetic effects of psychotropic drugs (Houtepen et al., 2016) (Table 1, Fig. 2).

In relation to histone modification, it is known that LMT increases H3 acetylation in the cingulate cortex and the nucleus accumbens of C67BL/6 mice (Ookubo et al., 2013). In cerebellar granule cells, LMT, in association with VPA, induced the hyperacetylation of H3 and H4, the inhibition of HDAC activity, and other effects associated with neuroprotective processes against glutamate-induced excitotoxicity (Leng et al., 2013). In C57BL/6 mice, LMT inhibited the synthesis of HDACs in the hippocampus (HDAC5 and HDAC7) and their activity in the striatum (HDAC2, HDAC3, and HDAC8), nucleus accumbens (HDAC2 and HDAC3), and amygdala (HDAC3 and HDAC5) (Ookubo et al., 2013) (Table 1, Fig. 3). At present, there is no evidence that LMT regulates the synthesis or function of ncRNAs.

4.1.4. Oxcarbazepine (OXC)

OXC acts via the blockade of voltage-gated Na^+ (and possibly Ca^{2+}) channels and is used to control focal seizures (Cotterman-Hart, 2015b; Huang et al., 2008; Wellington and Goa, 2001). Regarding its epigenetic effects, a previous study suggested that OXC induces the methylation of CpG sites in the Alu region of the *GABRB2* (subunit GABA_{b2}) gene in people with schizophrenia (Zong et al., 2017) (Table 1, Fig. 2). The results of another study revealed that treatment with OXC inhibited the expression of miR-134 in people with psychosis and BPD (Rong et al., 2011) (Table 1, Fig. 4). There is no current evidence that OXC induces histone modification.

4.1.5. Phenytoin (PHT)

PHT inhibits voltage-gated Na^+ channels and, at high concentrations, augments GABAergic neurotransmission by reducing K^+ efflux (De Weer, 1980; Wong and Teo, 1986). PHT is used to control focal and generalized seizures (Hanaya and Arita, 2016). With regard to DNA methylation, an overall decrease in the level of methylation was observed in neonates prenatally exposed to multiple AEDs, including PHT (Smith et al., 2012) (Table 1, Fig. 2). In addition, an experimental study indicated that PHT does not have inhibitory effects on HDACs in HeLa cells (Eyal et al., 2004) (Table 1, Fig. 3). There is no current evidence that suggests that PHT regulates the synthesis or function of ncRNAs.

4.2. AEDs that target Ca^{2+} channels

4.2.1. Ethosuximide (ESX)

ESX is used to control absence seizures, and its main pharmacological action is the reduction of low-threshold T-type Ca^{2+} currents (Cotterman-Hart, 2015a; Coulter et al., 1989; Kostyuk et al., 1992). Regarding its epigenetic effects, chronic treatment with ESX increases the expression of *Dnmt1* and *Dnmt3A* mRNAs in the somatosensory cortex of Strasbourg rats that are used as a genetic model of absence seizures (Dezsi et al., 2013) (Table 1, Fig. 2). ESX does not inhibit HDAC activity, even at concentrations that are five-fold higher than a typical therapeutic dose (Eyal et al., 2004) (Table 1, Fig. 3). Currently, there is no evidence that ESX regulates the synthesis or function of ncRNAs.

4.2.2. Gabapentin (GBP)

GBP is used to reduce focal seizures and neuropathic pain (Czapinski et al., 2005), and its pharmacological effects result from the inhibition of high-threshold Ca^{2+} channel currents and the enhancement of GABA levels (Bryans et al., 1998; Gee et al., 1996; Honmou et al., 1995). GBP is not able to inhibit HDACs or induce H4 acetylation

in HeLa cells (Eyal et al., 2004) (Table 1, Fig. 3). It does not regulate miR-107 in K562 or KCL-22 myeloid leukemia cells (Ruan et al., 2015) (Table 1, Fig. 4). At present, the participation of GBP in DNA methylation processes has not been evaluated.

4.3. AEDs that affect GABAergic neurotransmission

4.3.1. Phenobarbital (PB)

PB is effective in the treatment of multiple types of seizures, including focal, generalized and absence seizures (Czapinski et al., 2005; Macdonald and Barker, 1977), and it induces inhibitory effects as a consequence of the activation of GABA_A receptors.

PB also induces hepatotoxicity as a consequence of epigenetic changes. With regard to DNA methylation, chronic treatment with PB produces hypomethylation throughout the genome, mainly in cells susceptible to liver tumorigenesis (C3H/He and B6C3F1) (Watson and Goodman, 2002); such hypomethylation is also correlated with the transcriptional activation of the Ha-ras gene and other genes associated with angiogenesis, invasion, and metastasis. In B6C3F1 mice, PB induces the demethylation of two CpG islands in the *Cyp2b10* gene, which is involved in drug metabolism (Bachman et al., 2006; Lempiainen et al., 2011; Phillips and Goodman, 2008). PB increases the activity and expression of DNMTs and induces silencing of the p16 tumor-suppressor gene promoter via hypermethylation (Kostka et al., 2007). DNMT1 mRNA and protein levels have been shown to be augmented in the liver of Wistar rats who were administered PB (Urbanek-Olejnik et al., 2014) (Table 1, Fig. 2).

It has been shown that PB augments H3K4me3 (thalamus and the striatum) and reduces H3K9me3 (thalamus) in Sprague Dawley rats. These variations promote the transcriptional activation of genes that encode UGT1A, which is a drug-metabolizing enzyme (Sakakibara et al., 2016). PB mediates the epigenetic modification of genes encoding other drug-metabolizing enzymes, such as those of the *Cyp450* family. For example, in B6C3F1/Crl mice, chronic PB treatment leads to the conversion of the *Cyp2b10* gene promoter from a repressed state (increased H3K27me3) to an activated state (increased H3K4me2 and H3K9ac, and decreased H3K27me3) (Lempiainen et al., 2011). Also, neonatal exposure to PB was found to induce *Cyp450* gene expression in the liver of adult C57BL/6 mice, a condition that is associated with the presence of H3K4me3 in the *Cyp3A11* gene promoter (Tien et al., 2016). In Wistar rats, PB induced ADP-ribosylation in H1 and H2B histones but not in H2A, H3A, and H4 histones, a state that has been implicated in the regulation of hepatic metabolism (Braz and Lechner, 1986) (Table 1, Fig. 3).

With respect to the regulation of ncRNAs, chronic treatment with PB induces the synthesis of miR-200a/200b/429 and miR-96/182 in the liver of Fisher rats (Koufaris et al., 2013). In contrast, PB inhibited the synthesis of miR-122, which is related to the function and differentiation of hepatocytes in C3H/HeN mice and in HepG2 and HuH-7 human hepatoma cells. Indeed, inhibition of miR-122 was also found to lead to the activation of the constitutive androstane receptor (CAR) gene, which regulates the expression of genes such as *CYP2B* and *CYP3A* (Shizu et al., 2012) (Table 1, Fig. 4).

4.3.2. Vigabatrin (VGB)

VGB enhances GABA levels via the inhibition of GABA transaminase. It is used to control focal seizures and infantile spasms (Cotterman-Hart, 2015b; Jung et al., 1977). Regarding its epigenetic effects, one study in HeLa cells showed that VGB induces an insignificant increase in H4 acetylation and does not inhibit HDACs (Eyal et al., 2004) (Table 1, Fig. 3). At present, there is no evidence that VGB affects DNA methylation or synthesis and function of ncRNAs.

4.4. AEDs with multiple mechanisms of action

4.4.1. Cannabidiol (CBD)

CBD is currently considered a multitargeted drug since it interacts with various endocannabinoid and non-endocannabinoid systems. It is a non-competitive antagonist of CB1 receptors and an inverse agonist of CB2 receptors. CBD acts as an agonist towards TRPV1-4, TRPA1, 5-HT1A, PPAR- γ and the α 1 and α 3 glycine receptor subunits. It is also an antagonist of TRPM8, GPR55 and voltage-gated T-type Ca²⁺ channels. CBD also modulates the TNF α , VDAC1 and adenosine (A1 and A2) receptors (Ibeas Bih et al., 2015; Perucca, 2017). There is evidence to suggest that CBD is effective in the control of drug-resistant epilepsy (Friedman and Devinsky, 2016).

With regard to its epigenetic effects, CBD increases the methylation of the keratin 10 (*K10*) gene promoter, as well as overall methylation in HaCaT human keratinocytes, via a process mediated by CB1 receptors. It also inhibits the overexpression of the DNMT1 gene without modifying DNMT 3A, 3B, and 3L levels (Pucci et al., 2013) (Table 1, Fig. 2).

CBD induces H3K9 acetylation in the ventral tegmental area (VTA) in C57BL/6 mice, which has been associated with processes related to addiction (Todd et al., 2017) (Table 1, Fig. 3). At present, there is no evidence that CBD regulates the synthesis or function of ncRNAs.

4.4.2. Levetiracetam (LVT)

The antiepileptic effects of LVT result from its inhibition of N- and T-type Ca²⁺ channels and its binding to SV2A synaptic proteins (Lukyanetz et al., 2002; Lynch et al., 2004; Madeja et al., 2003; Rigo et al., 2002). It has been found to be effective in controlling focal and generalized seizures (Hovinga, 2001).

With regard to its epigenetic effects, studies have shown that LVT induces H3 acetylation in the cingulate cortex and the nucleus accumbens and stimulates the production of HDAC2, HDAC3, and HDAC8 in the striatum and HDAC3 and HDAC5 in the amygdala of C57BL/6 mice (Ookubo et al., 2013) (Table 1, Fig. 3).

There is some evidence to suggest that LVT regulates the expression of miRNAs, especially miR-206, miR-374, miR-142-5p, and miR-468, all of which have been found to regulate pharmacological responses in a murine model of pilocarpine-induced epilepsy (Moon et al., 2014) (Table 1, Fig. 4). At present, there is no evidence that LVT participates in DNA methylation.

4.4.3. Topiramate (TPM)

TPM has been demonstrated to block voltage-dependent Na⁺ channels, potentiate GABAergic neurotransmission, antagonize non-NMDA-type receptors and reduce the currents generated by high voltage-activated Ca²⁺ channels (Mula et al., 2006). It is used to control focal and generalized seizures (Cotterman-Hart, 2015b; Czapinski et al., 2005). Concerning its epigenetic effects, there is evidence that indicates that TPM prevents ethanol-induced overexpression of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B (Dnmt1-Associated Protein 1) in Wistar rats (Echeverry-Alzate et al., 2014) (Table 1, Fig. 2).

An *in vitro* study in HeLa cells revealed that TPM induces H4 hyperacetylation while having no effects on the competitive inhibition of HDACs (Table 1, Fig. 3) (Eyal et al., 2004). There is no evidence that TPM regulates the synthesis or function of ncRNAs.

4.4.4. Valproic acid (VPA)

The pharmacologic effects of VPA include blockade of voltage-gated Na⁺ and T-type Ca²⁺ channels and inhibition of GABA degradation via the blockade of GABA transaminase. VPA is used to control generalized and absence seizures (Hanaya and Arita, 2016; Kelly et al., 1990; Macdonald and Bergey, 1978).

With regard to DNA methylation, it has been found that VPA induces the hyper- and hypomethylation of 64 and 14 genes, respectively, in SK-N-SH cells (Asai et al., 2013). In another study, which was conducted in primary cultures derived from cerebellar granule cells, it was

demonstrated that VPA induced hypomethylation of the promoter of the neuronal *5-LOX* (5-lipoxygenase) gene, leading to its transcriptional activation and the consequent stimulation of cell proliferation (Manev and Uz, 2002). In mouse 3T3-L1 fibroblasts, VPA reduced the level of 5-hydroxymethylcytosine in mitochondrial DNA (mtDNA) and decreased the mRNA and protein levels of the mitochondrial demethylation enzyme TET1 (Chen et al., 2012). In people with Major Depressive Disorder, BPD and schizophrenia, VPA was shown to induce hypermethylation (silencing) of the *RELN* gene (approved name reelin), whose protein is involved in neuronal migration and regeneration (Chen et al., 2002; Houtepen et al., 2016). VPA has also been found to induce genome-wide hypomethylation in the peripheral blood cells of people with epilepsy (Tremolizzo et al., 2012) (Table 1, Fig. 2).

VPA has been found to increase H3 acetylation in NIH 3T3 fibroblasts, which leads to subsequent chromatin decondensation in both euchromatin and heterochromatin (Felisbino et al., 2014). The induction of transcriptional repression by H3 hyperacetylation (e.g., by H3K27me3 in the *KAT2B* and *HDAC9* genes) in human embryonic stem cells (hESCs) is mediated by similar changes in chromatin structure (Balmer et al., 2012). In contrast, a study conducted in the rat hippocampal cell line H19-7/IGF-IR demonstrated that VPA increases the levels of H3K9ac and H3K4me3 and reduces the level of H3K27me3 in the *Lepr* (leptin receptor) gene, which leads to alterations in neurogenesis and behavior (Lee et al., 2015). In primary cultures derived from astrocytes, VPA-mediated H3 acetylation increases the expression of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (*GDNF*), which promotes neuroprotective effects in dopaminergic neurons (Wu et al., 2008). VPA also increases H3 acetylation in the cingulate cortex and the nucleus accumbens of C57BL/6 mice (Ookubo et al., 2013). VPA-induced H3 acetylation in the hippocampus of B6129SF2/J mice was associated with behavioral changes (Yildirim et al., 2003). H3 acetylation mediated by VPA was also shown to have neuroprotective and anti-inflammatory effects in the cortex and striatum of Sprague-Dawley rats affected by cerebral ischemia (Kim et al., 2007; Ren et al., 2004). In the lymphocytes of people with schizophrenia and BPD, VPA induces genome-wide acetylation of H3 as well as the specific acetylation of *RELN* and glutamate decarboxylase 67 (*GAD67*) (Dong et al., 2007; Sharma et al., 2006). VPA-induced H3 acetylation has neuroprotective effects in rats suffering from intracerebral hemorrhage (Sinn et al., 2007). VPA treatment has been found to be associated with an increase in H3 acetylation in the peripheral blood of both people with epilepsy and healthy subjects (Tremolizzo et al., 2012) (Table 1, Fig. 3).

H4 acetylation is also associated with transcriptional activation. It has been shown that VPA increases H4 acetylation and the binding of the transcription factors Ets-1 and Ets-2 to the promoter of *FOXP3*, which has been found to be indispensable in the regulation of T-reg cells, in human T-cells derived from umbilical cord blood (Fayyad-Kazan et al., 2010). VPA increases genome-wide H4 acetylation (Eyal et al., 2004). Indeed, the antiproliferative effects of VPA in a number of cancer cell lines have been explained by its increase in H4 hyperacetylation in genes such as *p21WAF1/CIP1* (Travaglini et al., 2009) (Table 1, Fig. 3).

It is also known that VPA can induce simultaneous H3 and H4 acetylation in several carcinoma cell lines, including F9 (teratocarcinoma), HeLa (human cervical cancer) (Gottlicher et al., 2001), U937 (human monocytic lymphoma), K562 (human erythroleukemia) (Gurvich et al., 2004), and OVCAR-3 (human ovarian cancer) (Kwiecińska et al., 2014). In MCF-7 cells (human breast cancer), VPA induces the depletion of proteins that comprise the structural support for heterochromatin, including SMCs, DNMT1, and HP1 (Marchion et al., 2005). In H322, H513, and TE12 (thoracic carcinoma) cells, VPA induces cell cycle arrest and apoptosis (Ziauddin et al., 2006). Similarly, in medulloblastoma cells, VPA induces the expression of *p21* and suppresses *TP53*, *CDK4*, and *CMYC* expression, leading to growth arrest, apoptosis and senescence (Li et al., 2005). This suggests that VPA may be an effective therapeutic agent for use in cancer treatment.

However, the H3 and H4 hyperacetylation that is induced by VPA has been shown to also take place in non-neoplastic cells, such as the splenocytes of mice (Gottlicher et al., 2001). In neurons, this effect could modify cell excitability by altering the expression of certain genes, such as *BDNF* and *GABA_AR_{α4}* (Fukuchi et al., 2009). In HEK 293T embryonic kidney cells, VPA induces H3 and H4 acetylation, which leads to the activation of *MAGEB2* (melanoma antigen B2) and *MMP2* (metalloproteinase 2) (Milutinovic et al., 2007) and the inhibition of the *JARID1A* and *EZH2* demethylases; it also leads to the hypo- and hypermethylation of H3K27 and H3K4, respectively (Ganai et al., 2015). VPA also induces the acetylation of H3 and the H2A variant in the peripheral blood of people with epilepsy (Tremolizzo et al., 2012) (Table 1, Fig. 3).

Previous studies have indicated that VPA inhibits the activity of class I and II HDACs, with the exception of HDAC6 and HDAC10, in F9, HEK 293 T (Gottlicher et al., 2001; Gurvich et al., 2004), HeLa (Eyal et al., 2004), and NIH 3T3 cells (Felisbino et al., 2014) via the proteasomal degradation pathway (Kramer et al., 2003). Also, VPA has been demonstrated to inhibit the expression of HDAC1, HDAC2, HDAC5, and HDAC7 in various cancer cell lines (Kwiecińska et al., 2014; Papi et al., 2010). The inhibition of HDACs leads to alterations in the nuclear structure of prostate carcinoma LNCaP, C4-2, DU145, and PC3 cells (Kortenhorst et al., 2009). The teratogenic potential of VPA is mediated by its inhibition of HDACs and induction of H4 hyperacetylation (Eikel et al., 2006). These mechanisms appear to be important to the increase of the formation of GABAergic neurons (GABA neurogenesis) induced by VPA (Laeng et al., 2004). On the other hand, experimental evidence indicates that VPA blocks seizure-induced aberrant neurogenesis (Jessberger et al., 2007). In the hippocampus of C57BL/6 mice, VPA inhibits the production of HDAC5 and HDAC7, whereas in the cingulate cortex, it increases the production of HDAC3 and HDAC5 (Ookubo et al., 2013). In the pancreas, VPA induces a decrease in cell proliferation and differentiation via its inhibition of HDACs, which delays cellular recovery after pancreatitis (Eisses et al., 2015) (Table 1, Fig. 3).

VPA participates in the regulation, synthesis and function of ncRNAs (Detich et al., 2003; Dong et al., 2010; Phiel et al., 2001). VPA reduces the expression of let-7b, let-7c, miR-128a, miR-24a, miR-30c, miR-34a, and miR-221 while increasing the expression of miR-144 in the hippocampus of Wistar rats. These changes involve processes related to neurogenesis, axonal orientation, neurite growth, and neurodevelopment, as well as the PTEN, ERK, Wnt/β-catenin, and β-adrenergic signaling pathways. Additionally, it has been shown that the inhibition of miR-34a by VPA induced the expression of metabotropic glutamate receptor 7 (*GRM7*) (Zhou et al., 2009). In experimental models of ischemia, VPA treatment induces miR-331 overexpression while reducing miR-885-3p overexpression. The functional implications of these changes, however, are not yet well understood (Hunsberger et al., 2012). In SH-SY5Y neuroblastoma cells, combined treatment with lithium and VPA induces the expression of miR-30a-5p, which is a post-transcriptional inhibitor of *BDNF* (Croce et al., 2014). In LNCaP and PC3 cells, VPA treatment induces the expression of miR-20a, miR-34a, and miR-449a, all of which participate in the regulation of processes underlying epithelial-mesenchymal transition in cancer (Xia et al., 2016). With regard to erythropoiesis-related miRNAs, VPA induces miR-221 and inhibits miR-222, miR-15a, and miR-16 in Epo/TF1 cells. In K562 cells, VPA induces miR-221, miR-15a, and miR-16 and inhibits miR-222. VPA inhibited erythropoiesis via the inhibition of miR-144, miR-451, and *GATA-1* transcription factor, while it induced megakaryocyte differentiation via the inhibition of miR-155 and the induction of *GATA-2* and miR-127a (Trecul et al., 2014). In HEK 293 cells, the decrease in miR-92a-1 (and other miRNAs) upon VPA treatment is mediated by the proteasomal degradation of *DICER*, which is an enzyme that participates in the synthesis of miRNAs. Under the same experimental conditions, VPA was also found to increase the expression of miR-129, miR-519e, miR-194, miR-214, miR-449a, and miR-182,

which most likely occurred via a DICER-independent mechanism, such as the Argonaut-2-dependent synthesis of miRNAs (Zhang et al., 2013). During the neural to myogenic lineage shift, VPA induced the over-expression of muscle-related miRNAs, such as miR-206, miR-133a, and miR-10a, and inhibited specific neurological miRNAs, such as miR-124a, miR-128, and miR-137 (Smirnova et al., 2014). Finally, it has been observed that the inhibition of HDACs by VPA induces changes in the expression of miR-21 and miR-31 in umbilical cord blood T cells (Fayyad-Kazan et al., 2010) (Table 1, Fig. 4).

People with psychosis and BPD were found to have a low level of miR-134, a condition that could be reversed by a number of anti-psychotic drugs, including VPA (Rong et al., 2011). Also, in people with BPD, the administration with VPA facilitates the expression of miR-206, which is associated with *BDNF* gene polymorphisms that contribute to the treatment response and the susceptibility to this particular pathology (Wang et al., 2014) (Table 1, Fig. 4).

5. Concluding remarks

This review provides specific evidence that supports the hypothesis that a number of AEDs induce epigenetic changes. It is important to consider that epigenetic research related to the use of AEDs has been insufficient to reach any definite conclusions. Further research is necessary to fully investigate all of the epigenetic modifications that are induced by each AED. In the future, the epigenetic modifications induced by AEDs, whether they be beneficial or harmful, and their clinical consequences must be considered during clinical use in epileptic people. In addition, epigenetic modifications associated with epilepsy represent potential clues in the search for novel AEDs that are more effective and selective and have fewer side effects (Wei et al., 2015).

Acknowledgments

VNM is a Ph.D. student from the program of Biomedical Sciences at the National Autonomous University of México (UNAM). This study was supported by the National Council of Science and Technology (CONACyT) (scholarship 243431, grant 220365), and Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (Project R-2017-785-100).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.11.006>.

References

- Abidi, F.E., Holloway, L., Moore, C.A., Weaver, D.D., Simensen, R.J., Stevenson, R.E., Rogers, R.C., Schwartz, C.E., 2008. Mutations in *JARID1C* are associated with X-linked mental retardation, short stature and hyperreflexia. *J. Med. Genet.* 45, 787–793.
- Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., Zoghbi, H.Y., 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* 23, 185–188.
- Annunziato, A., 2008. DNA packaging: nucleosomes and chromatin. *Nat. Educ.* 1, 26.
- Antequera, F., 2003. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1647–1658.
- Asai, T., Bundo, M., Sugawara, H., Sunaga, F., Ueda, J., Tanaka, G., Ishigooka, J., Kasai, K., Kato, T., Iwamoto, K., 2013. Effect of mood stabilizers on DNA methylation in human neuroblastoma cells. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 2285–2294.
- Asconape, J.J., 2013. Epilepsy: new drug targets and neurostimulation. *Neurol. Clin.* 31, 785–798.
- Bachman, A.N., Phillips, J.M., Goodman, J.I., 2006. Phenobarbital induces progressive patterns of GC-rich and gene-specific altered DNA methylation in the liver of tumor-prone B6C3F1 mice. *Toxicol. Sci.* 91, 393–405.
- Balmer, N.V., Weng, M.K., Zimmer, B., Ivanova, V.N., Chambers, S.M., Nikolaeva, E., Jagtap, S., Sachinidis, A., Hescheler, J., Waldmann, T., Leist, M., 2012. Epigenetic changes and disturbed neural development in a human embryonic stem cell-based model relating to the fetal valproate syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4104–4114.
- Bang, S.R., Ambavade, S.D., Jagdale, P.G., Adkar, P.P., Waghmare, A.B., Ambavade, P.D., 2015. Lacosamide reduces HDAC levels in the brain and improves memory: potential for treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 134, 65–69.
- Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.
- Barker-Haliski, M., White, H.S., 2015. Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, a022863.
- Bassuk, A.G., Wallace, R.H., Buhr, A., Buller, A.R., Afawi, Z., Shimojo, M., Miyata, S., Chen, S., Gonzalez-Alegre, P., Griesbach, H.L., Wu, S., Nashelsky, M., Vldar, E.K., Antic, D., Ferguson, P.J., Cirak, S., Voit, T., Scott, M.P., Axelrod, J.D., Gurnett, C., Daoud, A.S., Kivity, S., Neufeld, M.Y., Mazarib, A., Straussberg, R., Walid, S., Korczyn, A.D., Slusarski, D.C., Berkovic, S.F., El-Shanti, H.I., 2008. A homozygous mutation in human *PRICKLE1* causes an autosomal-recessive progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 572–581.
- Baujrat, G., Cormier-Daire, V., 2007. Sotos syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* 2, 36.
- Belhedi, N., Perroud, N., Karege, F., Vessaz, M., Malafosse, A., Salzmann, A., 2014. Increased *CPA6* promoter methylation in focal epilepsy and in febrile seizures. *Epilepsy Res.* 108, 144–148.
- Bernstein, B.E., Meissner, A., Lander, E.S., 2007. The mammalian epigenome. *Cell* 128, 669–681.
- Beutler, A.S., Li, S., Nicol, R., Walsh, M.J., 2005. Carbamazepine is an inhibitor of histone deacetylases. *Life Sci.* 76, 3107–3115.
- Bhutani, N., Burns, D.M., Blau, H.M., 2011. DNA demethylation dynamics. *Cell* 146, 866–872.
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.
- Bohmdorfer, G., Wierzbicki, A.T., 2015. Control of chromatin structure by long non-coding RNA. *Trends Cell Biol.* 25, 623–632.
- Braz, J., Lechner, M.C., 1986. ADP-ribosylation of nuclear proteins is increased by phenobarbital. Identification of the ADP-ribosylated histone fractions in rat liver nuclei. *FEBS Lett.* 199, 164–168.
- Briggs, J.A., Wolvetang, E.J., Mattick, J.S., Rinn, J.L., Barry, G., 2015. Mechanisms of long non-coding RNAs in mammalian nervous system development, plasticity, disease, and evolution. *Neuron* 88, 861–877.
- Brodie, M.J., Besag, F., Ettinger, A.B., Mula, M., Gobbi, G., Comai, S., Aldenkamp, A.P., Steinhoff, B.J., 2016. Epilepsy, antiepileptic drugs, and aggression: an evidence-based review. *Pharmacol. Rev.* 68, 563–602.
- Bryans, J.S., Davies, N., Gee, N.S., Dissanayake, V.U., Ratcliffe, G.S., Horwell, D.C., Kneen, C.O., Morrell, A.I., Oles, R.J., O'Toole, J.C., Perkins, G.M., Singh, L., Suman-Chauhan, N., O'Neill, J.A., 1998. Identification of novel ligands for the gabapentin binding site on the $\alpha 2\delta$ subunit of a calcium channel and their evaluation as anticonvulsant agents. *J. Med. Chem.* 41, 1838–1845.
- Castanotto, D., Tommasi, S., Li, M., Li, H., Yanow, S., Pfeifer, G.P., Rossi, J.J., 2005. Short hairpin RNA-directed cytosine (CpG) methylation of the *RASSF1A* gene promoter in HeLa cells. *Mol. Ther.* 12, 179–183.
- Cavanna, A.E., Ali, F., Rickards, H.E., McCorry, D., 2010. Behavioral and cognitive effects of anti-epileptic drugs. *Discov. Med.* 9, 138–144.
- Clapier, C.R., Cairns, B.R., 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 273–304.
- Cotterman-Hart, S., 2015a. Antiepileptic drugs: first generation. In: Newton, H.B., Maschio, M. (Eds.), *Epilepsy and Brain Tumors*. Elsevier Inc., USA, pp. 275.
- Cotterman-Hart, S., 2015b. Antiepileptic drugs: second and third generation. In: Newton, H.B., Maschio, M. (Eds.), *Epilepsy and Brain Tumors*. Elsevier Inc., USA, pp. 275.
- Coulter, D.A., Huguenard, J.R., Prince, D.A., 1989. Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Ann. Neurol.* 25, 582–593.
- Croce, N., Bernardini, S., Caltagirone, C., Angelucci, F., 2014. Lithium/Valproic acid combination and L-glutamate induce similar pattern of changes in the expression of miR-30a-5p in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuromolecular Med.* 16, 872–877.
- Czapinski, P., Blaszczyk, B., Czuczwar, S.J., 2005. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* 5, 3–14.
- Chen, H., Dzitoyeva, S., Manev, H., 2012. Effect of valproic acid on mitochondrial epigenetics. *Eur. J. Pharmacol.* 690, 51–59.
- Chen, Y., Sharma, R.P., Costa, R.H., Costa, E., Grayson, D.R., 2002. On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res.* 30, 2930–2939.
- De La Fuente, R., Baumann, C., Viveiros, M.M., 2011. Role of *ATRX* in chromatin structure and function: implications for chromosome instability and human disease. *Reproduction* 142, 221–234.
- De Weer, P., 1980. Phenytoin: blockage of resting sodium channels. *Adv. Neurol.* 27, 353–361.
- Debski, K.J., Pitkanen, A., Puhakka, N., Bot, A.M., Khurana, I., Harikrishnan, K.N., Ziemann, M., Kaspi, A., El-Osta, A., Lukasiuk, K., Kobow, K., 2016. Etiology matters - genomic DNA methylation patterns in three rat models of acquired epilepsy. *Sci. Rep.* 6, 25668.
- Detich, N., Bovenzi, V., Szyf, M., 2003. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J. Biol. Chem.* 278, 27586–27592.
- Devaskar, S.U., Raychaudhuri, S., 2007. Epigenetics—a science of heritable biological adaptation. *Pediatr. Res.* 61, 1R–4R.
- Dezsi, G., Ozturk, E., Stancic, D., Powell, K.L., Blumenfeld, H., O'Brien, T.J., Jones, N.C., 2013. Ethosuximide reduces epileptogenesis and behavioral comorbidity in the GAERS model of genetic generalized epilepsy. *Epilepsia* 54, 635–643.
- Dong, E., Chen, Y., Gavin, D.P., Grayson, D.R., Guidotti, A., 2010. Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain. *Epigenetics* 5, 730–735.
- Dong, E., Guidotti, A., Grayson, D.R., Costa, E., 2007. Histone hyperacetylation induces demethylation of reelin and 67-kDa glutamic acid decarboxylase promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4676–4681.
- Echeverry-Alzate, V., Gine, E., Buhler, K.M., Calleja-Conde, J., Olmos, P., Gorriti, M.A., Nadal, R., Rodriguez de Fonseca, F., Lopez-Moreno, J.A., 2014. Effects of topiramate on ethanol-cocaine interactions and DNA methyltransferase gene expression in the

- rat prefrontal cortex. *Br. J. Pharmacol.* 171, 3023–3036.
- EGGER, G., LIANG, G., APARICIO, A., JONES, P.A., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457–463.
- EIKEL, D., LAMPEN, A., NAU, H., 2006. Teratogenic effects mediated by inhibition of histone deacetylases: evidence from quantitative structure activity relationships of 20 valproic acid derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 272–278.
- EISSES, J.F., CRISCIMANNA, A., DIONISE, Z.R., ORABI, A.I., JAVED, T.A., SARWAR, S., JIN, S., ZHOU, L., SINGH, S., PODDAR, M., DAVIS, A.W., TOSUN, A.B., OZOLEK, J.A., LOWE, M.E., MONGA, S.P., ROHDE, G.K., ESNI, F., HUSAIN, S.Z., 2015. Valproic acid limits pancreatic recovery after pancreatitis by inhibiting histone deacetylases and preventing acinar redifferentiation programs. *Am. J. Pathol.* 185, 3304–3315.
- ERRINGTON, A.C., STOHR, T., HEERS, C., LEES, G., 2008. The investigational anticonvulsant lacosamide selectively enhances slow inactivation of voltage-gated sodium channels. *Mol. Pharmacol.* 73, 157–169.
- EYAL, S., YAGEN, B., SOBOL, E., ALTSCHULER, Y., SHMUEL, M., BIALER, M., 2004. The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45, 737–744.
- FAYYAD-KAZAN, H., ROUAS, R., MERIMI, M., EL ZEIN, N., LEWALLE, P., MORITADE, M., BADRAN, H., EZZEDDINE, M., SALAUN, B., ROMERO, P., BURNI, A., MARTIAT, P., BADRAN, B., 2010. Valproate treatment of human cord blood CD4-positive effector T cells confers on them the molecular profile (microRNA signature and FOXP3 expression) of natural regulatory CD4-positive cells through inhibition of histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* 285, 20481–20491.
- FAZZARI, M.J., GREALLY, J.M., 2004. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat. Rev. Genet.* 5, 446–455.
- FELISBINO, M.B., GATTI, M.S., MELLO, M.L., 2014. Changes in chromatin structure in NIH 3T3 cells induced by valproic acid and trichostatin A. *J. Cell. Biochem.* 115, 1937–1947.
- FISCHLE, W., WANG, Y., ALLIS, C.D., 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 172–183.
- FRIEDMAN, D., DEVINSKY, O., 2016. Cannabinoids in the treatment of epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 374, 94–95.
- FRUCHTER, E., KAPARA, O., REICHENBERG, A., YOFFE, R., FONO-YATV, O., KREISS, Y., DAVIDSON, M., WEISER, M., 2014. Longitudinal association between epilepsy and schizophrenia: a population-based study. *Epilepsy Behav.* 31, 291–294.
- FUKAGAWA, T., NOGAMI, M., YOSHIKAWA, M., IKENO, M., OKAZAKI, T., TAKAMI, Y., NAKAYAMA, T., OSHIMURA, M., 2004. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat. Cell Biol.* 6, 784–791.
- FUKUCHI, M., NII, T., ISHIMARU, N., MINAMINO, A., HARA, D., TAKASAKI, I., TABUCHI, A., TSUDA, M., 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, 35–43.
- GAITATZIS, A., TRIMBLE, M.R., SANDER, J.W., 2004. The psychiatric comorbidity of epilepsy. *Acta Neurol. Scand.* 110, 207–220.
- GANAI, S.A., KALLADI, S.M., MAHADEVAN, V., 2015. HDAC inhibition through valproic acid modulates the methylation profiles in human embryonic kidney cells. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33, 1185–1197.
- GEE, N.S., BROWN, J.P., DISSANAYAKE, V.U., OFFORD, J., THURLOW, R., WOODRUFF, G.N., 1996. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the α 2 δ subunit of a calcium channel. *J. Biol. Chem.* 271, 5768–5776.
- GODFREY, K.M., LILLYCROP, K.A., BURDGE, G.C., GLUCKMAN, P.D., HANSON, M.A., 2007. Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease. *Pediatr. Res.* 61, 5R–10R.
- GOLDBERG, A.D., ALLIS, C.D., BERNSTEIN, E., 2007. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635–638.
- GOTTLICHER, M., MINUCCI, S., ZHU, P., KRAMER, O.H., SCHIMPF, A., GIAVARA, S., SLEEMAN, J.P., LO COCO, F., NERVI, C., PELICCI, P.G., HEINZEL, T., 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 20, 6969–6978.
- GREWAL, S.I., MOAZED, D., 2003. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798–802.
- GUAN, J.S., HAGGARTY, S.J., GIACOMETTI, E., DANNENBERG, J.H., JOSEPH, N., GAO, J., NIELAND, T.J., ZHOU, Y., WANG, X., MAZITSCHKE, R., BRADNER, J.E., DEPINHO, R.A., JAENISCH, R., TSAI, L.H., 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459, 55–60.
- GUERRINI, R., SHANAHAN, J.L., CARROZZO, R., BONANNI, P., HIGGS, D.R., GIBBONS, R.J., 2000. A nonsense mutation of the ATRX gene causing mild mental retardation and epilepsy. *Ann. Neurol.* 47, 117–121.
- GURVICH, N., TSYGANKOVA, O.M., MEINKOTH, J.L., KLEIN, P.S., 2004. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res.* 64, 1079–1086.
- HAMED, S.A., 2016. The effect of epilepsy and antiepileptic drugs on sexual, reproductive and gonadal health of adults with epilepsy. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 9, 807–819.
- HANAYA, R., ARITA, K., 2016. The new antiepileptic drugs: their neuropharmacology and clinical indications. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 56, 205–220.
- HANSEN, J.C., 2012. Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre? *EMBO J.* 31, 1621–1623.
- HENSHALL, D.C., KOBOW, K., 2015. Epigenetics and epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5.
- HOLMES, R., SOLOWAY, P.D., 2006. Regulation of imprinted DNA methylation. *Cytogenet. Genome Res.* 113, 122–129.
- HONMOUT, O., OYELESE, A.A., KOCIS, J.D., 1995. The anticonvulsant gabapentin enhances promoted release of GABA in hippocampus: a field potential analysis. *Brain Res.* 692, 273–277.
- HOUTEPEN, L.C., VAN BERGEN, A.H., VINKERS, C.H., BOKS, M.P., 2016. DNA methylation signatures of mood stabilizers and antipsychotics in bipolar disorder. *Epigenomics* 8, 197–208.
- HOVINGA, C.A., 2001. Levetiracetam: a novel antiepileptic drug. *Pharmacotherapy* 21, 1375–1388.
- Hsiao, J., Yuan, T.Y., Tsai, M.S., Lu, C.Y., Lin, Y.C., Lee, M.L., Lin, S.W., Chang, F.C., Liu Pimentel, H., Olive, C., Coito, C., Shen, G., Young, M., Thorne, T., Lawrence, M., Magistri, M., Faghihi, M.A., Khorkova, O., Wahlestedt, C., 2016. Upregulation of haploinsufficient gene expression in the brain by targeting a long non-coding RNA improves seizure phenotype in a model of dravet syndrome. *EBioMedicine* 9, 257–277.
- Huang, C.W., Huang, C.C., Lin, M.W., Tsai, J.J., Wu, S.N., 2008. The synergistic inhibitory actions of oxcarbazepine on voltage-gated sodium and potassium currents in differentiated NG108-15 neuronal cells and model neurons. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11, 597–610.
- Huang, M.C., Okada, M., Nakatsu, F., Oguni, H., Ito, M., Morita, K., Nagafuji, H., Hirose, S., Sakaki, Y., Kaneko, S., Ohno, H., Kojima, T., 2007. Mutation screening of AP3M2 in Japanese epilepsy patients. *Brain Dev.* 29, 462–467.
- Huang, Y., Zhao, F., Wang, L., Yin, H., Zhou, C., Wang, X., 2012. Increased expression of histone deacetylases 2 in temporal lobe epilepsy: a study of epileptic patients and rat models. *Synapse* 66, 151–159.
- Hunsberger, J.G., Fessler, E.B., Wang, Z., Elkahoul, A.G., Chuang, D.M., 2012. Post-insult valproic acid-regulated microRNAs: potential targets for cerebral ischemia. *Am. J. Transl. Res.* 4, 316–332.
- Ibeas Bih, C., Chen, T., Nunn, A.V., Bazelot, M., Dallas, M., Whalley, B.J., 2015. Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders. *Neurotherapeutics* 12, 699–730.
- Issa, J.P., 2000. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 249, 101–118.
- Jaenisch, R., Bird, A., 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33, 245–254.
- Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jessberger, S., Nakashima, K., Clemenson Jr, G.D., Mejia, E., Mathews, E., Ure, K., Ogawa, S., Sinton, C.M., Gage, F.H., Hsieh, J., 2007. Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline. *J. Neurosci.* 27, 5967–5975.
- Jian, L., Nagarajan, L., de Klerk, N., Ravine, D., Bower, C., Anderson, A., Williamson, S., Christodoulou, J., Leonard, H., 2006. Predictors of seizure onset in Rett syndrome. *J. Pediatr.* 149, 542–547.
- Jung, M.J., Lippert, B., Metcalf, B.W., Bohlen, P., Schechter, P.J., 1977. Gamma-Vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new selective irreversible inhibitor of GABA-T: effects on brain GABA metabolism in mice. *J. Neurochem.* 29, 797–802.
- Kelly, K.M., Gross, R.A., Macdonald, R.L., 1990. Valproic acid selectively reduces the low-threshold (T) calcium current in rat nodose neurons. *Neurosci. Lett.* 116, 233–238.
- Khalil, A.M., Faghihi, M.A., Modarresi, F., Brothers, S.P., Wahlestedt, C., 2008. A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in fragile X syndrome. *PLoS One* 3, e1486.
- Kim, H.J., Rowe, M., Ren, M., Hong, J.S., Chen, P.S., Chuang, D.M., 2007. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 892–901.
- Kinde, B., Wu, D.Y., Greenberg, M.E., Gabel, H.W., 2016. DNA methylation in the gene body influences MeCP2-mediated gene repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 15114–15119.
- Kobow, K., Blumcke, I., 2012. The emerging role of DNA methylation in epileptogenesis. *Epilepsia* 53 (Suppl 9), 11–20.
- Kobow, K., Jeske, I., Hildebrandt, M., Hauke, J., Hahnen, E., Buslei, R., Buchfelder, M., Weigel, D., Stefan, H., Kasper, B., Pauli, E., Blumcke, I., 2009. Increased reelin promoter methylation is associated with granule cell dispersion in human temporal lobe epilepsy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 356–364.
- Kortenhorst, M.S., Isharwal, S., van Diest, P.J., Chowdhury, W.H., Marlow, C., Carducci, M.A., Rodriguez, R., Veltri, R.W., 2009. Valproic acid causes dose- and time-dependent changes in nuclear structure in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 8, 802–808.
- Kostka, G., Urbanek, K., Ludwicki, J.K., 2007. The effect of phenobarbital on the methylation level of the p16 promoter region in rat liver. *Toxicology* 239, 127–135.
- Kostyuk, P.G., Molokanova, E.A., Pronchuk, N.F., Savchenko, A.N., Verkhatsky, A.N., 1992. Different action of ethosuximide on low- and high-threshold calcium currents in rat sensory neurons. *Neuroscience* 51, 755–758.
- Koufaris, C., Wright, J., Osborne, M., Currie, R.A., Gooderham, N.J., 2013. Time and dose-dependent effects of phenobarbital on the rat liver miRNAome. *Toxicology* 314, 247–253.
- Kramer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M.A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T., Gottlicher, M., 2003. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J.* 22, 3411–3420.
- Kung, J.T., Colognori, D., Lee, J.T., 2013. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* 193, 651–669.
- Kwiecinska, P., Wróbel, A., Tauböll, E., Gregoraszczyk, E.L., 2014. Valproic acid, but not levetiracetam, selectively decreases HDAC7 and HDAC2 expression in human ovarian cancer cells. *Toxicol. Lett.* 224, 225–232.
- Ladd, P.D., Smith, L.E., Rabaia, N.A., Moore, J.M., Georges, S.A., Hansen, R.S., Hagerman, R.J., Tassone, F., Tapscott, S.J., Filippova, G.N., 2007. An antisense transcript spanning the CGG repeat region of FMR1 is upregulated in premutation carriers but silenced in full mutation individuals. *Hum. Mol. Genet.* 16, 3174–3187.
- Laeng, P., Pitts, R.L., Lemire, A.L., Drabik, C.E., Weiner, A., Tang, H., Thyagarajan, R., Mallon, B.S., Altar, C.A., 2004. The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells. *J. Neurochem.* 91, 238–251.
- Lam, J.K., Chow, M.Y., Zhang, Y., Leung, S.W., 2015. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 4, e252.
- Lee, R.S., Pirooznia, M., Guintivano, J., Ly, M., Ewald, E.R., Tamashiro, K.L., Gould, T.D., Moran, T.H., Potash, J.B., 2015. Search for common targets of lithium and valproic acid identifies novel epigenetic effects of lithium on the rat leptin receptor gene.

- Transl. Psychiatry 5, e600.
- Lempiäinen, H., Müller, A., Brasa, S., Teo, S.S., Roloff, T.C., Morawiec, L., Zamurovic, N., Vicart, A., Funhoff, E., Couttet, P., Schubeler, D., Grenet, O., Marlowe, J., Moggs, J., Terranova, R., 2011. Phenobarbital mediates an epigenetic switch at the constitutive androstane receptor (CAR) target gene *Cyp2b10* in the liver of B6C3F1 mice. *PLoS One* 6, e18216.
- Leng, Y., Fessler, E.B., Chuang, D.M., 2013. Neuroprotective effects of the mood stabilizer lamotrigine against glutamate excitotoxicity: roles of chromatin remodeling and Bcl-2 induction. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 607–620.
- Li, B., Carey, M., Workman, J.L., 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707–719.
- Li, M., Hada, A., Sen, P., Olufemi, L., Hall, M.A., Smith, B.Y., Forth, S., McKnight, J.N., Patel, A., Bowman, G.D., Bartholomew, B., Wang, M.D., 2015. Dynamic regulation of transcription factors by nucleosome remodeling. *Elife* 4.
- Li, X.N., Shu, Q., Su, J.M., Perlaky, L., Blaney, S.M., Lau, C.C., 2005. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol. Cancer Ther.* 4, 1912–1922.
- Liu, C., Yu, X., 2015. ADP-ribosyltransferases and poly ADP-ribosylation. *Curr. Protein Pept. Sci.* 16, 491–501.
- Loring, D.W., Meador, K.J., 2001. Cognitive and behavioral effects of epilepsy treatment. *Epilepsia* 42 (Suppl 8), 24–32.
- Lukyanetz, E.A., Shkryl, V.M., Kostyuk, P.G., 2002. Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam. *Epilepsia* 43, 9–18.
- Lynch, B.A., Lambeng, N., Nocka, K., Kensch-Hammes, P., Bajjalieh, S.M., Matagne, A., Fuks, B., 2004. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the anti-epileptic drug levetiracetam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9861–9866.
- Macdonald, R.L., Barker, J.L., 1977. Phenobarbital enhances GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian neurons. *Trans. Am. Neurol. Assoc.* 102, 139–140.
- Macdonald, R.L., Bergery, G.K., 1978. Valproic acid: effect on GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons. *Trans. Am. Neurol. Assoc.* 103, 254–256.
- Madeja, M., Margineanu, D.G., Gorji, A., Slep, E., Boerrigter, P., Klitgaard, H., Speckmann, E.J., 2003. Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? *Neuropharmacology* 45, 661–671.
- Manev, H., Uz, T., 2002. DNA hypomethylating agents 5-aza-2'-deoxycytidine and valproate increase neuronal 5-lipoxygenase mRNA. *Eur. J. Pharmacol.* 445, 149–150.
- Marchion, D.C., Bicaku, E., Daud, A.I., Sullivan, D.M., Munster, P.N., 2005. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res.* 65, 3815–3822.
- Marino-Ramirez, L., Kann, M.G., Shoemaker, B.A., Landsman, D., 2005. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev. Proteomics* 2, 719–729.
- Messner, S., Hottiger, M.O., 2011. Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends Cell Biol.* 21, 534–542.
- Milutinovic, S., D'Alessio, A.C., Detich, N., Szyf, M., 2007. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 28, 560–571.
- Moon, J., Lee, S.T., Choi, J., Jung, K.H., Yang, H., Khalid, A., Kim, J.M., Park, K.I., Shin, J.W., Ban, J.J., Yi, G.S., Lee, S.K., Jeon, D., Chu, K., 2014. Unique behavioral characteristics and microRNA signatures in a drug resistant epilepsy model. *PLoS One* 9, e85617.
- Morris, K.V., Chan, S.W., Jacobsen, S.E., Looney, D.J., 2004. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305, 1289–1292.
- Mula, M., 2017. Epilepsy and psychiatric comorbidities: drug selection. *Curr. Treat. Options Neurol.* 19, 44.
- Mula, M., Cavanna, A.E., Monaco, F., 2006. Psychopharmacology of topiramate: from epilepsy to bipolar disorder. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2, 475–488.
- Mula, M., Trimble, M.R., Sander, J.W., 2007. Are psychiatric adverse events of anti-epileptic drugs a unique entity? A study on topiramate and levetiracetam. *Epilepsia* 48, 2322–2326.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., Bird, A., 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386–389.
- Ngugi, A.K., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J.W., Newton, C.R., 2010. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia* 51, 883–890.
- Ni, G., Qin, J., Li, H., Chen, Z., Zhou, Y., Fang, Z., Chen, Y., Zhou, J., Huang, M., Zhou, L., 2015. Effects of antiepileptic drug monotherapy on one-carbon metabolism and DNA methylation in patients with epilepsy. *PLoS One* 10, e0125656.
- Nightingale, K.P., O'Neill, L.P., Turner, B.M., 2006. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 125–136.
- Ookubo, M., Kanai, H., Aoki, H., Yamada, N., 2013. Antidepressants and mood stabilizers effects on histone deacetylase expression in C57BL/6 mice: brain region specific changes. *J. Psychiatr. Res.* 47, 1204–1214.
- Papi, A., Ferreri, A.M., Rocchi, P., Guerra, F., Orlandi, M., 2010. Epigenetic modifiers as anticancer drugs: effectiveness of valproic acid in neural crest-derived tumor cells. *Anticancer Res.* 30, 535–540.
- Park, H.G., Yu, H.S., Park, S., Ahn, Y.M., Kim, Y.S., Kim, S.H., 2014. Repeated treatment with electroconvulsive seizures induces HDAC2 expression and down-regulation of NMDA receptor-related genes through histone deacetylation in the rat frontal cortex. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 1487–1500.
- Perisic, T., Zimmermann, N., Kirmeier, T., Asmus, M., Tuorto, F., Uhr, M., Holsboer, F., Rein, T., Zschocke, J., 2010. Valproate and amitriptyline exert common and divergent influences on global and gene promoter-specific chromatin modifications in rat primary astrocytes. *Neuropsychopharmacology* 35, 792–805.
- Perucca, E., 2017. Cannabinoids in the treatment of epilepsy: hard evidence at last? *J. Epilepsy Res.* 7, 61–76.
- Phiel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Klein, P.S., 2001. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem.* 276, 36734–36741.
- Phillips, J.M., Goodman, J.I., 2008. Identification of genes that may play critical roles in phenobarbital (PB)-induced liver tumorigenesis due to altered DNA methylation. *Toxicol. Sci.* 104, 86–99.
- Pucci, M., Rapino, C., Di Francesco, A., Dainese, E., D'Addario, C., Maccarrone, M., 2013. Epigenetic control of skin differentiation genes by phytocannabinoids. *Br. J. Pharmacol.* 170, 581–591.
- Quan, Z., Zheng, D., Qing, H., 2017. Regulatory roles of long non-coding RNAs in the central nervous system and associated neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 175.
- Qureshi, I.A., Mehler, M.F., 2010. Epigenetic mechanisms underlying human epileptic disorders and the process of epileptogenesis. *Neurobiol. Dis.* 39, 53–60.
- Rathaur, B.P., Garg, R.K., Malhotra, H.S., Kumar, N., Sharma, P.K., Verma, R., Uniyal, R., 2017. Lennox-gastaut syndrome: a prospective follow-up study. *J. Neurosci. Rural Pract.* 8, 225–227.
- Ren, M., Leng, Y., Jeong, M., Leeds, P.R., Chuang, D.M., 2004. Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J. Neurochem.* 89, 1358–1367.
- Rigo, J.M., Hans, G., Nguyen, L., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Leprince, P., Moonen, G., Selak, I., Matagne, A., Klitgaard, H., 2002. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents. *Br. J. Pharmacol.* 136, 659–672.
- Rong, H., Liu, T.B., Yang, K.J., Yang, H.C., Wu, D.H., Liao, C.P., Hong, F., Yang, H.Z., Wan, F., Ye, X.Y., Xu, D., Zhang, X., Chao, C.A., Shen, Q.J., 2011. MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment for bipolar mania. *J. Psychiatr. Res.* 45, 92–95.
- Ruan, J., Liu, X., Xiong, X., Zhang, C., Li, J., Zheng, H., Huang, C., Shi, Q., Weng, Y., 2015. miR107 promotes the erythroid differentiation of leukemia cells via the down-regulation of *Cacna2d1*. *Mol. Med. Rep.* 11, 1334–1339.
- Saetrom, P., Snove Jr, O., Rossi, J.J., 2007. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr. Res.* 61, 17R–23R.
- Sakakibara, Y., Katoh, M., Kondo, Y., Nadai, M., 2016. Effects of phenobarbital on expression of UDP-Glucuronosyltransferase 1a6 and 1a7 in rat brain. *Drug Metab. Dispos.* 44, 370–377.
- Scheffer, I.E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M.B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G.W., Moshe, S.L., Nordli, D.R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y.H., Zuberi, S.M., 2017. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE commission for classification and terminology. *Epilepsia* 58, 512–521.
- Sharma, R.P., Rosen, C., Kartan, S., Guidotti, A., Costa, E., Grayson, D.R., Chase, K., 2006. Valproic acid and chromatin remodeling in schizophrenia and bipolar disorder: preliminary results from a clinical population. *Schizophr. Res.* 88, 227–231.
- Sheets, P.L., Heers, C., Stoehr, T., Cummins, T.R., 2008. Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2R)-2-(acetylamino)-N-benzyl-3-methoxypropylamide], lidocaine, and carbamazepine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 89–99.
- Shizu, R., Shindo, S., Yoshida, T., Numazawa, S., 2012. MicroRNA-122 down-regulation is involved in phenobarbital-mediated activation of the constitutive androstane receptor. *PLoS One* 7, e41291.
- Smirnova, L., Block, K., Sittka, A., Oelgeschlager, M., Seiler, A.E., Luch, A., 2014. MicroRNA profiling as tool for in vitro developmental neurotoxicity testing: the case of sodium valproate. *PLoS One* 9, e98892.
- Smith, A.K., Conneely, K.N., Newport, D.J., Kilaru, V., Schroeder, J.W., Pennell, P.B., Knight, B.T., Cubells, J.C., Stowe, Z.N., Brennan, P.A., 2012. Prenatal antiepileptic exposure associates with neonatal DNA methylation differences. *Epigenetics* 7, 458–463.
- Stefani, A., Spadoni, F., Siniscalchi, A., Bernardi, G., 1996. Lamotrigine inhibits Ca²⁺ currents in cortical neurons: functional implications. *Eur. J. Pharmacol.* 307, 113–116.
- Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.
- Sucksdorff, D., Brown, A.S., Chudal, R., Jokiranta-Olkinie, E., Leivonen, S., Suominen, A., Heinimaa, M., Sourander, A., 2015. Parental and comorbid epilepsy in persons with bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 188, 107–111.
- Suzuki, K., Shijuku, T., Fukamachi, T., Zunders, J., Guillemain, G., Cooper, D., Kelleher, A., 2005. Prolonged transcriptional silencing and CpG methylation induced by siRNAs targeted to the HIV-1 promoter region. *J. RNAi Gene Silencing* 1, 66–78.
- Swinkels, W.A., Duijsens, J.J., Spinhoven, P., 2003. Personality disorder traits in patients with epilepsy. *Seizure* 12, 587–594.
- Tahiliani, M., Mei, P., Fang, R., Leonor, T., Rutenberg, M., Shimizu, F., Li, J., Rao, A., Shi, Y., 2007. The histone H3K4 demethylase SMXC links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature* 447, 601–605.
- Tellez-Zenteno, J.F., Patten, S.B., Jette, N., Williams, J., Wiebe, S., 2007. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia* 48, 2336–2344.
- Tien, Y.-C., Pope, C., Piekos, S., Zhong, Xb., 2016. Neonatal phenobarbital exposure results in decreased proton pump inhibition by omeprazole in adult mouse. *Faseb J.* 30, 713–712.
- Todd, S.M., Zhou, C., Clarke, D.J., Chohan, T.W., Bahceci, D., Arnold, J.C., 2017. Interactions between cannabidiol and Δ9-THC following acute and repeated dosing:

- rebound hyperactivity, sensorimotor gating and epigenetic and neuroadaptive changes in the mesolimbic pathway. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27, 132–145.
- Tost, J., 2010. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol. Biotechnol.* 44, 71–81.
- Travaglini, L., Vian, L., Billi, M., Grignani, F., Nervi, C., 2009. Epigenetic reprogramming of breast cancer cells by valproic acid occurs regardless of estrogen receptor status. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 225–234.
- Trecul, A., Morceau, F., Gaigneaux, A., Schnekenburger, M., Dicato, M., Diederich, M., 2014. Valproic acid regulates erythro-megakaryocytic differentiation through the modulation of transcription factors and microRNA regulatory micro-networks. *Biochem. Pharmacol.* 92, 299–311.
- Tremolizzo, L., Difrancesco, J.C., Rodriguez-Menendez, V., Riva, C., Conti, E., Galimberti, G., Ruffmann, C., Ferrarese, C., 2012. Valproate induces epigenetic modifications in lymphomonocytes from epileptic patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39, 47–51.
- Tufarelli, C., Stanley, J.A., Garrick, D., Sharpe, J.A., Ayyub, H., Wood, W.G., Higgs, D.R., 2003. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat. Genet.* 34, 157–165.
- Tzschach, A., Lenzen, S., Moser, B., Reinhardt, R., Chelly, J., Fryns, J.P., Kleefstra, T., Raynaud, M., Turner, G., Ropers, H.H., Kuss, A., Jensen, L.R., 2006. Novel JARID1C/SMCX mutations in patients with X-linked mental retardation. *Hum. Mutat.* 27, 389.
- Urbaneck-Olejnik, K., Liszewska, M., Kostka, G., 2014. The effect of phenobarbital on gene expression levels of p53 and Dnmt1 in the liver of Wistar rats. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 65, 199–203.
- Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J., Parker, R., 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 20, 515–524.
- Vaquero, A., Loyola, A., Reinberg, D., 2003. The constantly changing face of chromatin. *Sci. Aging Knowl. Environ.* 2003, RE4.
- Wang, X., Zheng, G., Dong, D., 2015. Coordinated action of histone modification and microRNA regulations in human genome. *Gene* 570, 277–281.
- Wang, Z., Zhang, C., Huang, J., Yuan, C., Hong, W., Chen, J., Yu, S., Xu, L., Gao, K., Fang, Y., 2014. MiRNA-206 and BDNF genes interacted in bipolar I disorder. *J. Affect. Disord.* 162, 116–119.
- Watson, R.E., Goodman, J.I., 2002. Effects of phenobarbital on DNA methylation in GC-rich regions of hepatic DNA from mice that exhibit different levels of susceptibility to liver tumorigenesis. *Toxicol. Sci.* 68, 51–58.
- Wei, C.X., Bian, M., Gong, G.H., 2015. Current research on antiepileptic compounds. *Molecules* 20, 20741–20776.
- Wellington, K., Goa, K.L., 2001. Oxcarbazepine: an update of its efficacy in the management of epilepsy. *CNS Drugs* 15, 137–163.
- Willow, M., Kuenzel, E.A., Catterall, W.A., 1984. Inhibition of voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells and synaptosomes by the anticonvulsant drugs diphenylhydantoin and carbamazepine. *Mol. Pharmacol.* 25, 228–234.
- Wong, P.T., Teo, W.L., 1986. The effect of phenytoin on glutamate and GABA transport. *Neurochem. Res.* 11, 1379–1382.
- Wu, X., Chen, P.S., Dallas, S., Wilson, B., Block, M.L., Wang, C.C., Kinyamu, H., Lu, N., Gao, X., Leng, Y., Chuang, D.M., Zhang, W., Lu, R.B., Hong, J.S., 2008. Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11, 1123–1134.
- Wu, Y., Shi, X., Liu, Y., Zhang, X., Wang, J., Luo, X., Wen, A., 2012. Histone deacetylase 1 is required for Carbamazepine-induced CYP3A4 expression. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 58, 78–82.
- Xia, W., Lan, X., Lv, J., Ma, J., Chen, W., Gao, L., Xia, Q., 2016. Valproic acid (VPA) suppresses the expression of SMAD4 in prostate carcinoma by up-regulating miR-34a. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 9.
- Xie, X., Lancaster, B., Peakman, T., Garthwaite, J., 1995. Interaction of the antiepileptic drug lamotrigine with recombinant rat brain type IIA Na⁺ channels and with native Na⁺ channels in rat hippocampal neurones. *Pflugers Arch.* 430, 437–446.
- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D.D., Lay, F.D., Jones, P.A., Liang, G., 2014. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell* 26, 577–590.
- Yildirim, E., Zhang, Z., Uz, T., Chen, C.Q., Manev, R., Manev, H., 2003. Valproate administration to mice increases histone acetylation and 5-lipoxygenase content in the hippocampus. *Neurosci. Lett.* 345, 141–143.
- Zhang, Z., Convertini, P., Shen, M., Xu, X., Lemoine, F., de la Grange, P., Andres, D.A., Stamm, S., 2013. Valproic acid causes proteasomal degradation of DICER and influences miRNA expression. *PLoS One* 8, e82895.
- Zhou, R., Yuan, P., Wang, Y., Hunsberger, J.G., Elkahloun, A., Wei, Y., Damschroder-Williams, P., Du, J., Chen, G., Manji, H.K., 2009. Evidence for selective microRNAs and their effectors as common long-term targets for the actions of mood stabilizers. *Neuropsychopharmacology* 34, 1395–1405.
- Zhu, Q., Wang, L., Zhang, Y., Zhao, F.H., Luo, J., Xiao, Z., Chen, G.J., Wang, X.F., 2012. Increased expression of DNA methyltransferase 1 and 3a in human temporal lobe epilepsy. *J. Mol. Neurosci.* 46, 420–426.
- Ziauddin, M.F., Yeow, W.S., Maxhimer, J.B., Baras, A., Chua, A., Reddy, R.M., Tsai, W., Cole Jr, G.W., Schrupp, D.S., Nguyen, D.M., 2006. Valproic acid, an antiepileptic drug with histone deacetylase inhibitory activity, potentiates the cytotoxic effect of Apo2L/TRAIL on cultured thoracic cancer cells through mitochondria-dependent caspase activation. *Neoplasia* 8, 446–457.
- Zong, L., Zhou, L., Hou, Y., Zhang, L., Jiang, W., Zhang, W., Wang, L., Luo, X., Wang, S., Deng, C., Peng, Z., Li, S., Hu, J., Zhao, H., Zhao, C., 2017. Genetic and epigenetic regulation on the transcription of GABRB2: genotype-dependent hydroxymethylation and methylation alterations in schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 88, 9.

Chapter 11

Human Brain Tissue as a Model for the Study of Epilepsy

Leonardo Lara-Valderrábano, Ivette Bañuelos-Cabrera,
Victor Navarrete-Modesto, and Luisa Rocha

Abstract

Epilepsy surgery is widely used to treat pharmacoresistant epilepsy. This therapeutic strategy offers the opportunity to study human brain tissue *in vitro*. We describe three approaches that represent an excellent opportunity for the study of the underlying mechanisms of pharmacoresistant epilepsy: *in vitro* electrophysiological recordings, *in vitro* procedures for receptor evaluation, and genomic analyses. These procedures could allow individual diagnosis and personalized treatment for patients with pharmacoresistant epilepsy.

Key words Temporal lobe epilepsy, Human brain tissue, Electrophysiology, Receptor analysis, Genomic analysis

1 Introduction

The human epileptic brain exhibits unique network, cellular, and molecular properties. Therefore, using brain tissue from patients with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is a first-rate opportunity to characterize the electrophysiological, histological, molecular, and genetic properties in this pathological condition. There is an increase of interest in the study of epilepsy directly in human tissue, estimated by the number of publications on this topic between 1976 and 2005 [1] (Fig. 1).

Epilepsy is one of the most common neurologic disorders [2]. It is estimated that approximately 50 million people is affected with epilepsy worldwide [3]. Despite the severity and high prevalence of this disorder [4], the underlying neurobiology mechanisms associated with epilepsy are poorly understood. Indeed, most of what is known about epilepsy has been obtained from the research done in animal models. Studying human brain tissue *in vitro* offers a crucial opportunity for the understanding of the disease. The increment of epilepsy surgery [5] and its effectiveness to reduce pharmacoresistant epilepsy [6, 7] has increased the availability of brain tissue from

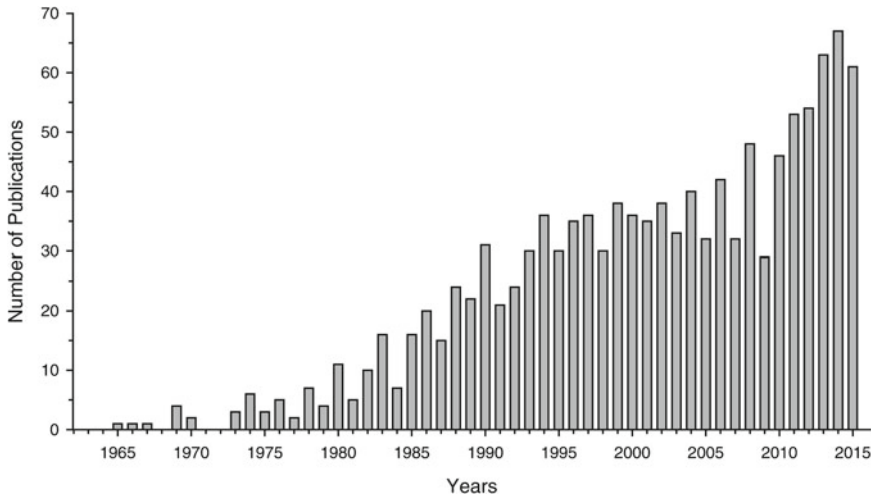


Fig. 1 Histogram showing the number of publications containing “human brain tissue” in PubMed search

patients with this disorder. In this review, we focus in the relevance of evaluating the human epileptic tissue using the following approaches: electrophysiology, receptor analysis, and genetic evaluation.

2 Epilepsy and In Vitro Electrophysiology

The first topic to be addressed is the electrophysiological approach to study the brain tissue obtained from patients with pharmacoresistant epilepsy. This situation allows us to explore directly the activity of human single neurons and networks of brain structures of patients with drug-resistant epilepsy (Fig. 2).

Once the focus has been identified, surgery often involves the resection of specific brain structures involved in the generation and propagation of the seizure activity [6]. It is essential to proceed fast in order to preserve the tissue in optimal conditions. After brain tissue samples have been excised, it is optimal to place them immediately in ice-cold (4 °C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) gassed with a 95% O₂–5% CO₂ mixture. The ACSF composition used for slice perfusion during electrophysiological experiments varies, but it generally includes (in mM): NaCl 124–129, KCl 2–4, CaCl₂ 1.6–2.4, MgSO₄ 1.3–2, NaH₂PO₄ 1.24–1.25, NaHCO₃ 21–26, and glucose 10 [1, 8]. When tissue transportation takes long periods (30 min), it is advised to use ACSF reduced in Na⁺ (to prevent hypoxia-induced Na⁺ influx) and α-tocopherol in addition (as a free radical scavenger) [9].

The thickness of brain slices varies depending if the procedure involves the evaluation of individual neurons or networks. Commonly it goes from 300 to 750 μm [8–14], although it is recommended a maximum of 600 μm for a proper slice oxygenation [1].

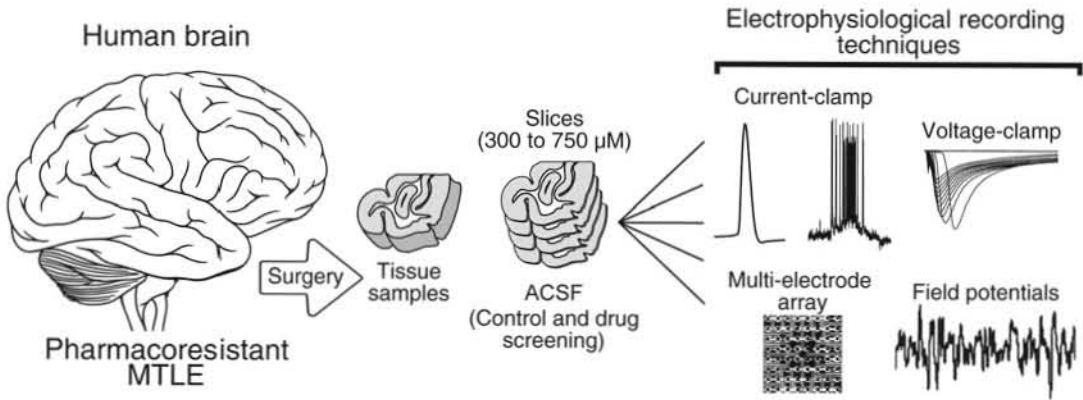


Fig. 2 Schematic representation of the standard protocol used to evaluate electrophysiological activity in brain tissue obtained from patients with pharmacoresistant epilepsy. After slicing, the tissue is available for different techniques of electrophysiological recording (*right panels*); each one provides distinct kind of information depending on the aim of the study. For example, current-clamp allows the study of epileptiform activity and action potential dynamics of individual neurons; voltage-clamp could be used to analyze currents and channel properties; multielectrode arrays provide the opportunity of simultaneously stimulating and recording field potentials, and/or action potentials in different areas of the tissue; field potentials are used to evaluate multiple neuron activity of during epileptiform activity

It is important to consider that some types of epilepsy, such as mesial temporal lobe epilepsy (MTLE), are associated with neuronal damage and hippocampal sclerosis [15–17]. This condition makes the tissue difficult to be penetrated by the pipette or electrode. Also, the usual method to visualize neurons in patch-clamp mode (infrared differential interference contrast optics) could be difficult to implement.

Reports about the evaluation of human cortex unitary activity *in vivo* exist since 1956 [18]. Extracellular field potentials or unitary neuron recordings *in vitro* are valuable alternatives for the study of the underlying cellular mechanisms of epilepsy depending on the main goal of the study. Field potential recordings are used to study extracellular activity of network synchronization activity in hippocampal preparations [11] and synaptic plasticity properties [19]. This approach allows the description of spontaneous and rhythmic activity initiated in the subiculum, a condition that resembles the epileptiform discharges recorded by intracranial electrodes [20]. Concurrent to field potential recordings, other measurements as extracellular ionic concentrations can be assessed [21].

The evaluation of unitary extracellular neuronal activity requires the incubation of the human brain tissue immediately after its resection [12]. The study of Schwartzkroin and Prince in 1976 represents the first evaluation of intracellular recording of neurons from the human cortex neurons [22]. These authors employed the same criteria used for assessing neurons of animal

cortex and used sharp electrodes (20–50 M Ω). The results obtained demonstrated that human cortical neurons present stable resting membrane potential (RMP), overshooting action potentials, and absence of rhythmic high-frequency spike firing. Although the number of neurons recorded was small, the authors stood out that the *in vitro* electrophysiology techniques can be used to obtain valuable data from human brain tissue [20, 22–24].

The firing properties of human neurons evaluated by *in vitro* electrophysiology methods have shown to be similar to those identified in rodents and other species [1, 24, 25]. Other important approach represents the evaluation of neurotransmitter effects. For example, when GABA is applied to the brain slice, it may exert inhibitory effects crucial for controlling cerebral excitability [10]. This situation is perturbed in the cerebral tissue of patients with pharmacoresistant epilepsy [26, 27]. The *in vitro* evaluation of the effects of other neurotransmitters such as acetylcholine, adenosine, histamine, norepinephrine, and serotonin reveals their effects and their contribution in the neuronal activity modulation [28].

The electrophysiological activity should be correlated with the cell morphology. Cellular labeling with fluorescent dyes as Lucifer yellow [23] or biocytin [24, 27] are techniques available for morphological reconstructions after the electrophysiological evaluation of the tissue. Morphological data of neurons in epileptic tissue should be carefully compared with data obtained from autopsies [29, 30]. Biocytin-filled neurons in combination with immunohistochemistry [26] provide more information about the expression of particular proteins.

There are some approaches that reduce the clamp problems such as the dissociation of the cells or neuronal cultures [31]. The isolation of neurons allows the characterization of essential events for the neuronal excitability, such as the transient currents in neocortical neurons [32]. The evaluation of astrocytes in cultures from medically intractable TLE allowed to establish that cells from the seizure focus exhibited action potential-like events in response to electrical stimulation [33].

Another new approach is the evaluation of electrical activity by multielectrode arrays (MEAs). This procedure allows the analysis of spatiotemporal dynamics of the epileptiform activity in specific networks, including the areas of seizure initiation and propagation. It also facilitates the analysis of effects induced by antiepileptic drugs at cellular and network levels, field potentials, and action potentials of multiple neurons from diverse regions of the tissue [34].

One of the most interesting perspectives of the evaluation of the cerebral tissue obtained from patients with pharmacoresistant epilepsy using *in vitro* electrophysiology is the investigation on the mechanisms underlying the pharmacoresistance to antiepileptic drugs. For example, previous studies demonstrated that the blockage of sodium channels induced by carbamazepine (*i.e.*, use-dependent

blocker of voltage-dependent sodium channels) is not detected in tissue obtained from some patients with pharmacoresistant epilepsy [35]. In another study, the modulation of Na⁺ currents induced by valproic acid was tested in isolated neurons from patients with and without hippocampal sclerosis. The cellular response to valproic acid was consistent with previous reports in animal models. In spite of the important damage found in patients with mesial sclerosis, they did not demonstrate differences in the biophysical properties of the voltage-gated sodium currents, when compared with the non-sclerotic tissue [36].

It is evident that the *in vitro* electrophysiology approaches can contribute to trace the underlying cellular mechanisms of epilepsy and the screening of new antiepileptic drugs and their effects. This approach can be used to determine the final diagnosis and subsequent individual therapy. However, it presents relevant limitations such as the scarce spontaneous epileptiform activity found in human brain slices possibly due to the isolation of complex networks from other brain areas.

3 Evaluation of Receptor Changes in Human Brain Tissue

A receptor is a cellular macromolecule, or an assembly of macromolecules, that is involved in chemical signaling between and within cells [37]. Receptors should present at least the following characteristics to identify them: (1) Binding, specific, and saturable ligand binding are hallmarks of receptors. (2) Affinity, the ability of a drug to bind to the specific receptor to form the drug-receptor complex. The dissociation constant (K_d) or affinity of most receptors for their ligands is in the nanomolar or subnanomolar range. (3) Ligand binding to the receptors should be able to activate signaling pathways to trigger physiological responses [38].

The evaluation of the tissue of patients with epilepsy represents a great opportunity to investigate receptor changes associated with this disorder such as number, affinity, binding, and coupling to transduction mechanisms. The knowledge obtained allows the design of new therapeutic strategies to strengthen or inhibit transductional mechanisms [39]. Receptors in the cerebral tissue of patients with epilepsy have been evaluated through different *in vitro* and *in vivo* techniques. The method of choice depends upon the aim of the study.

Western blot is a useful procedure to determine changes in the protein expression of the receptors [40]. In general, the methodology for Western blot is as follows: samples of human brain tissue are suspended in lysate buffer containing protease inhibitor cocktail including 50 mM HEPES buffer, 0.05% Triton X-100, 0.62 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 20 mM sodium molybdate. Proteins from tissue are isolated by

electrophoresis using 8 % SDS-polyacrylamide Tris-glycine gels. Once separated, the proteins are transferred to a membrane of nitrocellulose in which each protein is located in specific bands according to the molecular weight. The membrane is then incubated with specific antibodies to label the protein of interest. The thickness and density of the band corresponds to the amount of protein present [40, 41]. Although the results obtained from Western blot experiments give information about the protein expression of specific receptors, they do not give data about the capacity of these proteins to bind specific agonists and induce transductional mechanisms.

Some *in vivo* and *in vitro* techniques are useful to determine receptor binding changes in the brain of patients with epilepsy. Positron emission tomography (PET) is an *in vivo* procedure that let us identify the distribution and density of specific receptors in specific brain areas of patients with epilepsy (Fig. 3a). This procedure involves the systemic administration of ligands that may label particular receptors. However, be cautious regarding the interpretation of results due to the presence of endogenous ligands in the brain that may compete with the exogenous ligands.

In vitro autoradiography is a useful procedure to label specific receptors and proteins involved in the transductional mechanisms in brain sections obtained from patients with pharmacoresistant epilepsy and submitted to epilepsy surgery. *In vitro* autoradiography procedures avoid endogenous ligands and give information about the anatomical localization of the receptors (Fig. 3b) [42].

For *in vitro* autoradiography, brain sections are exposed to ligands labeled with a radioactive isotope and subsequently exposed to a film [43, 44]. The more commonly used isotopes for *in vitro* autoradiography are the following: ^3H gives the highest resolution and is used to label proteins, nucleic acids, and other molecules frequently involved in binding assays; ^{14}C replaces the nonradioactive carbon in order to trace chemical and biochemical reactions involving pharmacological substances; and ^{35}S is used to label proteins, nucleic acids, and amino acids containing a thiol group [45].

The *in vitro* autoradiography experiments can be carried out using brain sections of patients with pharmacoresistant epilepsy. Initially, the brain sections are washed to remove endogenous ligands and then incubated in a solution containing the specific radioligand at a concentration necessary to occupy 50% of receptors (Kd) [39]. Nonspecific binding has to be detected in parallel sections from the same tissue and incubated under similar experimental conditions but including a high concentration of a non-labeled ligand (a concentration 500–1000 higher than that used for the ^3H -ligand). Specific binding is obtained from the difference between nonspecific and total binding. After incubation, the sections are rinsed in buffer, dipped into distilled water, and dried under cold air stream. The dried sections are exposed to a sensitive

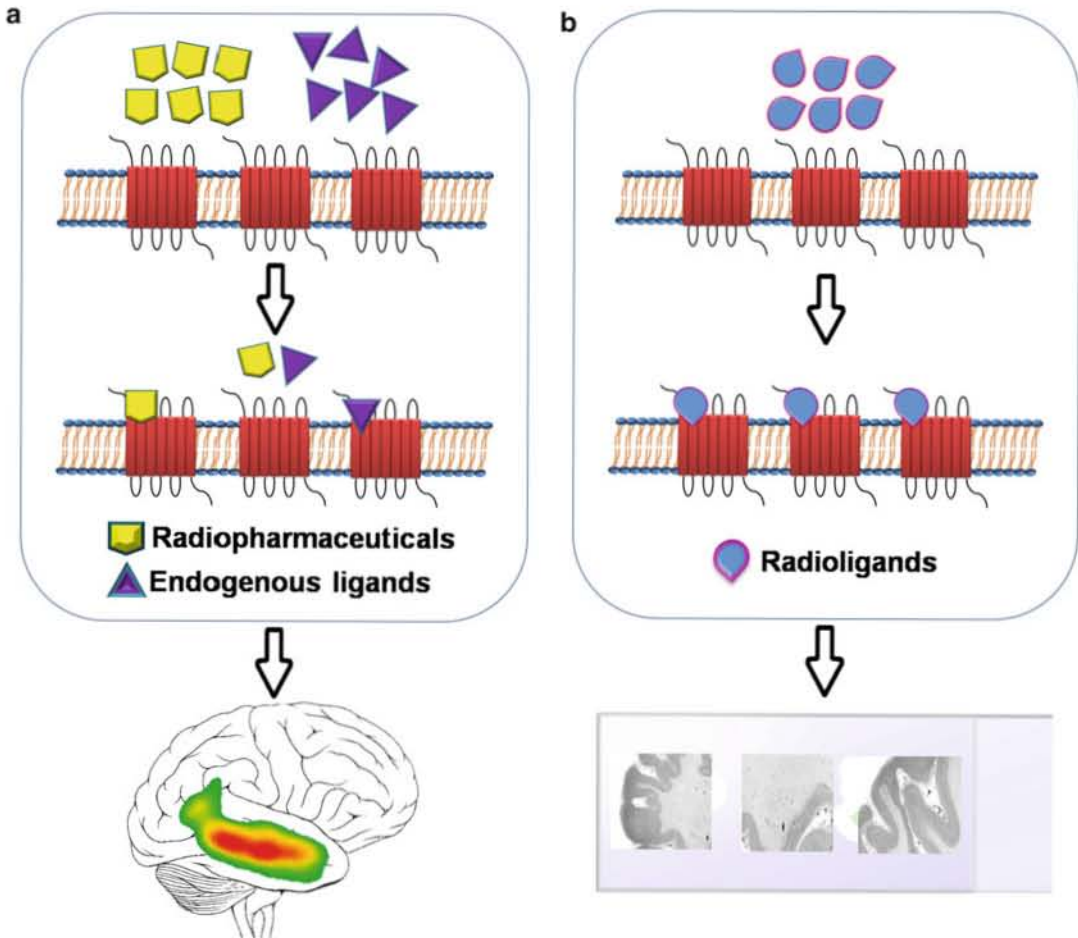


Fig. 3 Schematic representation of in vivo positron emission tomography (PET) (a) and in vitro autoradiography (b) procedures. Notice that in PET radiolabeled ligands compete with the endogenous ligands for the binding site in the receptors. In contrast, for autoradiography, the radioligand binds directly to the receptors because the endogenous ligands were previously washed

film together with standards of the isotope used. After the exposure period, the film is developed and used to determine optical densities of specific brain areas. The optical density is converted to radioactivity values (dpm/mm^2) and then to amount of receptors (fmol/mg protein) [46–48].

The in vitro autoradiography allows to determine the distribution of receptors labeled with a specific ligand in selected brain areas of patients with pharmacoresistant epilepsy [43, 49]. The results obtained will depend on the affinity and number of receptors labeled. However, in vitro autoradiography is not an appropriate procedure to determine specific characteristics of the receptor binding like maximal binding (B_{max}) and affinity (K_d).

Binding of an agonist to its receptor induces conformational changes in the receptor molecule. This situation leads to activation

of the G protein, a process during which the α subunit replaces the GDP with GTP. Functional autoradiography is a technique used to know if the receptor is capable to activate this reaction and subsequent transductional signaling pathways. During the functional assay, the tissue is exposed to [^{35}S]-GTP γ S that is resistant to hydrolysis. This situation provokes that [^{35}S]-GTP γ S replaces the GDP upon receptor activation and remains irreversibly bound to the G proteins [39, 42].

To perform functional autoradiography, the sections are initially dipped in assay buffer (50 mM Tris, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, pH 7.4) at 25 °C for 10 min and then incubated with 2 mM GDP in assay buffer for 30 min at 25 °C. Thereafter, the process involves different assays in parallel sections under different conditions (Table 1). The specific binding results from the difference between the values obtained from the basal and nonspecific binding assays. At the end of each assay, slides are rinsed twice, 2 min each in 50 mM Tris-HCl buffer and once in deionized H₂O at 4 °C. Slices are dried overnight and exposed to film for 5 days in film cassettes containing [^{14}C] microscalers. A standard curve is generated from [^{14}C] microscalers values. Optical density readings are converted into nanocuries of [^{35}S] per milligram of tissue. Net agonist-stimulated [^{35}S]-GTP γ S binding is calculated by subtracting basal binding (obtained in absence of agonist) from agonist-stimulated binding [46, 50].

A main limitation of the [^{35}S]-GTP γ S autoradiography is that not all the G proteins can be detected with this method due to their low number or efficiency. In addition, it results difficult to identify the types of G proteins labeled with [^{35}S]-GTP γ S [42, 51].

Binding assays in membranes are valuable procedures to determine important receptor characteristics such as B_{max} (propor-

Table 1
Experimental conditions to implement functional autoradiography

Basal activity	G proteins are evaluated in presence of 2 mM GDP and 40 pM [^{35}S]-GTP γ S. No agonists are included in the assay
Agonist-stimulated [^{35}S]-GTP γ S	This step is carry out in presence of 2 mM GDP, 40 pM [^{35}S]-GTP γ S, and a receptor agonist at a concentration necessary to produce maximal stimulation (μM) of the G proteins. The [^{35}S]-GTP γ S labels the G proteins activated as consequence of the agonist
Antagonist blockade of agonist-stimulated [^{35}S]-GTP γ S	A parallel assay has to be focused to evaluate the specificity of the receptor that activates the labeled G protein. The assay is carry out according to the conditions described for the agonist-stimulated [^{35}S]-GTP γ S but containing a specific antagonist at a concentration that blocks >90% of the receptor-induced G protein activation
Nonspecific binding	The assay is similar to the agonist-stimulated [^{35}S]-GTP γ S but with an excess of unlabelled GTP γ S (10 μM).

tional to the number of receptors present in the brain tissue), K_d (equilibrium dissociation constant), E_{max} (concentration of an agonist to produce maximal stimulation), and potency of stimulation (EC_{50}).

Binding assays can be used to determine changes in B_{max} and K_d , and [3H] is the most frequently used isotope for this purpose. For this procedure, brain tissue (~50 mg) is thawed and homogenized into a mixture of ice-cold 50 mM Tris-HCl and 1 mM EGTA, pH 7.4. After centrifugation (13,000 rpm, 20 min, 4 °C), the pellet is resuspended in 10 ml of 50 mM Tris-HCl buffer solution (pH 7.4) and centrifuged again. The resulting pellet (crude membranes) is suspended in incubation buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 7.4). Receptor binding assays are performed in triplicate in 0.5 ml of incubation buffer containing membranes (30–70 μg protein) and in presence of different concentrations of the radioligand with and without a non-labeled ligand. Specific binding is determined by subtracting the binding in the presence of non-labeled ligand from total binding. Incubations are terminated by rapid filtration through Whatman GF/C filters presoaked in 0.3% polyethylenimine. Filters are washed three times with ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), dried, and then immersed in Sigma-Fluor™ scintillation cocktail (Sigma). Radioactivity is determined using a Beckman LS6000SC liquid scintillation counter. Data are expressed in fmol/mg of tissue.

Binding assays in membranes can be also used to evaluate the ligand-induced activation of G proteins subsequent to the receptor stimulation (E_{max} and EC_{50}). The binding assays are as follows: brain tissue (~50 mg) is thawed and individually homogenized in 10 mM Tris-HCl solution containing 1 mM EGTA (pH 7.4) and centrifuged (10 min, 1800 rpm, 4 °C). The supernatants are collected and centrifuged at 13,000 rpm (20 min, 4 °C) and the pellet obtained is incubated (30 min, 30 °C) in 5 ml of assay buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.4). The incubation is stopped with the addition of 10 ml of ice-cold buffer. The obtained membranes are incubated (60 min, 60 °C) in 0.5 ml of assay buffer containing 0.02% bovine serum albumin, [^{35}S]-GTP γ S (50 pM), and increasing concentrations (10^{-10} – 10^{-6} M) of a selective receptor agonist in the presence of excess GDP (10 μ M). Basal binding is measured in the absence of the tested compound. Nonspecific binding is determined in the presence of 20 μ M unlabeled GTP γ S and subtracted from total binding to calculate the specific binding. The reaction is initiated by adding [^{35}S]-GTP γ S and terminated by filtration of the samples through Whatman GF/B glass fiber filters. Filters are washed three times with ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), dried, and dipped in Sigma-Fluor™. Finally, bound radioactivity is determined using a liquid scintillation counter. Data are subjected to nonlinear regression analysis of concentration effect curves performed by Prism (GraphPad Software) to determine E_{max}

and EC₅₀ values. Data are expressed in percentage of stimulation or in fmol/mg of protein [52].

One important limitation of the binding assays is that the changes evaluated correspond to big areas of the cerebral tissue. This procedure does not allow the evaluation of small brain areas.

4 Genomic Analysis of Brain Tissue from Patients with Pharmacoresistant Epilepsy

According to the dogma of molecular biology (Fig. 4), nucleic acids (DNA and RNA) and proteins, through the processes of replication, transcription, and translation, are key to perform genomic analyses. These represent the main tools in research, diagnosis, evaluation, treatment, and prognosis of many diseases, including various types of epilepsies. At present, genetic alterations are considered relevant in the development of epilepsy [53] and various types of seizures, such as juvenile myoclonic epilepsy [54]. It is important to consider that some of the studies that demonstrate the role of genes in the development of epilepsy and the associated pathological processes (e.g., drug resistance and hippocampal sclerosis) have been carried out using tissue obtained from patients subjected to epilepsy surgery [55].

When the cerebral tissue is removed from the human body, the neuronal cells begin to die. During this process, there is an activation of specific caspases that in turn activate endo- and exonucleases responsible for the degradation of RNA [56]. In contrast with DNA, which has a double-stranded arrangement and a chemical structure that favors its preservation, RNA is more labile and sensitive to degradation due to its single-stranded conformation while the presence of ribose facilitates the reaction with oxygen [57]. Therefore, the experimental conditions to manipulate postsurgical

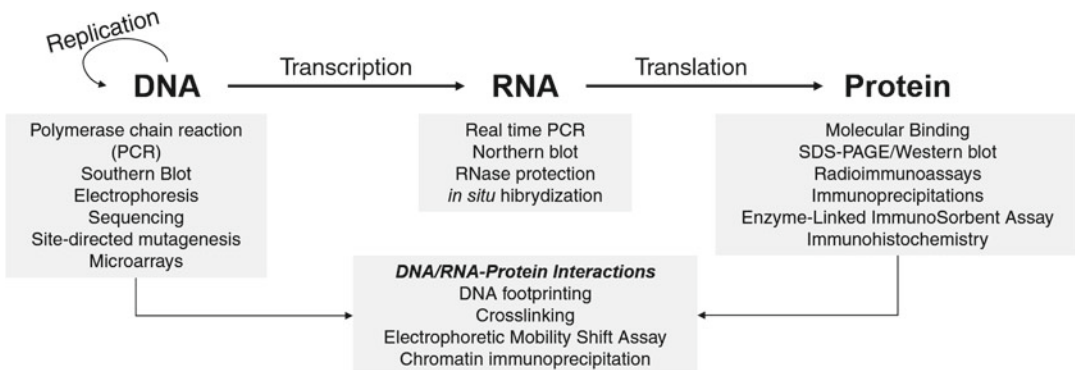


Fig. 4 Central dogma of molecular biology. Notice the different methodological approaches that can be carried out to evaluate DNA, RNA, and protein expression

tissue are essential to maintain the quality of proteins and nucleic acids and give validity and reliability to the results obtained [58].

In practice, after surgical resection, the epileptic tissue should be immediately frozen and stored at -80°C for the subsequent mRNA evaluation. Low temperatures (-60°C or lower) prevent the activation of caspases and hence the degradation of nucleic acids and proteins [59]. However, RNA seems to maintain some reactivity at low temperatures. RNases and some ribozymes are still active at -20°C and -70°C , respectively [60, 61]. At present, there are commercial compounds such as RNAlater[®] (Qiagen) which are useful to stabilize and protect the structure of cellular RNA and prevent its oxidation. Formalin fixation with paraffin embedding represents other procedure for mRNA preservation and maintaining histology [62]. With this procedure, the proteins are kept whole and the DNA can be isolated with very good quality for several years after [63–65]. Other important factor for consideration is the period of storage. The integrity of nucleic acids and proteins are compromised when the tissue is stored for long periods after the surgical resection.

Some considerations are relevant to keep in mind when isolating nucleic acids or proteins obtained from cerebral tissue: (1) one must work on ice and under complete sterile conditions; (2) the use of inhibitors of endo- and exonucleases in the case of nucleic acids is essential, and protease inhibitors in the case of proteins, (3) the material must be treated with diethylpyrocarbonate (DEPC) to 0.1%, which is a potent inhibitor of RNase [66].

The nucleic acid isolation of cerebral tissue from patients with epilepsy is often achieved by common protocols. However, isolation of DNA, RNA, and proteins has to be done separately if we want to preserve the quality of the molecules. For DNA isolation, it is necessary to use extraction with organic solvents such as ethanol or acetone. This procedure preserves the DNA of high molecular weight. The RNA is isolated by phenol–chloroform extraction in addition to commercial solutions of guanidine isothiocyanate and ammonium thiocyanate (e.g., TrizolThermoFisher Sci.). Proteins are isolated through different buffers containing detergent and ionic salts. Once the RNA is obtained, it is necessary to confirm its purity and integrity. The purity is determined by commonly used spectrophotometric assays, according to the ratio 260/280 nm. Using this procedure, an index of 1.8 for DNA and RNA 2 indicates high purity, whereas lower values indicate contamination with proteins or organic solvents. The integrity is determined by electrophoretic assays using 1% agarose gel. Using this procedure, a single band must be observed for DNA (no sweep), while for the RNA, it is common to detect electrophoretic migration patterns of the 28S, 18S, 5.8S, and 5S ribosomal subunit. These values represent the RNA integrity number (RIN) [67]. Pure samples of DNA should

be stored in solution because their dehydration leads to denaturation. In contrast, the RNA is best preserved dehydrated [59].

Concerning epilepsy and regardless of the level and the techniques used, the study of patients with this disorder is focused on the search for the “epilepsy gene.” Unfortunately this approach is utopian because it is impossible to attribute the cause of epilepsy to a single gene since it represents a multifactorial disorder from a physiological point of view [68]. Also, the molecular analysis of genes has to be associated with different factors, such as type of epilepsy, the epileptic focus, the treatments administered prior to surgical resection, whether or not it is drug resistant, and other clinical variables.

Despite the plurality in studies, when a search in PubMed (NCBI) is performed with the words “epilepsy and genes in humans,” they found only 6285 items, in which research ranges from the characterization and analysis of gene expression (the gene encoding the GABA_A receptor subunit δ [69]) to variants associations (atypical variants, p.G257R, p.R323Q, p.I389V in GABA_A receptor associated with Rolandic epilepsy [70]), polymorphisms and mutations (the SNP c.3435C>T in the MDR1 gene encoding the P-glycoprotein transporter [71]), identification and global study of microRNAs (miRNAs such as miR-204 and miR-218 that are downregulated in patients with TLE [72]), identification of biomarkers (TGF β 1 that is increased in CSF of patients with drug-resistant epilepsy [73]), epigenomic analysis (hypermethylation-associated genes observed in neurotransmission and synaptic transmission in patients with TLE [74]), and inheritance (the deletion of 18q21.32 relatives inherited from a family with cases of idiopathic epilepsies [75]). Thanks to all the studies using tissue of patients with epilepsy, many genetic aspects of the disease have been identified. However, there is still a long way to go in understanding the mechanisms. An undeniable fact is that studies of gene expression have opened the door to a new era where the final goal is the optimization and customization of treatments, thus improving the quality of life of patients.

5 Autopsy and Control Human Tissue

A good research design should always consider a control condition to eliminate variables that could lead to the wrong conclusion. The evaluation of human brain tissue of patients with epilepsy implies the analysis of control tissue obtained from neurologically healthy subjects. However, this situation is difficult to obtain.

Appropriate controls represent a crucial situation that must be addressed when human tissue is used for electrophysiology recordings [76]. It is clear that normal tissue samples cannot be used for comparison for obvious ethical causes. Resected samples of non-epileptic patients due to removal of deeply laying tumors have been

Table 2
Factors that affect the quality of the brain samples for molecular studies in epilepsy

Antemortem	Postmortem
Diseases	Postmortem interval (PMI)
Premedication	Structural alterations of the pathophysiology of epilepsy (hippocampal sclerosis and cortical dysplasia)
Fever	pH of the brain or cerebrospinal fluid
Hypoxia-ischemia	Ambient temperature in the postmortem period
Acidosis	Harvesting procedures
Agonal conditions	Storage temperature
	Accidental or systematic thawing and refreezing

used as “control tissue” [65]. Nevertheless, this tissue is not adequate for comparison because it comes from patients with a different pathology.

Many studies include the evaluation of autopsy samples obtained from subjects who died of different causes and without evidence of neurological illness. However, it is important to consider various antemortem and postmortem factors that can directly impact on the quality and therefore the validity of the results obtained from autopsy samples. For example, the evaluation of nucleic acids from autopsies is particularly difficult (Table 2) [76, 77]. Indeed, there are controversial studies indicating that the RNA of the brain tissue is stable and preserves integrity even several hours after death [78, 79], while other studies suggest a rapid and definitive RNA degradation as the postmortem interval progresses [76, 80].

6 Concluding Remarks

Certain epilepsy animal models have received great acceptance as they exhibit similar development of spontaneous seizures and a spectrum of histological changes like those of showed by patients with epilepsy [81]. However, the study of brain tissue obtained from patients with pharmaco-resistant epilepsy provides valuable information about human epilepsy pathophysiology [22] and represents an excellent tool for individual diagnosis and specialized treatment. Indeed, correlations between the results obtained and different clinic data from the patients with pharmaco-resistant epilepsy represent a valuable procedure to identify the possible influence of relevant conditions that can be manipulated to modify the expression of the disease.

Acknowledgments

We thank Francia Carmona for her technical assistance and the National Council for Sciences and Technology of Mexico for the support provided for developing this work (grant 220365 (LR) and scholarships 232762 (LL), 243422 (IB), and 377494 (VN)) and by the Fogarty International Center of the National Institutes of Health (Award Number R21TW009384).

References

1. Köhling R, Avoli M (2006) Methodological approaches to exploring epileptic disorders in the human brain *in vitro*. *J Neurosci Methods* 155:1–19. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.04.009
2. Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I et al (2010) Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia* 51:883–890. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x
3. PAHO/WHO (2013) Report on Epilepsy in Latin America and the Caribbean. http://www.who.int/mental_health/neurology/epilepsy/paho_report_2013.pdf. Accessed on 27 Mar 2016
4. Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A (2010) Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy Behav* 17:103–108. doi:10.1016/j.yebeh.2009.10.023
5. Engel J, Wiebe S, French J et al (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 Neuro. *Neurology* 60:538–547. doi:10.1212/01.WNL.0000055086.35806.2D
6. Jobst BC, Cascino GD (2015) Resective epilepsy surgery for drug-resistant focal epilepsy. *JAMA* 313:285–293. doi:10.1001/jama.2014.17426
7. Tonini C, Beghi E, Berg AT et al (2004) Predictors of epilepsy surgery outcome: a meta-analysis. *Epilepsy Res* 62:75–87. doi:10.1016/j.eplepsyres.2004.08.006
8. Ledri M, Sørensen AT, Madsen MG (2015) Differential effect of neuropeptides on excitatory synaptic transmission in human epileptic hippocampus. *J Neurosci* 35:9622–9631. doi:10.1523/JNEUROSCI.3973-14.2015
9. Kivi A, Lehmann TN, Kovács R et al (2000) Effects of barium on stimulus-induced rises of $[K^+]_o$ in human epileptic non-sclerotic and sclerotic hippocampal area CA1. *Eur J Neurosci* 12:2039–2048. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00103.x
10. McCormick DA (1989) GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J Neurophysiol* 62:1018–1027
11. Cohen I, Navarro V, Clemenceau S et al (2002) On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy *in vitro*. *Science* 298:1418–1421. doi:10.1126/science.1076510
12. Kato H, Ito Z, Matsuoka S et al (1973) Electrical activities of neurons in the sliced human cortex *in vitro*. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 35:457–462
13. Roseti C, Fucile S, Lauro C et al (2013) Fractalkine/CX3CL1 modulates GABAA currents in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 54:1834–1844. doi:10.1111/epi.12354
14. Foehring RC, Waters RS (1991) Contributions of low-threshold calcium current and anomalous rectifier (I_h) to slow depolarizations underlying burst firing in human neocortical neurons *in vitro*. *Neurosci Lett* 124:17–21. doi:10.1016/0304-3940(91)90812-8
15. Thom M, Mathern GW, Cross JH et al (2010) Mesial temporal lobe epilepsy: how do we improve surgical outcome? *Ann Neurol* 68:424–434. doi:10.1002/ana.22142
16. Margerison JH, Corsellis JA (1966) Epilepsy and the temporal lobes. *Brain* 89:499–530
17. Blümcke I, Coras R, Miyata H et al (2012) Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Pathol* 22:402–411. doi:10.1111/j.1750-3639.2012.00583.x
18. Ward AA, Thomas LB (1955) The electrical activity of single units in the cerebral cortex of man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 7:135–136. doi:10.1016/0013-4694(55)90067-5
19. Dietrich D, Kral T, Clusmann H et al (2002) Presynaptic group II metabotropic glutamate receptors reduce stimulated and spontaneous transmitter release in human dentate gyrus. *Neuropharmacology* 42:297–305. doi:10.1016/S0028-3908(01)00193-9
20. Köhling R, Schwartzkroin PA, Avoli M (2006) Studying epilepsy in the human brain *in vitro*.

- In: Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL (eds) *Models of seizures and epilepsy*, 1st edn. Elsevier, Burlington, VT
21. Avoli M, Drapeau C, Louvel J et al (1991) Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro. *Ann Neurol* 30:589–596. doi:[10.1002/ana.410300412](https://doi.org/10.1002/ana.410300412)
 22. Schwartzkroin PA, Prince DA (1976) Microphysiology of human cerebral cortex studied in vitro. *Brain Res* 115:497–500. doi:[10.1016/0006-8993\(76\)90366-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90366-8)
 23. Avoli M, Olivier A (1989) Electrophysiological properties and synaptic responses in the deep layers of the human epileptogenic neocortex in vitro. *J Neurophysiol* 61:589–606
 24. Koch UR, Musshoff U, Pannek HW et al (2005) Intrinsic excitability, synaptic potentials, and short-term plasticity in human epileptic neocortex. *J Neurosci Res* 80:715–726
 25. Schwartzkroin PA (1994) Cellular electrophysiology of human epilepsy. *Epilepsy Res* 17:185–192. doi:[10.1016/0920-1211\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0920-1211(94)90049-3)
 26. Huberfeld G, Wittner L, Clémenceau S et al (2007) Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 27:9866–9873. doi:[10.1523/jneurosci.2761-07.2007](https://doi.org/10.1523/jneurosci.2761-07.2007)
 27. Wittner L, Huberfeld G, Clémenceau S et al (2009) The epileptic human hippocampal cornu ammonis 2 region generates spontaneous interictal-like activity in vitro. *Brain* 132:3032–3046. doi:[10.1093/brain/awp238](https://doi.org/10.1093/brain/awp238)
 28. McCormick DA, Williamson A (1989) Convergence and divergence of neurotransmitter action in human cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8098–8102
 29. Milatovic D, Montine TJ, Zaja-Milatovic S et al (2010) Morphometric analysis in neurodegenerative disorders. *Curr Protoc Toxicol* 12:1–14. doi:[10.1002/0471140856.tx1216s43](https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1216s43)
 30. Rosoklija GB, Petrushevski VM, Stankov A et al (2014) Reliable and durable Golgi staining of brain tissue from human autopsies and experimental animals. *J Neurosci Methods* 15:20–29. doi:[10.1016/j.jneumeth.2014.04.006](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.04.006)
 31. Vreugdenhil M, Hoogland G, van Veelen CWM et al (2004) Persistent sodium current in subicular neurons isolated from patients with temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 19:2769–2778. doi:[10.1111/j.1460-9568.2004.03400.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03400.x)
 32. Rüschemschmidt C, Köhling R, Schwarz M et al (2004) Characterization of a fast transient outward current in neocortical neurons from epilepsy patients. *J Neurosci Res* 75:807–816. doi:[10.1002/jnr.20055](https://doi.org/10.1002/jnr.20055)
 33. O'Connor ER, Sontheimer H, Spencer DD et al (1998) Astrocytes from human hippocampal epileptogenic foci exhibit action potential-like responses. *Epilepsia* 39:347–354. doi:[10.1111/j.1528-1157.1998.tb01386.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1998.tb01386.x)
 34. Dossi E, Blauwblomme T, Nabbout R et al (2014) Multi-electrode array recordings of human epileptic postoperative cortical tissue. *J Vis Exp* 26:1–9. doi:[10.3791/51870](https://doi.org/10.3791/51870)
 35. Remy S, Gabriel S, Urban BW et al (2003) A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol* 53:469–479. doi:[10.1002/ana.10473](https://doi.org/10.1002/ana.10473)
 36. Vreugdenhil M, van Veelen CWM, van Rijen PC (1998) Effect of valproic acid on sodium currents in cortical neurons from patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 32:309–320. doi:[10.1016/S0920-1211\(98\)00061-8](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(98)00061-8)
 37. Neubig RR, Spedding M, Kenakin T et al (2003) International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* 55:597–606. doi:[10.1124/pr.55.4.4](https://doi.org/10.1124/pr.55.4.4)
 38. Feener EP, King GL (1998) The biochemical and physiological characteristics of receptors. *Adv Drug Deliv Rev* 29:197–213
 39. Rocha L, Neri-Bazán L, Orozco-Suárez SA et al (2009) Studying receptors in the human epileptic brain using in vitro autoradiography. In: Rocha L (ed) *Models of neuropharmacology*, 1st ed. Research Signpost, Kerala
 40. Mahmood T, Yang PC (2012) Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4:429–434. doi:[10.4103/1947-2714.100998](https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998)
 41. Pujols L, Mullol J, Roca-Ferrer J et al (2002) Expression of glucocorticoid receptor alpha and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1324–C1331. doi:[10.1152/ajpcell.00363.2001](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00363.2001)
 42. Sóvágó J, Dupuis DS, Gulyás B et al (2001) An overview on functional receptor autoradiography using [³⁵S]GTPgammaS. *Brain Res Brain Res Rev* 38:149–164. doi:[10.1016/S0165-0173\(01\)00106-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00106-0)
 43. Solon EG (2015) Autoradiography techniques and quantification of drug distribution. *Cell Tissue Res* 360:87–107. doi:[10.1007/s00441-014-2093-4](https://doi.org/10.1007/s00441-014-2093-4)
 44. Sharif N, Eglén R (1993) Quantitative autoradiography: a tool to visualize and quantify receptors, enzymes, transporters, and second messenger systems. In: Sharif N (ed) *Molecular imaging in neuroscience: a practical approach*, 1st edn. Oxford University Press, Oxford

45. Barthe N, Maitrejean S, Cardona A (2012) High-resolution beta imaging. In: L'Annunziata MF (ed) Handbook of radioactivity analysis, 3rd edn. Academic, Oxford
46. Rocha L, Orozco-Suarez S, Alonso-Vanegas M et al (2009) Temporal lobe epilepsy causes selective changes in mu opioid and nociceptin receptor binding and functional coupling to G-proteins in human temporal neocortex. *Neurobiol Dis* 35:466–473. doi:[10.1016/j.nbd.2009.06.008](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.06.008)
47. Jin CY, Anichtchik O, Panula P (2009) Altered histamine H3 receptor radioligand binding in post-mortem brain samples from subjects with psychiatric diseases. *Br J Pharmacol* 157:118–129. doi:[10.1111/j.1476-5381.2009.00149.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00149.x)
48. Pollard H, Moreau J, Arrang JM et al (1993) A detailed autoradiographic mapping of histamine H3 receptors in rat brain areas. *Neuroscience* 52:169–189
49. Waeber C, Chiu ML (1999) In vitro autoradiographic visualization of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio) triphosphate binding stimulated by sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid. *J Neurochem* 73:1212–1221. doi:[10.1046/j.1471-4159.1999.0731212.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0731212.x)
50. Potier S, Sénécal J, Chabot JG (2005) A pentylenetetrazole-induced generalized seizure in early life enhances the efficacy of muscarinic receptor coupling to G-protein in hippocampus and neocortex of adult rat. *Eur J Neurosci* 21:1828–1836. doi:[10.1111/j.1460-9568.2005.04026.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04026.x)
51. Sim L, Selley D, Childers S (1997) Autoradiographic visualization in brain of receptor-G protein coupling using [35S] GTPγS binding. In: Challiss RAJ (ed) Receptor signal transduction protocols, 1st edn. Humana Press, Totowa, NJ
52. Cuellar-Herrera M, Velasco AL, Velasco F et al (2012) Mu opioid receptor mRNA expression, binding, and functional coupling to G-proteins in human epileptic hippocampus. *Hippocampus* 22:122–127. doi:[10.1002/hipo.20891](https://doi.org/10.1002/hipo.20891)
53. Panayiotopoulos CP (2012) The new ILAE report on terminology and concepts for the organization of epilepsies: critical review and contribution. *Epilepsia* 53:399–404. doi:[10.1111/j.1528-1167.2011.03381.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03381.x)
54. Helbig I, Hartmann C, Mefford HC (2013) The unexpected role of copy number variations in juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Behav* 28:S66–S68. doi:[10.1016/j.yebeh.2012.07.005](https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.07.005)
55. Mirza N, Vasieva O, Marson AG et al (2011) Exploring the genomic basis of pharmacoresistance in epilepsy: an integrative analysis of large-scale gene expression profiling studies on brain tissue from epilepsy surgery. *Hum Mol Genet* 20:4381–4394. doi:[10.1093/hmg/ddr365](https://doi.org/10.1093/hmg/ddr365)
56. Wagner E, Lykke-Andersen J (2002) mRNA surveillance: the perfect persist. *J Cell Sci* 115:3033–3038
57. Elliott D, Lodomery M (2011) Molecular biology of RNA. Oxford University Press, Oxford
58. Neumeister VM (2014) Tools to assess tissue quality. *Clin Biochem* 47:280–287. doi:[10.1016/j.clinbiochem.2014.02.016](https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.02.016)
59. Fabre AL, Colotte M, Luis A et al (2014) An efficient method for long-term room temperature storage of RNA. *Eur J Hum Genet* 22:379–385. doi:[10.1038/ejhg.2013.145](https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.145)
60. Ma S, Huang Y, van Huystee RB (2004) Improved plant RNA stability in storage. *Anal Biochem* 326:122–124. doi:[10.1016/j.ab.2003.10.026](https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.026)
61. Seyhan AA, Burke JM (2000) Mg²⁺-independent hairpin ribozyme catalysis in hydrated RNA films. *RNA* 6:189–198
62. Su JM, Perlaky L, Li XN et al (2004) Comparison of ethanol versus formalin fixation on preservation of histology and RNA in laser capture microdissected brain tissues. *Brain Pathol* 14:175–182. doi:[10.1111/j.1750-3639.2004.tb00050.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00050.x)
63. Shibata D, Martin WJ, Arnheim N (1988) Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology. *Cancer Res* 48:4564–4566
64. Foss RD, Guha-Thakurta N, Conran RM et al (1994) Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue: comparison of two housekeeping gene mRNA controls. *Diagn Mol Pathol* 3:148–155
65. Kashofer K, Viertler C, Pichler M et al (2013) Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: implications for RT-PCR and microarray analysis. *PLoS One* 8:e70714. doi:[10.1371/journal.pone.0070714](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070714)
66. Williams MA (2010) Stabilizing the code-methods to preserve RNA prove their worth. *Biomark Insights* 5:139–143. doi:[10.4137/BMI.S6094](https://doi.org/10.4137/BMI.S6094)
67. Schroeder A, Mueller O, Stocker S et al (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3. doi:[10.1186/1471-2199-7-3](https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3)
68. Stafstrom CE, Tempel BL (2000) Epilepsy genes: the link between molecular dysfunction and pathophysiology. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 6:281–292. doi:[10.1002/1098-2779\(2000\)6:4<281::AID-MRDD7>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1098-2779(2000)6:4<281::AID-MRDD7>3.0.CO;2-9)

69. Windpassinger C, Kroisel PM, Wagner K et al (2002) The human γ -aminobutyric acid A receptor delta (GABRD) gene: molecular characterisation and tissue-specific expression. *Gene* 292:25–31. doi:[10.1016/S0378-1119\(02\)00649-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00649-2)
70. Reinthaler EM, Dejanovic B, Lal D et al (2015) Rare variants in γ -aminobutyric acid type A receptor genes in rolandic epilepsy and related syndromes. *Ann Neurol* 77:972–986. doi:[10.1002/ana.24395](https://doi.org/10.1002/ana.24395)
71. Manna I, Gambardella A, Labate A et al (2015) Polymorphism of the multidrug resistance 1 gene MDRI/ABCB1 C3435T and response to antiepileptic drug treatment in temporal lobe epilepsy. *Seizure* 24:124–126. doi:[10.1016/j.seizure.2014.09.010](https://doi.org/10.1016/j.seizure.2014.09.010)
72. Kaalund SS, Venø MT, Bak M et al (2014) Aberrant expression of miR-218 and miR-204 in human mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis-convergence on axonal guidance. *Epilepsia* 55:2017–2027. doi:[10.1111/epi.12839](https://doi.org/10.1111/epi.12839)
73. Yu W, Zou Y, Du Y et al (2014) Altered cerebrospinal fluid concentrations of TGF β 1 in patients with drug-resistant epilepsy. *Neurochem Res* 39:2211–2217. doi:[10.1007/s11064-014-1422-z](https://doi.org/10.1007/s11064-014-1422-z)
74. Miller-Delaney SF, Bryan K, Das S et al (2015) Differential DNA methylation profiles of coding and non-coding genes define hippocampal sclerosis in human temporal lobe epilepsy. *Brain* 138:616–631. doi:[10.1093/brain/awu373](https://doi.org/10.1093/brain/awu373)
75. Tiron C, Campuzano O, Pérez-Serra A et al (2015) Further evidence of the association between LQT syndrome and epilepsy in a family with KCNQ1 pathogenic variant. *Seizure* 25:65–67. doi:[10.1016/j.seizure.2015.01.003](https://doi.org/10.1016/j.seizure.2015.01.003)
76. Birdsill AC, Walker DG, Lue L et al (2011) Postmortem interval effect on RNA and gene expression in human brain tissue. *Cell Tissue Bank* 12:311–318. doi:[10.1007/s10561-010-9210-8](https://doi.org/10.1007/s10561-010-9210-8)
77. Trabzuni D, Ryten M, Walker R et al (2011) Quality control parameters on a large dataset of regionally dissected human control brains for whole genome expression studies. *JNeurochem* 119:275–282. doi:[10.1111/j.1471-4159.2011.07432.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07432.x)
78. Ervin JF, Heinzen EL, Cronin KD et al (2007) Postmortem delay has minimal effect on brain RNA integrity. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:1093–1099. doi:[10.1097/nen.0b013e31815c196a](https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31815c196a)
79. Durrenberger PF, Fernando S, Kashefi SN et al (2010) Effects of antemortem and postmortem variables on human brain mRNA quality: a BrainNet Europe study. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:70–81. doi:[10.1097/NEN.0b013e3181c7e32f](https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181c7e32f)
80. Beach T, Sue L, Walker DG et al (2008) The sun health research institute brain donation program: description and experience, 1987–2007. *Cell Tissue Bank* 9:229–245. doi:[10.1007/s10561-008-9067-2](https://doi.org/10.1007/s10561-008-9067-2)
81. Sharma AK, Reams RY, Jordan WH et al (2007) Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol* 35:984–999. doi:[10.1080/01926230701748305](https://doi.org/10.1080/01926230701748305)

11.7 Anexo 7: Participación en congresos y eventos científicos

Congresos

- Society for Neuroscience Annual Meeting, 19-23 de octubre de 2019. Chicago, Illinois. USA
- XLII Reunión Anual del Capítulo Mexicano de la Liga Internacional Contra la Epilepsia. 28-31 de agosto de 2019. Mazatlán, Sinaloa. México
- X Congreso Latinoamericano de Epilepsia, 29 de septiembre-2 de octubre de 2018, San José, Costa Rica.
- 32th International Congress of Epilepsy, 2-6 de septiembre de 2017, Barcelona, España.
- Society for Neuroscience Annual Meeting, 6-11 de noviembre de 2016 de 2016. San Diego CA. USA
- IX Congreso Latinoamericano de Epilepsia, 20-23 de agosto de 2016, Cancún, Quintana Roo. México.
- XXXVIII Reunión Anual del Capítulo Mexicano de la Liga Internacional Contra la Epilepsia. 29 de Julio al 2 de agosto de 2015. Ciudad de México. México
- XXXVII Reunión Anual del Capítulo Mexicano de la Liga Internacional Contra la Epilepsia. Del 22-26 de agosto de 2014. León, Guanajuato. México

Otros eventos científicos

- Young Epilepsy Section: YES Kick-Off Workshop of ILAE., 11-13 de Mayo de 2018, Londres, Inglaterra.
- IX Latinoamerican summer school Epilepsy (LASSE). Del 22 de febrero al 3 de marzo de 2015. Sao Paulo Brasil.