



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN BDNF Y ANÁLISIS DE LA METILACIÓN  
DIFERENCIAL DE DISTINTOS PROMOTORES DE ESTE GEN EN HIPOCAMPO  
DE PACIENTES CON EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARTÍNEZ LEVY GABRIELA ARIADNA**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CARLOS SABÁS CRUZ FUENTES  
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑÍZ

COMITÉ TUTOR:

**DRA. LAURA COLÍN BARENQUE**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**DR. FELIX RECILLAS TARGA**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 15 de febrero de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MARTÍNEZ LEVY GABRIELA ARIADNA** con número de cuenta **98062535** con la tesis titulada **"ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN BDNF Y ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DIFERENCIAL DE DISTINTOS PROMOTORES DE ESTE GEN EN HIPOCAMPO DE PACIENTES CON EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL"**, realizada bajo la dirección del DR. **CARLOS SABÁS CRUZ FUENTES**:

Presidente: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES  
Vocal: DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO  
Secretario: DR. FÉLIX RECILLAS TARGA  
Suplente: DRA. SANDRA OROZCO SUAREZ  
Suplente: DRA. LAURA COLÍN BARENQUE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de abril de 2016

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## Agradecimientos:

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la infraestructura y el apoyo necesario para desarrollar mis estudios de posgrado.

A la Coordinación de estudios de Posgrado (CEP) por el apoyo brindado con la beca complementaria para llevar a cabo una estancia de investigación de 3 meses en la Universidad de Alabama en Birmingham.

Al Dr Carlos Sabás Cruz Fuentes por darme la confianza, las herramientas, la infraestructura y el apoyo necesario para realizar la presente tesis de doctorado. Por todos los comentarios, las discusiones y contenciones que nos permitieron salir adelante con este trabajo y en el futuro me ayudarán en mi carrera profesional.

Al Dr Felix Recillas Targa por el apoyo en el entendimiento y aprendizaje de técnicas para evaluar la metilación del ADN y por la enseñanza de muchos conceptos de epigenética relevantes para el desarrollo de este estudio y de mi carrera profesional. Por todos sus comentarios a lo largo de este proceso como miembro de mi comité tutorial que claramente me permitieron mejorar este trabajo.

A la Dra Laura Colín Barenque por el apoyo durante el desarrollo de mi examen de candidatura así como por todos sus comentarios como miembro de mi comité tutorial que indudablemente me ayudaron a desarrollar y mejorar este trabajo.

## **Agradecimientos a título personal:**

A la Dra Teresa Fortoul Van der Goes por su participación como jurado en el presente examen, por la lectura de este trabajo y los comentarios que mejoraron el mismo; así como por haberme dado en el pasado, junto con todo su grupo de trabajo, muchas de las herramientas que me han permitido llegar hasta donde estoy.

A la Dra María de Lourdes Massieu Trigo por participar como jurado en el presente examen, por la lectura detallada del trabajo y por sus comentarios que ayudaron a mejorar esta tesis.

A la Dra Sandra Orozco Suárez por participar como jurado en el presente examen, por la lectura puntual de la tesis y por sus comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr Mario Arturo Alonso Vanegas por su apoyo en la colección de la muestra y en la obtención de la información clínica necesaria para el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra Luisa Lilia Rocha Arrieta por sus comentarios y apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra Farah Lubin por haberme dado la confianza y el apoyo en mi estancia en su laboratorio que me permitió aprender nuevas técnicas para evaluar la metilación del ADN.

Al Dr Ricardo Massau Buentello García por su apoyo en eficientizar la comunicación con el grupo clínico que permitió una adecuada colección de la muestra así como la obtención de la información clínica de los pacientes.

A Rosario Pérez Molina por la enseñanza personalizada de distintas técnicas de laboratorio necesarias para evaluar la metilación del ADN.

A mis compañeros de laboratorio Magdalena Briones, Andres Nani y Amado Pérez por todo su apoyo en cuestiones técnicas, logísticas y de discusión de resultados que aportaron para el desarrollo del presente trabajo

A Fernando Pineda estudiante de licenciatura que me apoyo en el análisis de las muestras de cortezas y con quien he discutido muchos de estos resultados.

Al resto de mis compañeros del Insituto Rodrigo Arreola, Alejandro Aguilar, Sandra Hernández, Beatriz Camarena, Marco Sanabrais, Ivonne Flores, Edén Sánchez, Jorge Palacios y Josue Vásquez por sus comentarios, discusión y apoyo en los seminarios del laboratorio.

A los compañeros del laboratorio del Dr Felix Recillas: Edgar Buendía, Rosario Pérez, Erandi Ayala, Rodrigo Arzate y Francisco Carmona quienes además de haber sido mis cómplices en el proceso de estudiar un doctorado, se convirtieron en grandes amigos.

A los estudiantes de la Dra Farah Lubin: Ricardo Sánchez, Timothy Jarome, Anderson Butler, William Webb y Riley Jeb que además de hacer mi estancia en Alabama muy agradable me dieron muchas enseñanzas que me permitieron mejorar mi desempeño para desarrollar esta tesis.

A Jose Pérez, Georgina Guerrero, Gianelli Cortes y Jassmine Thomas por su apoyo técnico en los distintos laboratorios en los que trabaje, sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

**Le dedico esta tesis a mi Familia**

**A mis padres**

**Noemi Orhan Levy Orlik e Isaias Martínez Gracia**

**A mi hermano**

**Adrian Rodrigo Martínez Levy**

**Sin su apoyo y cariño este y otros proyectos de**

**vida hubieran sido imposibles.**



## Índice:

|   |     |
|---|-----|
| Índice de figuras: .....  | i   |
| Figuras Anexo 3 .....   | ii  |
| Índice de tablas: .....   | iii |
| Abreviaturas .....  | iv  |
| Resumen .....   | 1   |
| Abstract.....   | 2   |
| Descripción de la Tesis.....  | 3   |
| Antecedentes:.....  | 4   |
| Epilepsia del Lóbulo temporal:.....   | 5   |
| Implicación del BDNF en la epilepsia: .....                                       | 8   |
| <b>Efectos pro-epileptogénicos del BDNF:</b> .....                                | 9   |
| <b>Efectos anti-epileptogénicos del BDNF:</b> .....                               | 10  |
| Cambios en la expresión de BDNF en pacientes con ELT: .....                       | 12  |
| Expresión diferencial de transcritos de BDNF y su relación con la epilepsia:..... | 13  |
| Metilación del gen BDNF y sus implicaciones en la epilepsia: .....                | 16  |
| Justificación: .....  | 19  |
| Hipótesis .....   | 20  |
| Objetivos.....  | 21  |
| Objetivos particulares: .....   | 21  |
| Objetivo secundario: .....  | 21  |
| Método.....   | 22  |
| Diseño: .....   | 22  |
| Evaluación y selección de los pacientes: .....                                    | 22  |
| <b>Criterios de Inclusión</b> .....   | 22  |
| <b>Criterios de Exclusión</b> .....   | 22  |
| Obtención de la muestra de autopsias: .....                                       | 24  |
| <b>Criterios de Inclusión</b> .....   | 24  |
| <b>Criterios de Exclusión</b> .....   | 24  |
| Obtención de muestra genética .....   | 25  |
| <b>Durante la cirugía</b> .....   | 25  |
| <b>Durante la autopsia</b> .....  | 25  |
| Procedimiento experimental: .....   | 25  |
| <b>Extracción de ácidos nucleicos:</b> .....                                      | 25  |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Análisis de expresión de ARNm:</b> .....   | 26  |
| <b>Análisis epigenéticos:</b> .....   | 28  |
| Variables clínicas y análisis Estadístico.....  | 30  |
| <b>Resultados</b> .....   | 31  |
| Características de la muestra: .....  | 31  |
| Análisis de expresión:.....   | 34  |
| Análisis de metilación por clonación y secuenciación:.....  | 39  |
| Análisis de metilación por piro-secuenciación: .....  | 41  |
| <b>Discusión:</b> .....   | 43  |
| Datos clínicos y epidemiológicos de la muestra estudiada de pacientes con ELT: .....  | 43  |
| Cambios en la expresión de BDNF en pacientes con ELT .....  | 45  |
| Cambios en la expresión de BDNF en relación a la presencia de EH: .....   | 48  |
| Cambios en la expresión de BDNF en relación al uso de diversos tratamientos farmacológicos:..   | 49  |
| Patrón de metilación de los promotores 6 y 4 de BDNF en pacientes con ELT:.....   | 51  |
| <b>Limitaciones</b> .....   | 53  |
| <b>Conclusiones</b> .....   | 54  |
| <b>Literatura Citada</b> .....  | 55  |
| <b>Anexo 1: Artículo Requisito</b> .....  | 70  |
| Increase expression of BDNF transcripts with exon VI in hippocampus of patients with<br>pharmacoresistant Temporal Lobe Epilepsy..... | 70  |
| <b>Anexo 2: Artículo de revisión BDNF</b> .....   | 81  |
| <b>Genetic and epigenetic regulation of the Brain Derived Neurotrophic Factor in<br/>the Central Nervous system</b> .....             | 81  |
| <b>Anexo 3: Resultados de las cortezas cerebrales</b> .....   | 96  |
| Incremento de los transcritos I y VI de BDNF así como de CREB y GR en corteza temporal de<br>pacientes con ELT .....                  | 96  |
| Antecedentes: .....   | 97  |
| Especificaciones metodológicas:.....  | 101 |
| Resultados.....   | 102 |
| Discusión: .....  | 106 |
| Literatura citada:.....   | 112 |
| <b>ANEXO 4: Material extra</b> .....  | 119 |
| Estancias.....  | 120 |
| Presentación de trabajo en reuniones, congresos nacionales e internacionales.....   | 121 |
| <b>Reconocimientos</b> .....  | 123 |

## Índice de figuras:

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Localización del Lóbulo Temporal en el cerebro.....   | 5  |
| Figura 2: Estructura del gen BDNF y los transcritos mejor caracterizados hasta el momento.....  | 14 |
| Figura 3: Localización preferencial de los 4 transcritos de BDNF mejor caracterizados hasta el momento en compartimentos neuronales particulares.(Modificado de Baj <i>et al.</i> , 2011). .... | 15 |
| Figura 4: Efecto del tiempo postmortem sobre la cantidad de ARN obtenido y la expresión de BDNF .....   | 27 |
| Figura 5: Cambio en la expresión de los genes endógenos GAPDH y TBP en corteza temporal pacientes con ELT y autopsias. ....   | 28 |
| Figura 6: Grafica que muestra la expresión de 4 transcritos de BDNF en hipocampo de pacientes con ELT en comparación con el grupo control. ....   | 35 |
| Figura 7: Grafica que muestra la expresión de 4 transcritos de BDNF en hipocampo de pacientes con ELT en relación a la presencia de EH y en comparación con el grupo control. ....              | 36 |
| Figura 8: Gráfica que muestra la expresión de 4 transcritos de BDNF en relación al uso de TPM antes de la cirugía en hipocampo de pacientes con ELT y en comparación con un grupo control. ..   | 37 |
| Figura 9: Gráfica que muestra la expresión de 4 transcritos de BDNF en relación al uso de SRT antes de la cirugía en hipocampo de pacientes con ELT y en comparación con un grupo control....   | 38 |
| Figura 10: Patrón de metilación del promotor 6 de BDNF. ....  | 39 |
| Figura 11: Primeras 5 CpGs después del sitio de inicio de la transcripción del promotor 6 del BDN, región que parece tener algunos problemas de transformación. ....                            | 40 |
| Figura 12: Regresión lineal de los resultados de metilación de los promotor 4 y 6 de BDNF en los análisis de piro-secuenciación con muestras estándares .....                                   | 41 |

Figura 13: Patrón de metilación promotor del exón 4 y del exón 6 de BDNF en los análisis de piro-  
secuenciación. .... 42

### Figuras Anexo 3

Figura I: Expresión de 4 transcritos de BDNF en corteza temporal de pacientes con ELT en  
comparación con el grupo control ..... 102

Figura II: Expresión de de CREB y GR en corteza temporal de pacientes con ELT en comparación  
con el grupo control ..... 103

Figura III: Expresión de 4 transcritos de BDNF en relación al uso de SRT antes de la cirugía en  
corteza de pacientes con ELT y en relación a un grupo control..... 104

Figura IV : Expresión de CREB y GR en relación al uso de SRT antes de la cirugía en hipocampo de  
pacientes con ELT y en relación a un grupo control ..... 105

## Índice de tablas:

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1: Variables clínicas asociadas a cambios en los niveles de proteína o ARNm en pacientes con<br>ELT ..... | 13 |
| Tabla 2: <i>Primers</i> utilizados para los experimentos de metilación .....                                    | 29 |
| Tabla 3: Características relevantes de las autopsias evaluadas en el presente estudio .....                     | 31 |
| Tabla 4: Datos clínicos de los pacientes evaluados en el presente estudio .....                                 | 32 |
| Tabla 5: Diferencias entre los pacientes con Esclerosis del Hipocampo y sin Esclerosis del<br>Hipocampo.....    | 34 |
| Tabla 6: Efecto del tratamiento farmacológico en relación a la expresión de 4 transcritos de BDNF               | 37 |

## Abreviaturas

CE: Crisis Epilépticas; ELT: Epilepsia del Lóbulo Temporal; EH: Esclerosis del Hipocampo; BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro; NT: Neurotrofina; SN: Sistema Nervioso; SE: Status Epilepticus; CEE: Crisis Epilépticas Espontáneas; ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero; NMDAR1A: Receptor N-Metil-d-asparato 1<sup>a</sup>; NMDAR2A/B: Receptor N-Metil-d-asparato 2<sup>a</sup>/B; FGF2: Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2; ADN: Ácido Desoxirribonucleico; KCl: Cloruro de Potasio; DNMT: ADN metil-transferasa; 5AzadC: 5-aza-citidina; INNMVS: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"; HADS: Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión; DSM-IV: Manual Diagnóstico Estadístico IV; SCID-I: Entrevista Clínica estructurada para los trastornos del eje I del DSM-IV; ECoG: Electroencefalografía; SEMEFO: Servicio Médico Forense; INPRF: Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente; TBP: Proteína de unión a cajas TATA; GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; CT: Ciclo Umbral; TPM: Topiramato; SRT: Sertralina; CREB: Proteína de Enlace de respuesta a Adenosin Monofosfato cíclico.

## Resumen

Estudios *in vitro* y en modelos animales sugieren que la función del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF, de sus siglas en inglés) se ve afectada en la epilepsia; sin embargo, existen muy pocas investigaciones que evalúen cómo se expresa esta neurotrofina en tejido cerebral de pacientes con este trastorno neurológico. En el presente trabajo se evaluó la expresión de los transcritos I, II, IV y VI de BDNF, así como la metilación de los promotores 4 y 6 en hipocampo de pacientes con Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT) fármacoresistente. La presencia de Esclerosis del hipocampo (EH) y el tratamiento farmacológico utilizado antes de la cirugía fueron considerados como variables independientes. Los resultados mostraron un incremento significativo del transcrito VI de BDNF ( $p \leq 0.05$ ) en hipocampo de pacientes con ELT al compararlo con los niveles de esta neurotrofina en un grupo control de autopsias (N=8). Los análisis con las variables clínicas mostraron una correlación positiva de este transcrito en pacientes con ELT que tenían comorbilidad con ansiedad/depresión y tomaron sertralina (SRT) como fármaco antidepresivo (N=3), al compararlo con pacientes que no presentaron esta comorbilidad y con el grupo control de autopsias ( $p \leq 0.05$ ). Por otro lado, en casos que utilizaron Topiramato (TPM) como fármaco anti-epiléptico (N=3) se detectó una disminución en la expresión del transcrito VI de BDNF al compararlo con pacientes que no utilizaron este fármaco ( $p \leq 0.05$ ). Los niveles de metilación de los promotores 4 y 6 de BDNF fueron similares tanto en casos con ELT como en el grupo control de autopsias y en relación al uso de SRT y TPM. Los resultados anteriores sugieren un incremento en la expresión de un transcrito particular de BDNF en pacientes con ELT, efecto que parece depender del uso de cierto tipo de fármacos.

## Abstract

A putative role of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in epilepsy has emerged from in vitro and animal models, but few studies have analyzed human samples. We assessed the BDNF expression of transcripts with exons I (BDNFI), II (BDNFII), IV (BDNFIV) and VI (BDNFVI) and methylation levels of promoters 4 and 6 in the hippocampi of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy (TLE) (n = 24). Hippocampal sclerosis (HS) and pre-surgical pharmacological treatment were considered as clinical independent variables. A statistical significant increase for the BDNFVI ( $p < 0.05$ ) was observed in TLE patients compared to the autopsy control group (n = 8). BDNFVI was also increased in anxiety/depression TLE (N =4) when compared to autopsies or to the remaining group of patients ( $p < 0.05$ ). In contrast, the use of the antiepileptic drug Topiramate (TPM) (N = 3) was associated to a decrease in BDNFVI expression ( $p < 0.05$ ) when compared to the remaining group of patients. Methylation levels at the BDNF promoters 4 and 6 were similar between TLE and autopsies and in relation to the use of either Sertraline (SRT) or TPM. These results suggest an up-regulated expression of a specific BDNF transcript in patients with TLE, an effect that seems to be dependent on the use of specific drugs.



## Descripción de la Tesis

El contenido de esta tesis se puede dividir en cinco partes:

La primera es el trabajo que realice para desarrollar mi trabajo de doctorado en el que se evaluó la expresión de los transcritos I, II, IV y VI de BDNF (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro) y la metilación de los promotores 4 y 6 en **hipocampo** de pacientes con Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT).

La segunda parte constituida en el Anexo 1 que contiene el artículo requisito para obtener el grado en el que se publicaron los principales resultados de la presente tesis.

El tercer apartado es el Anexo 2 en el que presento la publicación de una revisión sobre los mecanismos de regulación de la expresión BDNF en el sistema nervioso central, uno de los temas centrales de nuestro trabajo.

El cuarto apartado es el Anexo 3 en el que se añadieron los análisis de expresión de los 4 transcritos de BDNF, así como el de CREB (Elemento de Respuesta al AMPc) y GR (Receptor de Glucocorticoides) en **corteza** de pacientes con ELT, éste es el primer borrador de un siguiente trabajo que saldrá publicado como producto de esta trabajo.

Y el quinto apartado contenido en el Anexo 4 presenta información extra sobre las estancias, presentación del trabajo en congresos nacionales e internacionales y los reconocimientos que recibimos al desarrollar esta tesis.

## Antecedentes:

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más comunes (Engel *et al.*, 1997, Goldenberg, 2010) que afecta de forma considerable la vida social de aquellos que la presentan ya que estos sufren discriminación, lo que culmina en su aislamiento y exclusión (Lee, 2002). En México, se ha estimado una prevalencia de por vida de este trastorno del 1-2 % (Rubio-Donnadieu, 2011).

El diagnóstico de epilepsia se presenta cuando una persona sin una causa determinada muestra al menos dos Crisis Epilépticas (CE) espontáneas, las cuales se definen como descargas eléctricas sincronizadas que ocurren de forma crónica y recurrente (Kanner y Campos, 2004, Scharfman, 2007). En el año 2010 la Liga Internacional contra la Epilepsia, publicó su más reciente clasificación de las CE, en la que su división más amplia las cataloga en: 1) generalizadas, que se caracterizan por afectar bilateralmente al sistema nervioso central (SNC) y 2) parciales, las cuales afectan solamente un hemisferio cerebral (Berg *et al.*, 2010). Se ha reportado que de todos los pacientes que presentan CE, alrededor del 60% corresponden a casos de CE parciales, siendo la Epilepsia del Lóbulo temporal (ELT) el subtipo más común, representando al 70% de estos casos (Téllez-Zenteno y Hernández-Ronquillo, 2012), la ELT se caracteriza por la presencia crisis parciales simples o complejas (dependiendo de la pérdida o no de la consciencia), de crisis secundariamente generalizadas o de combinaciones de éstas (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989).

## Epilepsia del Lóbulo temporal:

La epilepsia temporal, en sí misma es un síndrome epiléptico, dentro del cual se incluyen crisis originadas en las estructuras mesial/basal o la neocorteza temporal lateral. El lóbulo temporal, que en ambos hemisferios cerebrales se sitúa por bajo el surco lateral o de Silvio y del lóbulo occipital (Figura 1), desempeña funciones importantes en la percepción y reconocimiento de estímulos auditivos y olfativos, de equilibrio, de coordinación, de memoria y de emociones. No es por ello extraño que en pacientes con ELT se presenten alucinaciones (visuales, olfativas y/o gustativas), sensación de emociones o recuerdos ya vividos y una emoción abrupta, intensa no relacionada con lo que está ocurriendo en el momento.

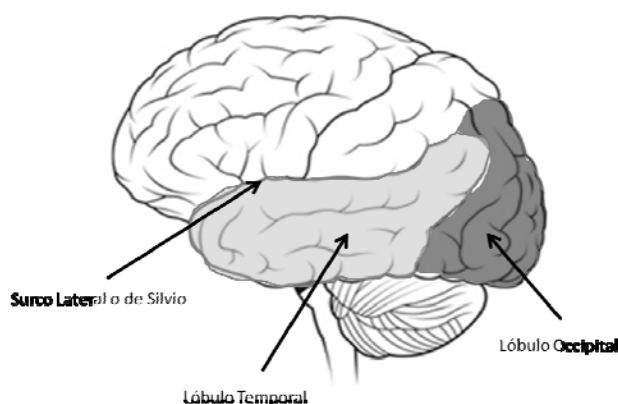


Figura1: Localización del Lóbulo Temporal en el cerebro

Se estima que aproximadamente 70% de los pacientes con ELT serán refractarios a tratamiento farmacológico (Kanner y Campos, 2004, Alonso-Venegas, 2011); lo que indica que estos individuos no dejarán de presentar las crisis a pesar de que hubiesen recibido al menos dos tratamientos farmacológicos antiepilépticos (ya sea mono terapia o combinación de drogas) en dosis óptimas que fueron seleccionados apropiadamente para el tipo de crisis que presenta el paciente y utilizadas por

el tiempo estipulado (Kwan et al., 2010). Es importante destacar que en estos casos se incrementa el costo económico, que en términos directos incluye los recursos consumidos en el sector salud, servicio social o del mismo paciente y su familia para prevenir, diagnosticar, tratar y rehabilitar al individuo con epilepsia, y de forma más indirecta incluye el costo que genera que estos pacientes no puedan trabajar, presenten una disminución en su productividad y trabajo en casa (Begley y Beghi, 2002, Regesta y Tangenelli, 1999).

La falta de respuesta a tratamiento farmacológico generalmente lleva a los neurólogos a recomendar como mejor opción terapéutica la resección del foco epileptogénico (Kelly and Chung, 2011). El tejido fresco obtenido de esta situación médico-quirúrgica resulta de trascendental importancia para el investigador biomédico, ya que puede ser procesada para su posterior análisis con la finalidad de identificar variables biológicas asociadas a la ELT y con ello intentar dilucidar los mecanismos fisiológicos afectados en estos pacientes.

Se estima que un 30% de los casos de ELT se asocian a lesiones como displasias corticales, tumores, malformaciones vasculares o infestaciones como la neuro-cisticercosis (Kanner y Campos, 2004, O'Brien *et al.*, 1997). Sin embargo, la lesión más común en los pacientes con ELT, presente en el 70% de los casos, es la denominada Esclerosis del Hipocampo (EH), que también representa a la anormalidad histopatológica más observada en adultos con fármaco-resistencia -90% de los casos- (Engel *et al.*, 1997, Kanner y Campos, 2004, Jardim *et al.*, 2012). Por otro lado, se han reportado déficits cognitivos relacionados con procesos de memoria y aprendizaje en pacientes con ELT (O'Brien *et al.*, 1997, Kanner y Campos, 2004), los cuales parecen agravarse en presencia de la EH (Marques *et al.*, 2007; Baxendale *et al.*, 2010). Asimismo, la presencia de EH se asocia a una mayor prevalencia de síntomas de ansiedad y depresión (Adda *et al.*, 2008, de Oliveira *et al.*, 2010).

En términos histológicos la EH se caracteriza por una pérdida segmental de las neuronas piramidales en el cuerno de amon's del sector CA1 (sector de Sommer's) CA3 y CA4 (sector de Bratz'z , región hilar o endofolium); sin embargo las neuronas piramidales de CA2 y las granulares del giro dentado son más resistentes a las crisis, la perdida neuronal esta invariablemente asociada con astrogliosis reactiva, el cual produce rigidez de tejido a lo cual se ha establecido tradicionalmente el término de Esclerosis del hasta de Ammon's (Blümcke *et al.*, 2012). Se ha investigado ampliamente en modelos animales y en tejidos resecados de pacientes con ELT cuál es el mecanismo de la selectiva vulnerabilidad neuronal (Blümcke *et al.*, 2000) y como está perdida neuronal contribuye para producir actividad convulsiva, tales mecanismos fisiopatológicos incluyen, entre otros el crecimiento aberrante de fibras musgosas (Sutula *et al.*, 1989), patrones de reorganización de células inhibitoras (De Felipe *et al.*, 1993) y una migración ectópica de las neuronas del giro dentado (Engel *et al.*, 1997, Bote *et al.*, 2008, Tudesco *et al.*, 2010).

La pérdida neuronal y el desbalance entre la actividad excitadora e inhibitora del tejido nervioso observados en pacientes con ELT (Scharfman, 2007), son mecanismos en los que podrían estar involucradas las denominadas neurotrofinas. Estas, son moléculas que regulan la sobrevivencia neuronal y la transmisión sináptica, por lo que se pueden considerar como blancos relevantes en la epileptogénesis, siendo el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF, de sus siglas en inglés) una de los moléculas candidatas más interesantes (Danzer y McNamara, 2004, Casillas-Espinosa *et al.*, 2012, McNamara y Sharfman, 2012), como se discutirá en el siguiente apartado.

## **Implicación del BDNF en la epilepsia:**

El BDNF, descrito por vez primera en 1982 por Barde y colaboradores, es miembro de la familia de proteínas de secreción de tamaño pequeño, conocidas como neurotrofinas (NTs), las cuales están involucradas en el desarrollo del Sistema Nervioso (SN) de los vertebrados (Binder y Scharfman, 2004, Chao *et al.*, 2006). Esta neurotrofina en particular también tiene una función importante en el cerebro adulto ya que participa en la formación del axón y en determinar el número y tamaño de las espinas dendríticas, siendo por tanto un elemento molecular importante en la regulación de la transmisión sináptica y la plasticidad cerebral (Alsina *et al.*, 2001, Lee y Son, 2009) que, como mencionamos anteriormente, se ven afectadas en pacientes con ELT (O'Brien *et al.*, 1997, Marques *et al.*, 2007; Baxendale *et al.*, 2010).

Varios estudios en modelos animales han evaluado la influencia de BDNF en el proceso epileptogénico (Croll *et al.*, 1999, Scharfman *et al.*, 1999, Reibel *et al.*, 2000, Xu *et al.*, 2004, Paradiso *et al.*, 2009, 2011), en estos modelos se destacan tres etapas: la fase aguda en la que los animales reciben insultos eléctricos o químicos que generan la aparición de CE; la fase de latencia, libre de crisis y la fase crónica que se caracteriza por la aparición de Crisis Epilépticas Espontáneas (CEE) (Löscher, 2002, Reddy y Kuruba, 2013, Kandratavicius *et al.*, 2014). Cabe subrayar, para los propósitos de la posterior discusión, que es hasta la aparición de las CEE cuando se simula el estado de epiléptico de los pacientes con ELT, en tanto que los estadios previos son más bien importantes para entender el proceso epileptogénico o para estudiar los mecanismos de inducción y detención de la actividad epiléptica, así como las alteraciones post-ictales (Löscher, 2002). **Es de destacarse además que la mayoría de los estudios que evalúan la influencia de BDNF en**

modelos animales de epilepsia, lo han hecho justamente en el proceso epileptogénico, con resultados contradictorios, y han reportado que en algunos casos esta molécula ejerce efectos pro-epileptogénicos, mientras que otros estudios han reportado efectos opuestos.

### **Efectos pro-epileptogénicos del BDNF:**

Existen varios trabajos que apoyan la hipótesis de que el BDNF funciona como un agente pro-epileptogénico; por ejemplo, en un ratón transgénico diseñado para expresar altas cantidades de BDNF, se observó un aumento en la severidad de las CE inducidas con ácido kaínico (Croll *et al.*, 1999). En un modelo de crisis convulsivas inducido por kindling, se observó una mayor sensibilidad a la estimulación eléctrica, mayor excitabilidad de las neuronas post-sinápticas y una mayor duración de las crisis, en ratas a las que se les inyectó BDNF vía intra-hipocámpal los días 1, 5 y 9 justo antes de inducir *kindling* (Xu *et al.*, 2004). De igual forma, la excitabilidad de células granulares del hipocampo de ratas que fueron previamente tratadas con pilocarpina para inducir el *Status Epilepticus* (SE), se incrementó al ser expuestas *in vitro* a una solución de 200ng/ml de BDNF; asimismo, este tratamiento también se asoció al crecimiento aberrante de las fibras musgosas (Scharfman *et al.*, 1999). El conjunto de estas evidencias sugieren que la severidad y el riesgo a desarrollar CE pudiesen estar relacionados con mecanismos regulados por BDNF, como la sobrevivencia, la maduración y la migración celular.

Por otro lado, existen evidencias experimentales que indican que durante el proceso epileptogénico se genera un incremento en los niveles de BDNF; por ejemplo, los niveles de Ácido Ribonucleico Mensajero (ARNm) derivado del gen BDNF se incrementaron en hipocampo 3 horas después de la administración vía intraperitoneal de ácido kaínico (Lee *et al.*, 1997) o de litio/pilocarpina (Mudò *et*

*al.*, 1996). De forma similar, se observó tanto un incremento de la proteína BDNF, como un crecimiento aberrante de las fibras musgosas de células granulares en cultivo organotípico de hipocampo de rata a las que se les indujo hiper-excitabilidad con picrotoxina; más aun, los autores de este estudio reportaron que esta última alteración no ocurrió cuando se bloqueó a la neurotrofina con un anticuerpo anti-BDNF (Koyama *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que el incremento de BDNF puede promover la aparición de algunos fenotipos histopatológicos asociados al desarrollo de la epilepsia.

Un dato importante a señalar es que el aumento en la excitabilidad neuronal asociada al incremento de BDNF en modelos animales, también se ha descrito en tejidos obtenidos de pacientes con ELT refractarios al tratamiento farmacológico. Por ejemplo, se reportó que en muestras de hipocampo humano, la administración *in vitro* de BDNF incrementó la amplitud y frecuencia de las corrientes post-sinápticas excitadoras (Zhu *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha reportado una co-localización de BDNF con los Receptores al N-Metil-d-aspartato 1A (NMDAR1A) y 2AB (NMDAR2A/B) en el componente neural de tejido de tumores glioneurales de pacientes con epilepsia (Aronica *et al.*, 2001), por lo que es posible indicar que en el tejido nervioso humano, la presencia de BDNF pudiera favorecer el incremento en la excitabilidad neuronal, e incrementar el riesgo de presentar CE a través de este mecanismo.

### **Efectos anti-epileptogénicos del BDNF:**

No obstante lo expuesto en el apartado anterior, es importante destacar que existen algunos estudios que por el contrario sustentan un efecto anti-epileptogénico para BDNF. Por ejemplo, se ha descrito que tras la aplicación de BDNF *in vitro* se observa un aumento en las corrientes



reguladas por receptores de GABA en membranas aisladas de corteza cerebral de pacientes con ELT y posteriormente trasplantadas en ovocitos de *Xenopus* (Palma *et al.*, 2005).

Asimismo, la administración continua de BDNF durante la inducción del kindling, inhibió el desarrollo de las CE agudas, (Xu *et al.*, 2004). En un modelo similar, se observó que la perfusión intra-hipocampal de BDNF por 7 días bloqueó el desarrollo de las CE, no sólo los días durante los que se perfundió esta neurotrofina, sino también por los siguientes 15 días (Larmet *et al.*, 1995). De igual forma, este mismo grupo de trabajo reportó que la administración intra-hipocampal de un oligonucleótido anti-sentido que redujo la expresión de BDNF, agravó las CE (Reibel *et al.*, 2000).

Finalmente, Paradiso y colaboradores en 2009 reportaron en ratas que la administración intra-hipocampal de un vector viral que incluía tanto al BDNF, como al factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), corrigió las alteraciones en la neurogénesis y la migración inadecuada de las neuronas a la capa granular del giro dentado ocasionada por la administración de litio-pilocarpina. Más aún, tanto el número de crisis por día como la severidad de estas disminuyó durante el periodo crónico (Paradiso *et al.*, 2009). Posteriormente estos mismos autores mostraron, en un modelo crónico de SE, que el crecimiento aberrante de las fibras musgosas se puede revertir con la administración de BDNF, efecto que también se asoció a la sobrevivencia de las células piramidales de CA1 y CA3 (Paradiso *et al.*, 2011). El conjunto de todos estos datos han llevado a estos autores a proponer que el BDNF no solamente reduce el riesgo a desarrollar CEE, sino que también evita la aparición de los cambios histológicos asociados a la ELT, por lo que se ha planteado que esta neurotrofina pudiese funcionar como un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de la epilepsia (Simonato y Zucchini, 2010).

Como se puede deducir de los dos apartados anteriores, existe una gran cantidad de información que sugiere que el BDNF tiene un papel relevante en la epilepsia, aunque no está claro si su acción se relaciona con un efecto anti o pro-epileptogénico. Asimismo, es consistente el incremento de BDNF en modelos animales de epilepsia, pero existen pocos estudios que evalúen como se encuentran los niveles de esta neurotrofina en el tejido epiléptico de pacientes con ELT.

### **Cambios en la expresión de BDNF en pacientes con ELT:**

Takahashi y colaboradores reportaron en 1999 un incremento en los niveles proteicos de BDNF (pero no de otras neurotrofinas como el Factor de Crecimiento Neural o la NT-3) en la corteza cerebral de pacientes con ELT respecto a muestras de autopsias de sujetos sin antecedentes de trastornos neurológicos; un resultado similar fue reportado recientemente en el hipocampo (Hou *et al.*, 2010), lo cual coincide con el aumento de ARNm de BDNF descrito por Murray y colaboradores (2000) en este mismo tejido. Los resultados anteriores sustentan que la ELT se asocia a un incremento en la expresión de BDNF. Más aún, y como se describe en la Tabla 1, también se ha reportado que otras variables clínicas presentes en pacientes con ELT como la EH, la frecuencia de las crisis, los años con epilepsia, la comorbilidad con depresión o incluso el tratamiento farmacológico utilizado por los pacientes antes de la cirugía pueden asociarse a cambios en la expresión de BDNF.

Todo lo anterior lleva a proponer que un aumento en los niveles del ARNm y posiblemente de la proteína BDNF se asocia a la presencia de ELT y que este efecto puede verse modificado por otras características clínicas comúnmente presentes en estos pacientes. Sin embargo, es importante destacar que la expresión génica del BDNF no se limita a un solo transcrito

(Pruunsild *et al.*, 2007) y como se discutirá en la siguiente sección, la expresión de los distintos ARNm de BDNF pudiera llegar a tener un efecto relevante en términos del proceso epileptogénico, lo que probablemente ayude a entender los efectos contrastantes de esta molécula (Tongiorgi *et al.*, 2006).

Tabla 1: Variables clínicas asociadas a cambios en los niveles de proteína o ARNm en pacientes con ELT

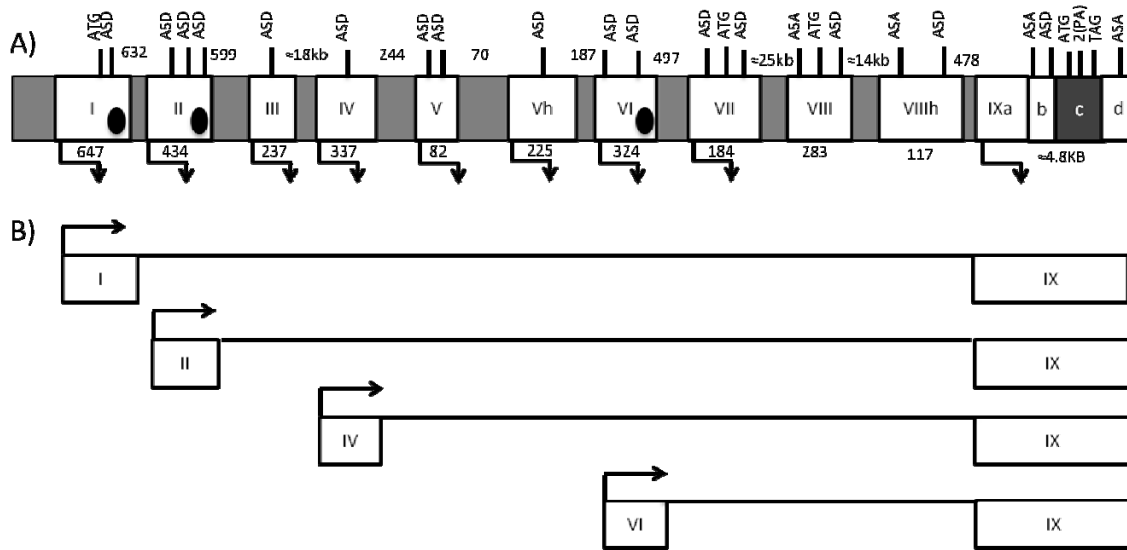
| Tejido                         | Variables  | Efecto                       | Autor, año                          |
|--------------------------------|--|------------------------------|-------------------------------------|
| Hipocampo de pacientes con ELT | Presencia <i>vs.</i> ausencia de EH                                    | Incremento ARNm BDNF         | Mathern <i>et al.</i> , 1997        |
| Hipocampo de pacientes con ELT | Tratamiento <i>in vitro</i> con ácido valproico                        | Incremento proteína BDNF     | Hou <i>et al.</i> , 2010            |
| Corteza de pacientes con ELT   | Comorbilidad con depresión   | Disminución proteína BDNF    | Kandratavicius <i>et al.</i> , 2013 |
| Corteza de pacientes con ELT   | Tratamiento con fluoxetina en pacientes con comorbilidad con depresión | Incremento proteína BDNF     | Kandratavicius <i>et al.</i> , 2013 |
| Suero de pacientes con ELT     | Frecuencia de las crisis y años con epilepsia                          | Disminución en proteína BDNF | Hong <i>et al.</i> , 2014           |

## Expresión diferencial de transcritos de BDNF y su relación con la epilepsia:

La estructura del gen que codifica para el BDNF (Chr 11p13) en el humano es sumamente compleja (ver Boulle *et al.*, 2011) (**Figura 2**). El último consenso indica que consta de 11 exones, 9 de los cuales presentan una región promotora específica, que en conjunto regulan la transcripción de por lo menos 17 ARNm distintos, y todos ellos codifican para una sola proteína madura (Pruunsild *et al.*, 2007), por lo que la disponibilidad final de esta molécula pudiese estar regulada por diferentes mecanismos de control de la traducción y/o estabilidad de los diversos ARNm (Cunha *et al.*, 2010, Ottem *et al.*, 2010).

En este sentido, se ha reportado que en la corteza visual y células hipotalámicas de roedores los transcritos sintetizados a partir de los exones I y IV se expresan predominantemente en el soma

neuronal, mientras que los transcritos sintetizados a partir de los exones II y VI tienen una localización somato-dendrítica -Figura 3- (Pattabiraman *et al.*, 2005, Aliaga *et al.*, 2009) y se ha propuesto que la expresión diferencial de estos ARNm dentro de la neurona (Baj *et al.*, 2011) puede explicar los efectos contrastantes de BDNF en la ELT.



Pruunsild *et al.*, 2007, Boulle *et al.*, 2011

**Figura 2: Estructura del gen BDNF y los transcritos mejor caracterizados hasta el momento.**

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

Cuando esta neurotrofina se encuentra cerca del cuerpo neuronal se ha asociado a funciones como la sobrevivencia celular (Tongiorgi *et al.*, 2006, Chiaruttini *et al.*, 2008), la maduración estructural del axón (Lowenstein y Arsenault, 1996, Danzer *et al.*, 2002, Mai *et al.*, 2009), la regulación de la

excitabilidad de las neuronas post-sinápticas (Altar y DiStefano, 1998, Dieni *et al.*, 2012) y la arborización dendrítica cerca del cuerpo neuronal, promoviendo contactos con las inter-neuronas inhibitorias GABAérgicas localizadas en esta zona (Baj *et al.*, 2011). Por otro lado, cuando BDNF se localiza en las regiones distales de las dendritas, se ha asociado a la activación de procesos de muerte neuronal por una mayor síntesis de proBDNF que de BDNF maduro (Tongiorgi *et al.*, 2004, Chiaruttini *et al.*, 2008) y/o con el desarrollo y proliferación de los contactos sinápticos activos en las regiones distales de las dendritas donde hay un mayor contacto con neuronas excitadoras (Tongiorgi *et al.*, 2006, Chiaruttini *et al.*, 2008), también se ha reportado que podrían ser importantes en la recuperación de la comunicación entre el Giro Dentado y la región CA3 del hipocampo (Baj *et al.*, 2012). Para una revisión más detallada del tema, ver Martínez-Levy y Cruz-Fuentes, 2014.

### LOCALIZACIÓN

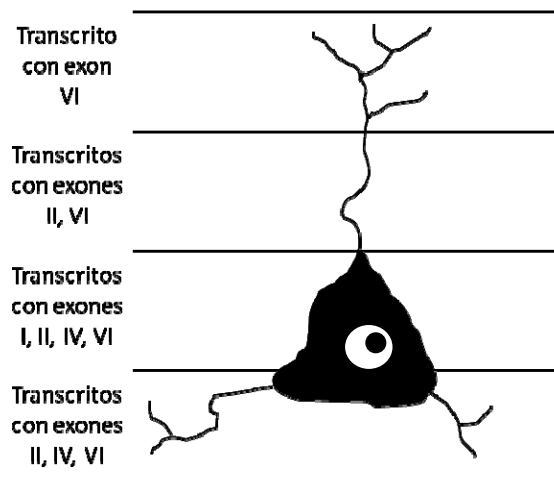


Figura 3: Localización preferencial de los 4 transcritos de BDNF mejor caracterizados hasta el momento en compartimentos neuronales particulares.(Modificado de Baj *et al.*, 2011).

Toda esta información, nos llevó a preguntarnos como se expresan estos transcritos en tejido epiléptico de pacientes con ELT. Cabe señalar que durante el periodo de preparación de esta tesis se publicó un estudio relevante por Wang y *cols.* (2011) quienes reportaron un incremento en la

expresión de los transcritos que contienen los exones II, IV y VI (pero no de los transcritos que contienen a los exones I, V y IX) en muestras de hipocampo de pacientes con EH en comparación con pacientes en los que la ELT se asoció a otro tipo de lesiones. Sin embargo, a la fecha **nadie ha evaluado la expresión de los 4 transcritos mejor caracterizados de BDNF (I, II, IV y VI) en tejido nervioso de pacientes con ELT en relación a un grupo control. Finalmente, la expresión de estos distintos ARNm puede estar regulada por mecanismos epigenéticos como la metilación del Ácido Desoxirribonucleico (ADN), como se discutirá en la siguiente sección.**

### **Metilación del gen BDNF y sus implicaciones en la epilepsia:**

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo a citosinas seguida de una guanina (CpG), en términos funcionales la unión de los grupos metilo puede inhibir la interacción del ADN con los factores de transcripción en estas secuencias, y por lo tanto afectar la expresión de los genes (Boulle et al., 2011). Es de desatacarse que estos cambios son dinámicos y reversibles.

Pocos estudios han evaluado la relación entre la metilación del ADN con la expresión del gen BDNF. Por ejemplo, se reportó que el tratamiento *in vitro* con 5-aza-citidina (5AzadC, un inhibidor de las DNMTs) indujo la expresión, hasta ese momento nula, de diversos transcritos de BDNF, cambio que fue dependiente del tipo celular al que se le aplicó el tratamiento ya que en células de neuroblastoma de ratón (línea celular Neuro2A) incrementó la expresión de los transcritos I, III, IV y V mientras que en células de glioma de rata (línea celular C6) incrementó la expresión de los transcritos I, III, IV, V, VI, VIII y IX (Aid *et al.*, 2007). Asimismo, en neuronas corticales de ratón, se ha encontrado que la despolarización de la membrana producida por cloruro de potasio (KCl) disminuyó los niveles de ARNm de las ADN metiltransferasas (DNMT)1 y 3A, enzimas encargadas de la metilación del ADN,

lo que se asoció con un incremento en los niveles de ARNm los transcritos con los exones I y IV de BDNF (Sharma *et al.*, 2008), **indicando que la expresión de diversos transcritos de esta neurotrofina puede estar regulada por mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN.**

Por otro lado, se ha reportado que el tratamiento con Zeburalina (otro inhibidor de las DNMTs) se asoció con una disminución en la metilación de promotor I de BDNF y un aumento en la expresión de este gen, teniendo como consecuencia el bloqueo del mecanismo fisiológico de potenciación a largo plazo, que se ve afectado en pacientes con epilepsia (Levenson *et al.*, 2006). Además, se ha reportado que la despolarización neuronal producida por KCl (Martinowich *et al.*, 2003), así como el proceso de consolidación de la memoria asociada al miedo (Lubin *et al.*, 2008), incrementó en la expresión del transcrito con el exón IV de BDNF asociado a una disminución en la metilación del promotor IV. **Los datos anteriores indican que cambios en promotores específicos de BDNF se asocian a cambios en la expresión de transcritos particulares de esta neurotrofina, además muestran que estas modificaciones están asociadas a mecanismos fisiológicos necesarios para la memoria y el aprendizaje, que se ven afectados en pacientes con ELT, por lo que podrían estar relacionados con el establecimiento de la enfermedad (Foti y Roskams, 2011).**

Finalmente algunos estudios en modelos animales han reportado que cambios en la metilación del gen BDNF se han asociado a la presencia de CE. Por ejemplo, en un estudio *in vitro*, la administración de picrotoxina (un inhibidor de los canales GABA<sub>A</sub>) incrementó la hiper-excitabilidad del hipocampo del ratón, lo que además se asoció a una des-metilación del promotor I de BDNF (Nelson *et al.*, 2008). Asimismo, en un modelo animal de epilepsia producido con kainato, se reportó un incremento en la expresión del transcrito con el exón IX de BDNF asociado a una disminución en la metilación del promotor IX de este gen **(Parrish *et al.*, 2013). Indicando que las crisis**

epilépticas pueden generar cambios en la expresión de BDNF a través de mecanismos de regulación epigenética, entre los que encontramos a la metilación del ADN, evento molecular que hasta el momento no ha sido evaluado en tejido humano.



## Justificación:

En el humano se ha reportado un incremento tanto de los niveles proteicos, como del ARNm de BDNF en hipocampo y corteza de pacientes con ELT. A partir de este gen se sintetizan múltiples transcritos, que tienen una localización y función distinta dentro de las neuronas, de forma tal que su expresión diferencial podría ayudar a explicar los efectos disímolos de BDNF en el proceso epileptogénico. Los transcritos de BDNF mejor caracterizados hasta el momento son los que contienen a los exones I, II, IV y VI, pero nadie ha evaluado como se expresan en el hipocampo de pacientes con ELT. Por otra parte, si bien se ha reportado previamente en modelos animales y estudios *in vitro* que el incremento en la expresión de transcritos específicos de BDNF se regula por la des-metilación de este gen; este efecto no ha sido evaluado hasta el momento en tejido epiléptico humano.

Es importante señalar que en este trabajo analizamos diversas variables clínicas como la presencia del EH, los años con epilepsia, la frecuencia de las crisis y el uso de diversos fármacos ya que como se mencionó anteriormente también pueden afectar la expresión de BDNF.

## Hipótesis

Se observará un incremento en la expresión de los 4 transcritos de BDNF analizados en las muestras de hipocampo de pacientes con ELT al compararlos con los resultados de los hipocampos obtenidos de autopsias.

Estos incrementos se asociarán a la disminución en la metilación de los promotores respectivos en el gen BDNF.

Los cambios en la expresión/metilación de BDNF también se verán modificados en relación a otras variables clínicas de interés como la EH, los años con epilepsia, el número de crisis al mes previo a la cirugía o el uso de fármacos específicos antes de la cirugía.

## Objetivos

Analizar en muestras de hipocampo humano el patrón de expresión de 4 transcritos de gen BDNF (I, II, IV y VI) y relacionar los datos obtenidos con el patrón de metilación de sus promotores.

### **Objetivos particulares:**

1. Comparar los niveles de expresión de los cuatro transcritos entre las muestras de pacientes con ELT vs. las obtenidas de autopsias.
2. Comparar patrón de metilación de los distintos promotores analizados entre las muestras de pacientes con ELT vs. las obtenidas de las autopsias.
3. Analizar la relación entre la expresión de los diferentes transcritos con el patrón de metilación de sus promotores específicos.

### **Objetivo secundario:**

Evaluar si diversas variables clínicas de interés como la presencia de EH, los años con crisis epilépticas y el número de crisis o el tratamiento farmacológico previo a la cirugía se relacionan con los cambios observados en los niveles de expresión de los diferentes transcritos y/o el patrón de metilación de sus promotores.

## Método

**Diseño:** Observacional, comparativo, transversal.

### **Evaluación y selección de los pacientes:**

Los sujetos que ingresaron a este protocolo son pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNNMVS). Se identificó a los pacientes con diagnóstico de ELT y refractarios a tratamiento farmacológico empleando los siguientes criterios:

### **Criterios de Inclusión**

1. Pacientes con diagnóstico de ELT
2. Candidatos a cirugía de epilepsia (lobectomía temporal) por motivo de fármaco-resistencia o por el tipo de lesión presente.
3. Tanto del sexo masculino como femenino.
4. Que supieran leer y escribir, con capacidad para cooperación adecuada, y coeficiente intelectual de 90 a 109.
5. Con valoración preoperatoria completa.

### **Criterios de Exclusión**

1. Padecimiento de enfermedades sistémicas graves que contraindiquen una neurocirugía mayor.
2. Pacientes con diagnóstico de enfermedad neurodegenerativa.
3. Falta de cooperación con el tratamiento.

4. Presencia de implantes, prótesis metálicas y claustrofobia.
5. Pacientes que no hayan sido valorados adecuadamente.

La Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión (HADS, de sus siglas en inglés) en su versión validada en español (Herrero *et al.*, 2003, Gómez-Arias *et al.*, 2012) fue utilizada para detectar la presencia de ansiedad y depresión en los pacientes; este diagnóstico fue confirmado con la entrevista clínica estructurada para los trastornos del eje I del Manual Diagnóstico Estadístico IV (DSM-IV) (SCID-I, de sus siglas en inglés), que detecta la presencia a lo largo de la vida y en el presente de los trastornos psiquiátricos, excluyendo a los trastornos de la personalidad y al retraso mental que se diganositcan con el eje II del DSM-IV (First *et al.*, 2002), esta entrevista fue aplicada por un psiquiatra ciego al diagnóstico de epilepsia.

Los datos de edad al momento de la cirugía, género, edad de inicio de las crisis, años con crisis epilépticas, factores precipitantes de la epilepsia, presencia de otros diagnósticos o enfermedades, tratamiento farmacológico y recuperación del paciente según la escala de Engel fueron obtenidos de la historia clínica de los pacientes, resguardada en el INNNMVS. De la misma manera, se obtuvo la información sobre la presencia de EH, estos datos fueron confirmados con las imágenes de Resonancia Magnética (RM), analizado por un experto en lectura de este tipo de estudios, los criterios usados para definirla están basados en una señal hiper-intensa y en la disminución en el tamaño del hipocampo que fueron observadas en la secuencia T2 de los estudios de RM (Resonador General Electric de 3 Teslas).

Las cirugías se llevaron a cabo entre Febrero de 2012 y Junio del 2013. En los pacientes con EH la cirugía se desarrolló utilizando el acercamiento trans-temporal T2 o T3 guiado por señales de

electrocorticografía (ECoG) obtenidos de la superficie cerebral (4 x 8 electrode-grid, Ad-Tech, Racine, WI), el procedimiento consistió en una amígdalo-hipocampectomía lateral que incluyó la microcirugía de la cabeza del cuerpo anterior del hipocampo, la amígdala, porciones del uncus y del giro para-hipocampal, seguida por la resección de un fragmento de corteza temporal según las necesidades quirúrgicas de cada caso (San Juan *et al.*, 2011). A los pacientes sin EH se les aplicó un procedimiento quirúrgico similar guiado por el ECoG; sin embargo, en estos casos la amígdalo-hipocampectomía se llevó a cabo extrayendo por completo la región donde se localizaba el tumor o la lesión. Es importante además destacar que para el presente estudio se utilizaron muestras del margen de la lesión, para evitar incluir zonas que contuvieran células alteradas por la lesión.

### **Obtención de la muestra de autopsias:**

Las muestras de los sujetos control que ingresaron a este protocolo fueron obtenidas en el Servicio Médico Forense (SEMEFO).

### **Criterios de Inclusión**

1. Individuos que fallecieron y fueron trasladados a la SEMEFO
2. Tanto del sexo masculino como femenino.

### **Criterios de Exclusión**

1. Individuos que fallecieron por una afección neurológica
2. Tiempo post-mortem mayor a 18 horas al momento de la obtención de la muestra.

## **Obtención de muestra genética**

### **Durante la cirugía**

En cada caso se obtuvo un segmento de alrededor de 1 cm<sup>2</sup> de hipocampo, el cual se sumergió en una solución Ringer con pH=7.2 y dietilpirocarbonato, esto último con el objetivo de evitar la degradación del ARN. El tejido se transportó en hielo al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente (INPRF) en donde las muestras fueron procesadas inmediatamente para extraer el ARN y el ADN.

### **Durante la autopsia**

Las muestras fueron congeladas a -70°C, inmediatamente después de la autopsia y almacenadas para la posterior extracción de los ácidos nucleicos en el INPRF.

## **Procedimiento experimental:**

### **Extracción de ácidos nucleicos:**

Para ello se homogenizaron 100 mg de tejido en 1ml de la Solución D que contiene tiocianato de guanidina +  $\beta$  mercaptoetanol, para favorecer la disgregación de los tejidos. Posteriormente el homogenizado se dividió en dos tubos Eppendorff: uno sirvió para la extracción de ADN con la técnica de fenol:cloroformo reportada en el Sambrook y Russell (2001), a la cual se le añadieron 2 lavados con etanol al 70% para tener el extracto limpio de sales; en tanto que el segundo tubo de 1.5 ml se utilizó para la extracción de ARN con la técnica reportada por Chomczynski y Sacchi (1987).

## **Análisis de expresión de ARNm:**

Debido a que los procedimientos para la obtención y almacenamiento de las muestras clínicas y de las muestras control no fueron necesariamente idénticas, decidimos realizar una serie de estudios para demostrar que los niveles de expresión de BDNF no fueron afectados de manera importante por estas variables. Por tal motivo evaluamos las variables de tiempo post-mortem y el efecto de la solución Ringer/DEPC con respecto a la congelación inmediata de las muestras. Para ello fueron sacrificadas 16 ratas Wistar adultas, cuyas cabezas fueron dejadas a temperatura ambiente por 0 (N=4), 4 (N=2), 8 (N=2), 16 (N=2) o 24 (N=2) horas. Después de estos intervalos de tiempo, las cortezas cerebrales fueron disecadas. Dos de las muestras con intervalo post-mortem de 0 horas fueron almacenadas por 2 horas en la solución Ringer/DEPC y el resto de las muestras fueron congeladas inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente se hizo la extracción de ARN y se evaluó la expresión de BDNF con respecto al gen endógeno GAPDH.

Se observó una disminución en la cantidad de ARN ( $F=5.11$   $p= 0.05$ ), pero no en la integridad ( $F=1.34$   $p \geq 0.05$ ) ni en los niveles de expresión de BDNF ( $F=2.01$   $p \geq 0.05$ ), con respecto al tiempo post-mortem (**Figura 4**) no se observó ningún efecto de la expresión de BDNF al comparar las muestras de 0 horas post-mortem almacenadas en la solución Ringer/DEPC al compararlas con las de 16 horas post-mortem congeladas ( $U=5.0$   $p \geq 0.05$ ). Estos resultados indican que los mecanismos de colección de muestra y el tiempo post-mortem no afectan nuestros resultados y por lo tanto podemos comparar estos grupos.



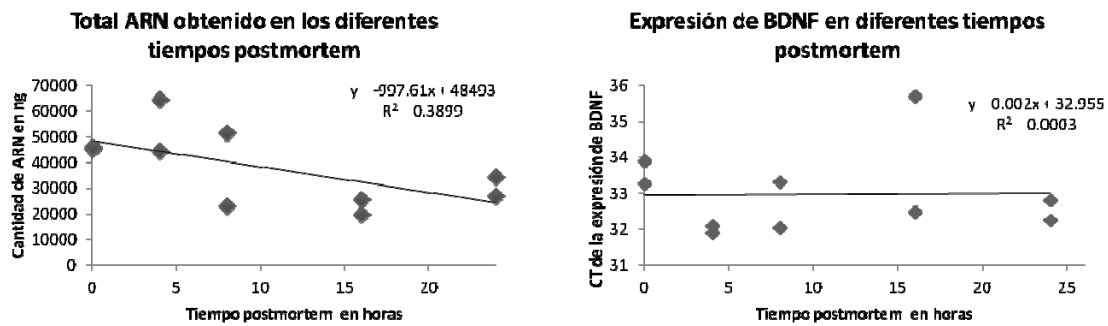


Figura 4: Efecto del tiempo postmortem sobre la cantidad de ARN obtenido y la expresión de BDNF

Fue necesario otro estudio piloto para definir que gen endógeno era el más adecuado para establecer el nivel de referencia de la expresión de nuestros transcritos experimentales. Se analizó tanto al gen TBP (proteína de unión a cajas TATA), como al que codifica para la enzima GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Cabe mencionar que si bien este último gen había sido utilizado como referente en los 3 estudios anteriores que habían analizado la expresión de BDNF en pacientes con ELT (Mathern *et al.*, 1997, Murray *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2011), otro reporte mostró en cambio que a diferencia del gen TBP, el GAPDH si incrementó sus niveles de expresión en relación a la variable patológica (i.e ELT) (Wierschke *et al.*, 2010). En este mismo sentido, se reportó que la administración de BDNF *in vitro* a cultivo primario de hipocampo de rata aumentó significativamente la expresión de GAPDH, mientras que en contraste los niveles de expresión de TBP se mantuvieron relativamente estables (Santos y Duarte, 2008). Finalmente, nuestros resultados mostraron que el valor del Ct (equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia) del gen GAPDH se incrementó en las muestras de casos (i.e. cortezas de pacientes con ELT) con respecto a los controles (i.e. autopsias) ( $t=2.4$   $gl= 27$   $p \leq 0.05^*$ ), lo cual no fue observado para el caso del gen TBP ( $U=93$   $n1=4$   $n2=24$   $p \geq$

0.05) (Figura 5). Estos datos en conjunto claramente muestran las virtudes de emplear al TBP como gen endógeno.

En consecuencia, se analizó la expresión de los transcritos por PCR en tiempo real con se las siguientes sondas Taqman: BDNF I-IX: hs00538277-m1, BDNF II-IX: hs00538278-m1, BDNF IV-IX: hs00380947-m1, BDNF VI-IX: hs00156058-m1 (Wong *et al.*, 2009, Wong *et al.*, 2010) y se utilizó el TBP como el gen de referencia.

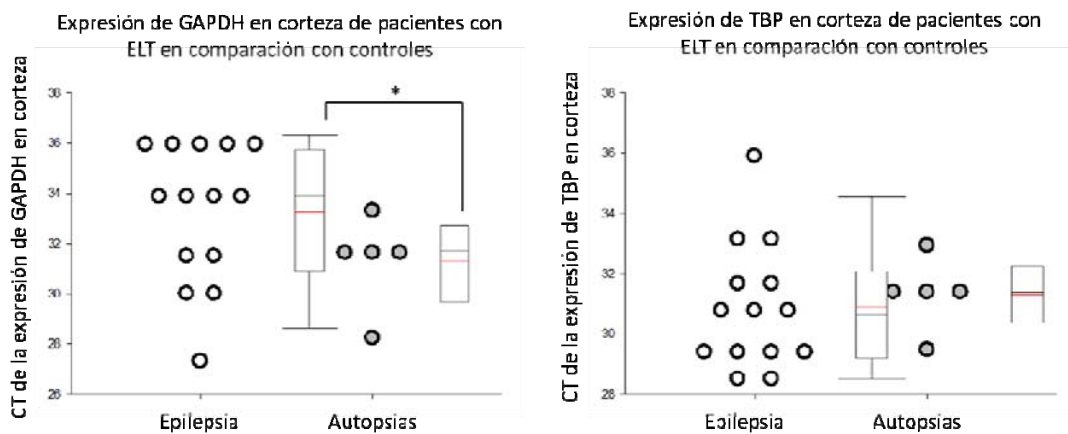


Figura 5: Cambio en la expresión de los genes endógenos GAPDH y TBP en corteza temporal pacientes con ELT y autopsias.

La prueba estadística utilizada fue una t de Student para muestras independientes. Los resultados muestran la Media  $\pm$  la Desviación Estándar. (\*) Muestran los efectos significativos con una  $p \leq 0.05$ .

## **Análisis epigenéticos:**

### ***Metilación por clonación y secuenciación:***

El ADN se transformó según lo reportado por Clark y colaboradores (2006). Las secuencias de nuestro interés se amplificaron con *primers* diseñados con el programa Methprimer (Tabla 2).

Se extrajo el amplicón del fragmento del gel de agarosa y se limpió con el *kit Qiaex II*. Posteriormente el DNA fue ligado a un vector con el kit PGEMTeasy de Promega y se hizo la transformación en células TOP10 termo-competentes. A continuación se extrajo el ADN con el kit *High pure plasmid isolation Kit* de Roche y las muestras fueron secuenciadas para su análisis.

Tabla 2: *Primers* utilizados para los experimentos de metilación

| Primers para clonación y secuenciación |  |
|--|--|
| BDNFII                                 | F: 5'-TAGGATGGTTTTGGTAAAGTTAT-3'; R: 5'-ACTTACCAAAAATCTATTCCAAC-3'   |
| BDNFVI                                 | F: 5'-GAGGAGGTGAGGATAGGTTT-3'; R: 5'-ATAAATATCTCATTAAAACCCCC-3'  |
| Primers para piro-secuenciación        |  |
| BDNF IV:                               | F: 5'-[Bln]TTTGGTTGGGGTTGGAAGTGAAAAT-3'; R:5'-CCCATCAACRAAAAACCTCCATTTAATCTC-3';<br>S: 5'-CAAAAAAATTTCATACTAA-3' |
| BDNFVI                                 | F:5' -GAGGAGGTGAGGATAGGTTT-3'; R:5'-[Bln]CTCATTAAAACCCCCRAACAAAAAATAA-3' ;<br>S:5'-AGTTTAATYAGAAGAGTTAAATAATG-3' |

### ***Cuantificación de metilación por piro-secuenciación:***

Se transformó un microgramo de ADN con el kit EpiTect 96 Bisulfite Kit según el protocolo establecido, se analizaron las 24 muestras de casos con ELT y las 4 muestras de autopsias. También transformamos estándares de ADN con porcentajes de metilación pre-establecidos (0%, 10%, 25%, 50%, 75% y 100%), lo que nos permitió corroborar que medimos adecuadamente esta variable.

Los *primers* utilizados para el promotor IV fueron aquellos previamente reportados por Keller y colaboradores (2010), mientras que para el promotor VI estos fueron los diseñados *ex profeso* con el *software* PyroMark Assay Design 2.0 de Qiagen (Tabla 2). Diez microlitros de cada producto de PCR (previamente "limpiados" de los nucleótidos no incorporados con el kit exo-SAP-IT de Qiagen), fueron analizados en el piro-secuenciador PSQ96 de Affimetrix.

## **Variables clínicas y análisis Estadístico**

Además del análisis primario de los datos de la expresión y metilación de distintos transcritos y promotores de BDNF, en este trabajo también analizamos información relevante de la historia clínica de cada paciente cómo frecuencia de crisis epilépticas, duración de la epilepsia, inicio del padecimiento, duración del tratamiento farmacológico, tipo de fármacos utilizados antes de la cirugía, antecedentes familiares y prenatales, presencia o ausencia de EH, etc.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software SPSS versión 20.0. Se utilizó un análisis de regresión para calcular si el porcentaje de metilación esperado era similar al observado y con ello se validaron los experimentos de piro-secuenciación.

En relación a las variables clínicas se hicieron pruebas de t para muestras independientes cuando se compararon casos con ELT *vs.* autopsias. Al realizar las comparaciones entre más de dos grupos se hizo ANOVA, utilizando la prueba post-hoc T3 de Dunnet. Cuando se compararon datos cuantitativos se hizo un análisis de regresión lineal.

## Resultados

### Características de la muestra:

Se colectaron muestras de hipocampo de 8 autopsias en la SEMEFO y de 24 pacientes con diagnóstico de ELT en el INNNMVS. La **Tabla 3** muestra datos relevantes con respecto a cada una de las autopsias, la edad promedio al momento del deceso de estos individuos fue de  $36.8 \pm 16.9$  años.

Tabla 3: Características relevantes de las autopsias evaluadas en el presente estudio

| Muestra | Genero    | Lateralidad de la resección | Edad (años) | Causa de muerte            | Tiempo post-mortem |
|---------|-----------|-----------------------------|-------------|----------------------------|--------------------|
| CH1     | Masculino | Derecha                     | 33          | Proyectil de arma de fuego | 8-10 horas         |
| CH2     | Masculino | Izquierda                   | 37          | Proyectil de arma de fuego | 2-5 horas          |
| CH3     | Masculino | Izquierda                   | 30          | Proyectil de arma de fuego | 10-12 horas        |
| CH4     | Masculino | Izquierda                   | 73          | Neumonía                   | 10-12 horas        |
| CH5     | Masculino | Izquierdo                   | 36          | Proyectil de arma de fuego | 10-12 horas        |
| CH6     | Femenino  | Izquierda                   | 22          | Trauma toraco-lumbar       | 10-12 horas        |
| CH7     | Femenino  | Izquierda                   | 18          | Asfixia                    | 12-14 horas        |
| CH8     | Masculino | Izquierda                   | 45          | Asfixia                    | 16-18 horas        |

Los datos clínicos y epidemiológicos importantes de cada uno de los pacientes con ELT se describen en la **Tabla 4**. En resumen, la edad fue de  $35 \pm 12.1$  años; la edad de inicio de las crisis epilépticas fue de  $14.6 \pm 10.7$  años; el tiempo desde que se presentó la primer crisis epiléptica fue de  $20.2 \pm 14.8$  años y el número de crisis en el mes previo a la cirugía fue de  $5.4 \pm 3.9$ . En relación al género 54.2% corresponden al género masculino, sin encontrarse diferencias significativas con respecto al grupo de autopsias ( $\chi^2=1.08$ ,  $p \geq 0.05$ ).

Tabla 4: Datos clínicos de los pacientes evaluados en el presente estudio

| Px  | Género | Edad | Edad de inicio epilepsia (años) | Duración epilepsia (años) | Número de crisis en un mes | Factores precipitantes | Fármacos utilizados antes de la cirugía | Otras drogas usadas previo a la cirugía | Lateralidad de la resección | ENGEL | Resultados RM        |
|-----|--------|------|---------------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------|---|---|-----------------------------|-------|----------------------|
| 367 | F      | 22   | 12                              | 10                        | 4                          | AHF, TCE, CF           | CBZ, LMG                                | -                                       | Derecha                     | P     | EH                   |
| 355 | M      | 60   | 8                               | 50                        | 2                          | TCE                    | AVP, CBZ, CNZ                           | RSP, BP                                 | Izquierda                   | 1     | EH                   |
| 392 | M      | 41   | 2                               | 39                        | 2                          | AHF, CF                | DFH, LMG, CBZ                           | SRT                                     | Izquierda                   | 1     | EH                   |
| 359 | F      | 33   | 22                              | 12                        | 3                          | CF                     | DFH, TPM, CBZ                           | -                                       | Izquierda                   | 1     | EH                   |
| 215 | M      | 19   | 1                               | 18                        | 10                         | AHF, HIPOXIA           | AVP, LMG, TPM, LVT                      | -                                       | Derecha                     | 1     | EH                   |
| 275 | F      | 23   | 13                              | 9                         | 1                          | AHF                    | CBZ, LVT                                | -                                       | Izquierda                   | 3     | EH                   |
| 289 | M      | 37   | 5                               | 31                        | 3                          | CF, TCE                | CBZ                                     | -                                       | Derecha                     | 1     | EH                   |
| 290 | F      | 24   | 1                               | 23                        | 5                          | TCE                    | AVP, CBZ                                | -                                       | Derecha                     | 1     | EH                   |
| 295 | M      | 43   | 27                              | 16                        | 8                          | -                      | AVP, PMD                                | -                                       | Derecha                     | 1     | EH                   |
| 301 | M      | 56   | 11                              | 45                        | 12                         | -                      | DFH                                     | -                                       | Derecha                     | 1     | EH                   |
| 283 | M      | 30   | 14                              | 16                        | 5                          | -                      | AVP, CBZ                                | -                                       | Izquierda                   | 1     | EH                   |
| 296 | F      | 38   | 30                              | 8                         | 4                          | -                      | AVP                                     | -                                       | Izquierda                   | 1     | EH                   |
| 286 | F      | 33   | 12                              | 21                        | 7                          | AHF                    | AVP, FNB                                | -                                       | Derecha                     | 1     | EH                   |
| 305 | F      | 21   | 14                              | 7                         | 4                          | AHF, TCE               | DFH                                     | -                                       | Izquierda                   | 1     | EH                   |
| 276 | M      | 54   | 13                              | 41                        | 15                         | AHF, TCE               | CBZ, LMG                                | -                                       | Derecha                     | 1     | EH                   |
| 293 | M      | 23   | 10                              | 13                        | 5                          | TCE                    | DFH, AVP                                | -                                       | Derecha                     | 1     | EH                   |
| 292 | F      | 42   | 4                               | 38                        | 10                         | -                      | CBZ, LMG                                | -                                       | Izquierda                   | 1     | EH                   |
| 282 | M      | 37   | 9                               | 28                        | 2                          | HIPOXIA                | AVP, CBZ                                | SRT                                     | Derecha                     | 1     | EH                   |
| 67  | F      | 27   | 27                              | 0.2                       | 2                          | TCE                    | TPM                                     | -                                       | Derecha                     | 1     | Cavernoma            |
| 106 | F      | 29   | 12                              | 17                        | 12                         | CF, TCE                | DFH, CBZ                                | -                                       | Izquierda                   | 1     | Oligoastrocitoma     |
| 207 | M      | 46   | 45                              | 0.5                       | 1                          | -                      | DFH                                     | DEX                                     | Derecha                     | P     | Glioblastoma         |
| 279 | F      | 18   | 14                              | 4                         | 6                          | -                      | DFH                                     | -                                       | Izquierda                   | 1     | Astrocitoma grado II |
| 309 | M      | 49   | 14                              | 35                        | 2                          | -                      | CBZ                                     | SRT                                     | Izquierda                   | 1     | Cisticercos          |
| 291 | M      | 34   | 30                              | 4                         | 4                          | -                      | CBZ                                     | SRT                                     | Izquierda                   | 1     | Displasia cortical   |

- CF: Crisis Febriles; TCE: Trauma craneo encefálico; AHF: Antecedentes heredo familiares, DFH: Fenitoína sódica; AVP: ácido valpróico; LMG Lamotrigina; TPM: Topiramato; LVT: Levetiracetam; CBZ: Carbamazepina; GBP: Gabapentina, PMD: Primidona; CNZ: Clonazepam. DEX: Dexametasona; SRT: Sertralina RSP: Risperidona; BP: Biperiden; EH: Esclerosis del hipocampo. ENGEL 1: LIBRE DE CRISIS INHABILITANTES; 2: CASI LIBRE DE CRISIS; 3: MEJORIA QUE HA VALIDO LA PENA.

La presencia o ausencia de EH en el paciente fue verificada por estudios de resonancia magnética (empleando el Resonador General Electric de 3 Teslas del INNMMVZ). De esta manera se pudo identificar que 18 de las muestras correspondieron a pacientes con ELT asociada a EH, en tanto que las otras 6 correspondieron a pacientes con ELT asociada a otro tipo de lesiones.

El 37.5% de los pacientes utilizaron un sólo fármaco antiepilépticos antes de la cirugía, mientras que 45.8% empleó dos fármacos y el 16.6% tres o más fármacos. De estos, el tratamiento más común fue la Carbamazepina utilizada por el 58.3 % de los pacientes, seguida por el Valproato 40.9%, la Fenitoína 33.3%, la Lamotrigina 20.8%, el Topiramato 12.5%, el Levetiracetam 8.3%, el Clonazepam 4.2% y la Primidona 4.2%. Finalmente 25% de los casos recibieron tratamiento farmacológico para tratar comorbilidades, de los cuáles 4 pacientes recibieron Sertralina para tratar síntomas de ansiedad y/o depresión.

En la evaluación post-operatoria realizada a un año de la cirugía, el 87.5% de los pacientes mostraron mejoría que se caracterizó por la desaparición de las CE, puntuando con la clase I según la escala de Engel, solo uno de los casos puntuó en la clase 3 de esta escala indicando una mejoría meritoria (hay intervalos prolongados libres de crisis observándose una reducción de más del 50% en el periodo de seguimiento, que no puede ser mayor a dos años).

En relación a la edad, el género y la lateralidad de la resección, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes que mostraron EH en relación a los que la epilepsia se asoció a otro tipo de lesiones. Solamente se identificó que los pacientes con EH tuvieron una edad de inicio de la enfermedad menor en comparación con los casos en los que la Epilepsia se asoció a otro tipo de lesiones (**Tabla 5**).

Tabla 5: Diferencias entre los pacientes con Esclerosis del Hipocampo y sin Esclerosis del Hipocampo

|                              |           | EH               | S/EH             | Estadística                      |
|------------------------------|-----------|------------------|------------------|----------------------------------|
| Edad                         |           | 35.44±12.56 años | 33.8±11.8 años   | t=-0.28 gl=22 p≥0.05             |
| Edad de inicio de las crisis |           | 13.05±8.57 años  | 23.58±12.7años   | t=-2.31 gl=22 p≤0.05*            |
| Duración de la epilepsia     |           | 22.27±15.56 años | 10.11±13.65 años | U=84 n1=6 n2=18 p≤0.05*          |
| Género                       | Femenino  | 50%              | 44.4%            | χ <sup>2</sup> =0.05 gl=1 p≥0.05 |
|                              | Masculino | 50%              | 55.6%            |                                  |
| Lateralidad de resección     | Derecha   | 50%              | 38.9%            | χ <sup>2</sup> =0.23 gl=1 p≥0.05 |
|                              | Izquierda | 50%              | 61.1%            |                                  |

\*EH: Esclerosis del Hipocampo S/EH: Sin Esclerosis del Hipocampo.  
Análisis estadísticos: t: te de student, U: U de Man Withney y χ<sup>2</sup>: Chi cuadrada.

### Análisis de expresión:

Se realizaron los análisis de expresión (ARNm) por PCR en tiempo real para los transcritos I, II, IV y VI de BDNF utilizando como gen endógeno a la Proteína de Unión a cajas TATA (TBP de sus siglas en inglés). Los datos fueron graficados de acuerdo a la fórmula  $2^{-\Delta CT}$ , donde  $\Delta CT = (CT \text{ del gen blanco} - CT \text{ del gen endógeno})$  e indica las tasa de cambio entre la expresión del gen endógeno y el gen blanco en una muestra particular. Para mostrar cuanto cambia la expresión de los distintos transcritos de BDNF entre los grupos de estudio (pacientes *vs.* autopsias o pacientes que usaron un tratamiento farmacológico *vs.* quienes no los utilizaron) se utilizo la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  como lo proponen Schmittgen y Livak (2008), donde  $\Delta\Delta CT = (\Delta CT \text{ del grupo de casos} - \Delta CT \text{ del grupo de controles})$ .

Los 4 transcritos de BDNF estudiados mostraron niveles de expresión cuantificables en todas las muestras analizadas, se observó que los transcritos de los exones I y IV mostraron los mayores niveles de expresión en las muestras tanto de casos como de autopsias (Figura 6).



Al comparar los casos de pacientes con ELT con respecto al grupo de autopsias, se observó un incremento en los niveles de expresión en los 4 transcritos en pacientes comparado con los controles; específicamente el transcrito del exón VI mostró un incremento significativo en la expresión de 2.0 veces con respecto al grupo de autopsias ( $t= 2.1, p\leq 0.05$ ) (Figura 6).

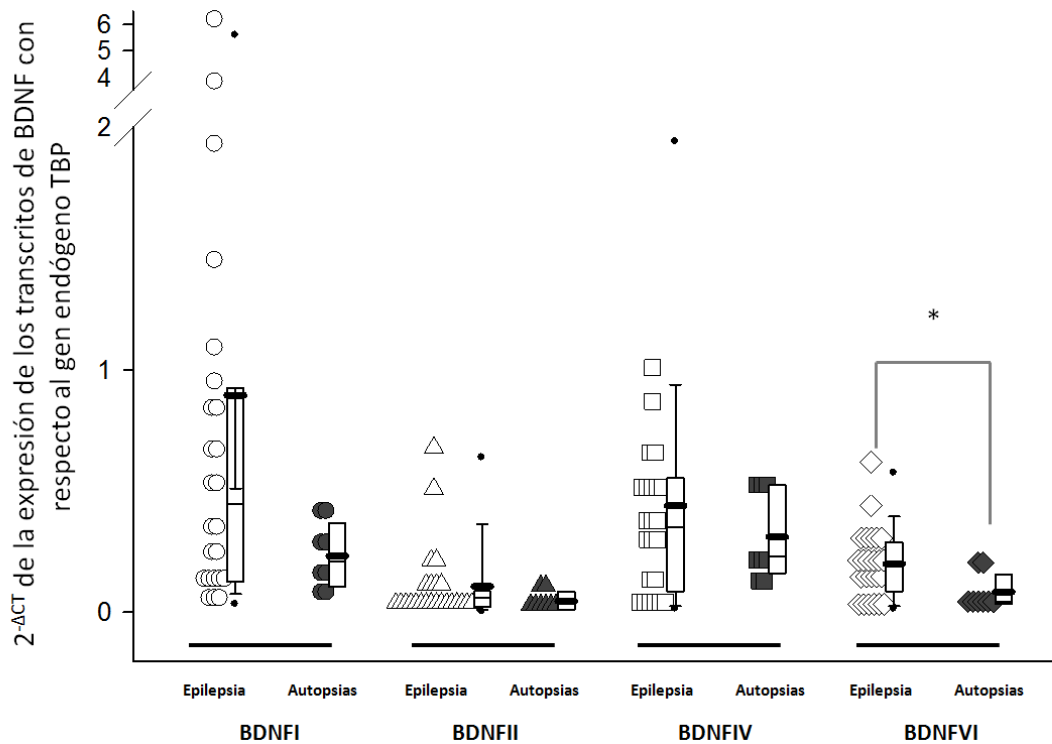


Figura 6: Grafica que muestra la expresión de 4 transcritos de BDNF en hipocampo de pacientes con ELT en comparación con el grupo control.

Las figuras (círculos, triángulos, cuadrado o rombos) blancas representan a los casos con epilepsia, mientras que las negras a las autopsias. Los círculos representan la expresión del transcrito del exón I de BDNF; los triángulos los del exón II, los cuadrados los del exón IV y los rombos los del exón VI. Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación estándar. (\*)  $p\leq 0.05$  t de Student para muestras independientes.

En relación a la presencia de EH, no observamos diferencias en la expresión de ninguno de los transcritos de BDNF analizados (Figura 7).

Con respecto al uso de tratamiento anti-epiléptico antes de la cirugía solamente encontramos que el Topiramato (TPM) influyó de forma negativa sobre la expresión del transcrito del exon VI con respecto al resto de los casos (0.25 veces,  $F = 5.16$   $p \leq 0.05$ ) y al grupo de autopsias (0.21 veces,  $F = 5.16$   $p \leq 0.05$ ); (Tabla 6, Figura 8). Asimismo, observamos una relación negativa entre la dosis de TPM usada antes de la cirugía con los niveles de expresión de este transcrito, resultado que si bien no fue significativo, si refleja una tendencia ( $F = 63.5$ ,  $R^2 = 0.97$ ,  $p = 0.07$ ). Dado el tamaño de las muestras analizadas, estos resultados deberán ser tomados con reserva y replicados en estudios dedicados a evaluar estas variables.

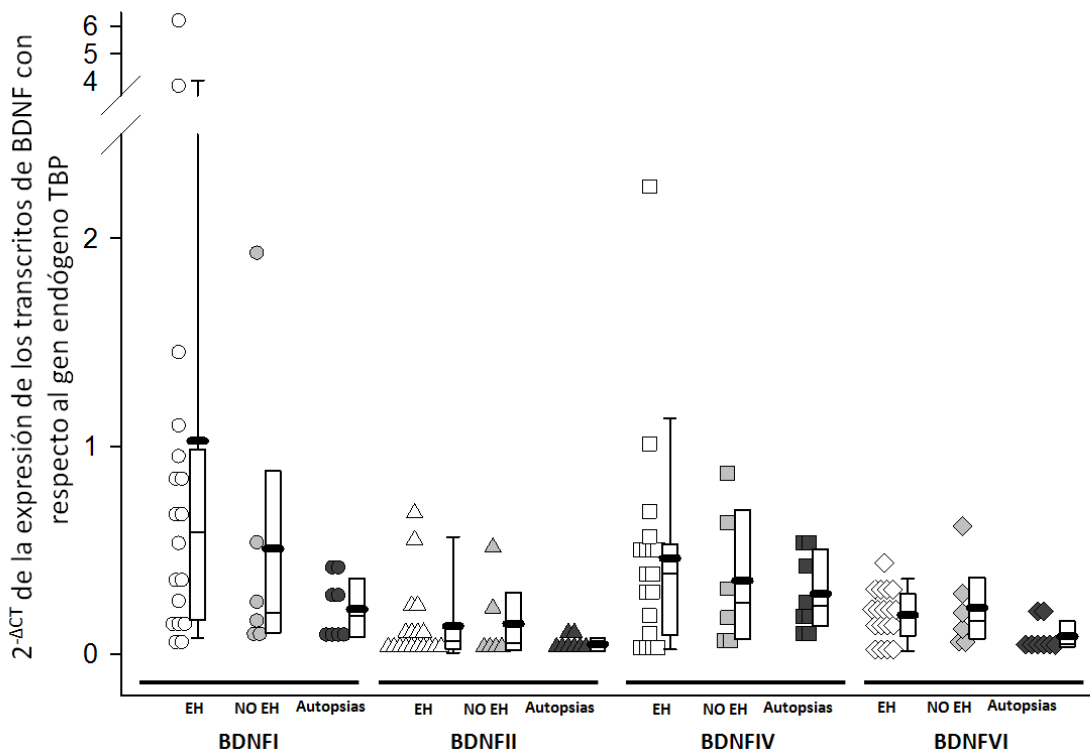


Figura 7: Grafica que muestra la expresión de 4 transcritos de BDNF en hipocampo de pacientes con ELT en relación a la presencia de EH y en comparación con el grupo control.

Las figuras (círculos, triángulos, cuadrado o rombos) blancas representan a los casos con epilepsia que presenta Esclerosis del Hipocampo (EH), mientras que las grises los casos con epilepsia que NO presentan Esclerosis del Hipocampo (NO EH) y las negras a las autopsias. Los círculos representan la expresión del transcrito del exon I de BDNF; los triángulos los del exon II, los cuadrados los del exon IV y los rombos los del exon VI. Las barras muestran la Media  $\pm$  la Desviación Estándar. (\*)  $p \leq 0.05$  ANOVA de una vía.

Tabla 6: Efecto del tratamiento farmacológico en relación a la expresión de 4 transcritos de BDNF

| Droga | Tamaño de muestra | BDNFI          | BDNFII         | BDNFIV         | BDNFVI          |
|-------|-------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| DFH   | 8                 | F=0.01 P≥ 0.05 | F=0.64 P≥ 0.05 | F=0.01 P≥ 0.05 | F=0.03 P≥ 0.05  |
| AVP   | 9                 | F=1.26 P≥ 0.05 | F=2.35 P≥ 0.05 | F=0.01 P≥ 0.05 | F=0.28 P≥ 0.05  |
| CBZ   | 14                | F=0.48 P≥ 0.05 | F=0.13 P≥ 0.05 | F=0.01 P≥ 0.05 | F=0.01 P≥ 0.05  |
| LMG   | 5                 | F=2.53 P≥ 0.05 | F=0.19 P≥ 0.05 | F=0.01 P≥ 0.05 | F=0.08 P≥ 0.05  |
| TPM   | 3                 | F=0.96 P≥ 0.05 | F=1.15 P≥ 0.05 | F=0.01 P≥ 0.05 | F=4.59 P≤ 0.05* |
| LVT   | 2                 | F=0.36 P≥ 0.05 | F=0.17 P≥ 0.05 | F=0.01 P≥ 0.05 | F=0.02 P≥ 0.05  |
| SRT   | 4                 | F=0.54 P≥ 0.05 | F=0.40 P≥ 0.05 | F=0.01 P≥ 0.05 | F=6.08 P≤ 0.05* |

DFH: Fenitoína sódica; AVP: ácido valproico; CBZ: Carbamacepina; LMG Lamotrigina; TPM: Topiramato; LVT: Leviacetram ; SRT: Sertralina. (\*) p≤0.05 ANOVA de una vía.

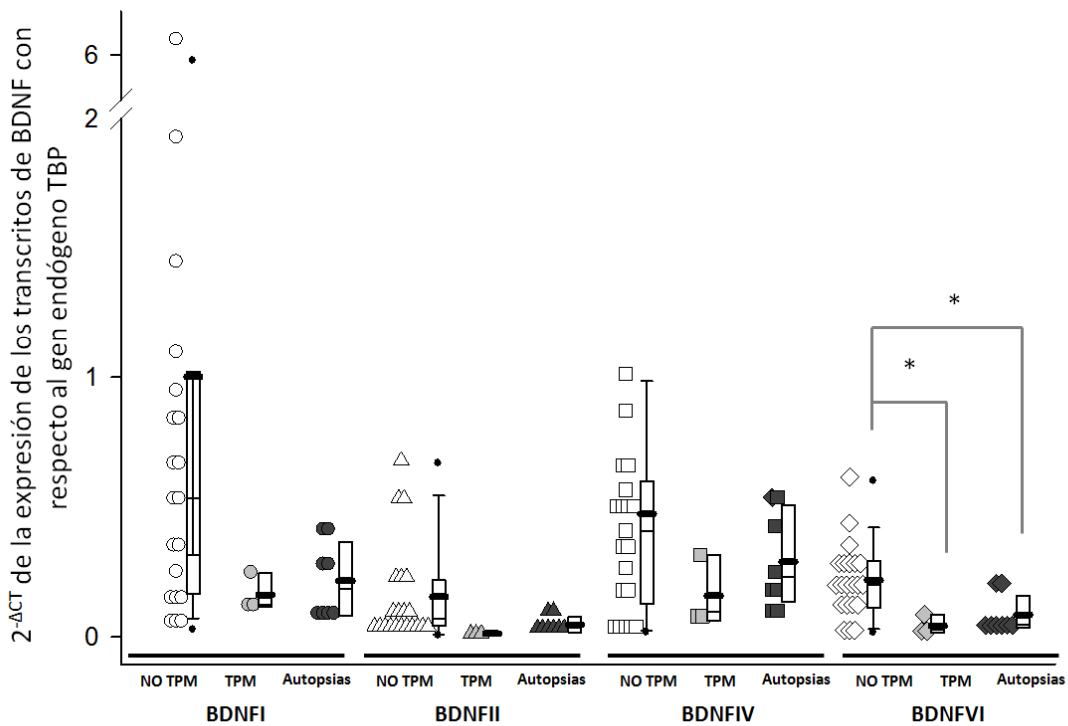


Figura 8: Gráfica que muestra la expresión de 4 transcritos de BDNF en relación al uso de TPM antes de la cirugía en hipocampo de pacientes con ELT y en comparación con un grupo control.

Las figuras (círculos, triángulos, cuadrado o rombos) blancas representan a los casos con epilepsia que NO usaron topiramato (NO TPM), mientras que las grises los casos con epilepsia que usaron topiramato (TPM) y las negras a las autopsias. Los círculos representan la expresión del transcrito del exon I de BDNF; los triángulos los del exon II, los cuadrados los del exon IV y los rombos los del exon VI. Las barras muestran la media ± la desviación estándar. (\*) p≤0.05 ANOVA de una vía.

Por otro lado, con respecto al uso de sertralina (SRT), utilizado para el tratamiento de síntomas depresivos y de ansiedad en el grupo de pacientes con ELT, se asoció a un incremento de 2.5 veces en la expresión del transcrito del exón VI en relación al resto de los casos y de 4.5 en relación al grupo de autopsias ( $F= 6.42, p\leq 0.05$ ) (Tabla 6, Figura 9).

Finalmente, no encontramos cambios en la expresión de los distintos transcritos de BDNF analizados en relación a la edad, el género, la edad en la que se reportó la primera crisis epiléptica, el número de crisis al mes antes de la cirugía y la lateralidad de la resección.

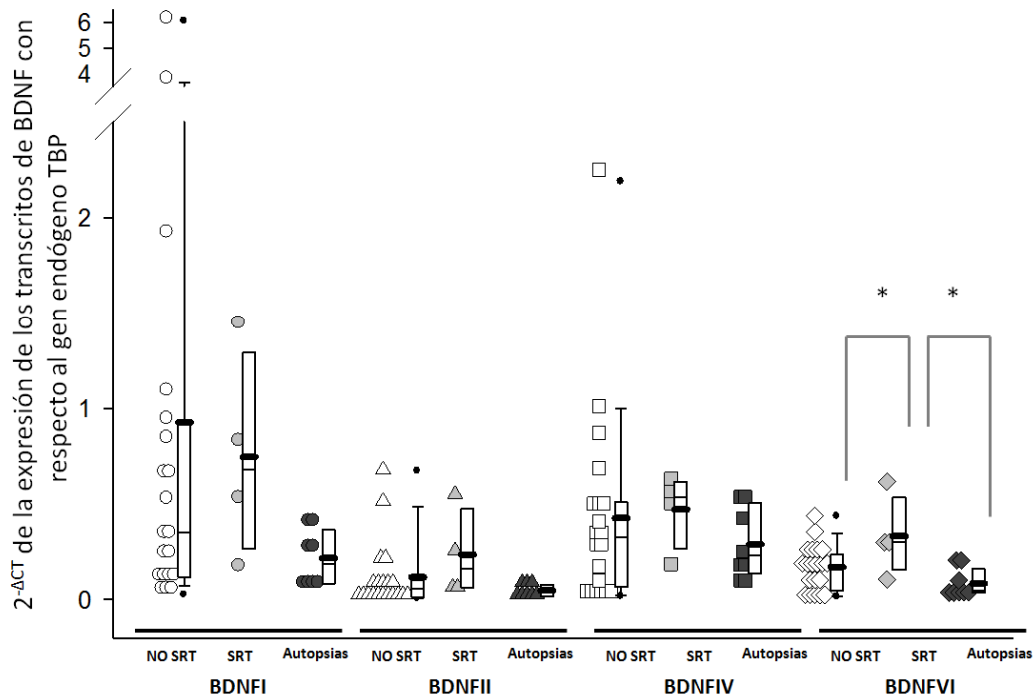


Figura 9: Gráfica que muestra la expresión de 4 transcritos de BDNF en relación al uso de SRT antes de la cirugía en hipocampo de pacientes con ELT y en comparación con un grupo control.

Las figuras (círculos, triángulos, cuadrado o rombos) blancas representan a los casos con epilepsia que NO usaron sertralina (NO SRT) mientras que las grises los casos con epilepsia que usaron sertralina (SRT) y las negras a las autopsias. Los círculos representan la expresión del transcrito del exón I de BDNF; los triángulos los del exón II, los cuadrados los del exón IV y los rombos los del exón VI. Las barras muestran la Media  $\pm$  la Desviación Estándar. (\*)  $p\leq 0.05$  ANOVA de una vía.

## Análisis de metilación por clonación y secuenciación:

No encontramos diferencias significativas al analizar 2 muestras de hipocampo de autopsias y 6 de casos con ELT, en relación al promotor 6 de BDNF con la técnica de clonación y secuenciación (Figura 10). Las primeras 5 CpGs localizadas justo después del sitio de inicio de la transcripción, parecen mostrar una región hipermetilada, aunque no se muestran diferencias entre los casos y las autopsias.

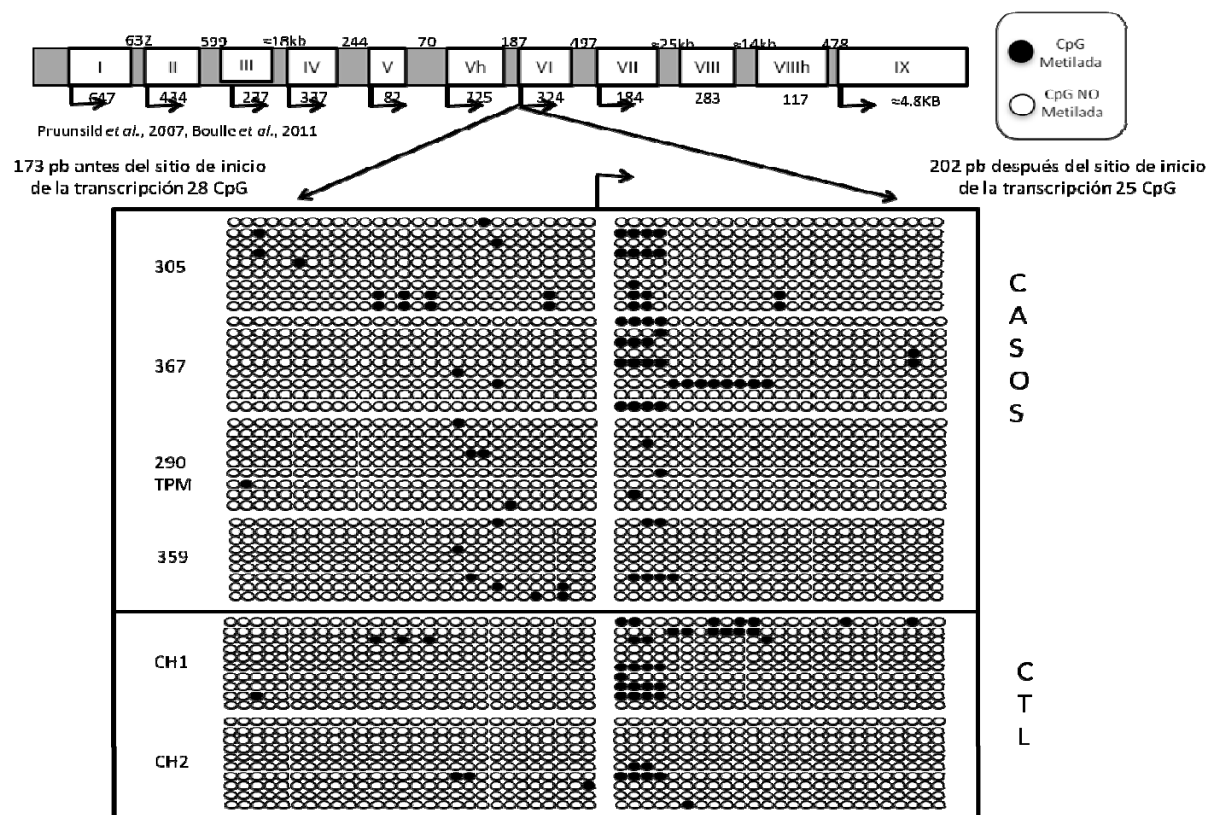


Figura 10: Patrón de metilación del promotor 6 de BDNF.

Se muestra el gen BDNF y la región que fue amplificada del promotor 6. Del lado izquierdo se representan las CpG antes del sitio de inicio de la transcripción y del lado derecho las CpGs después del sitio de inicio de la transcripción. Cada línea representa una clona amplificada y son alrededor de 10 clonas por muestras. Los puntos negros representan los CpG metilados y los blancos los no metilados

Es importante destacar, que la región hipermetilada podría representar un artefacto metodológico como consecuencia de un problema de la transformación con bisulfito de sodio. Cabe recordar que este tratamiento lo que genera es que todas las Citocinas (C) **NO** metiladas se conviertan en Uracilos (U), los cuáles se reflejarían como Timinas (T) al momento de obtener los resultados de secuenciación, mientras que las C metiladas, se mantienen como C. En la región analizada vemos la presencia de C que deberían haberse transformado a T, ya que no están seguidas de una G y por lo tanto no son susceptibles a estar metiladas (Figura 11). Lo anterior nos lleva a suponer que por alguna razón que desconocemos esta región del alrededor de 30 pares de bases no se logró transformar adecuadamente, por lo que consideramos sería importante analizarla con otra metodología.

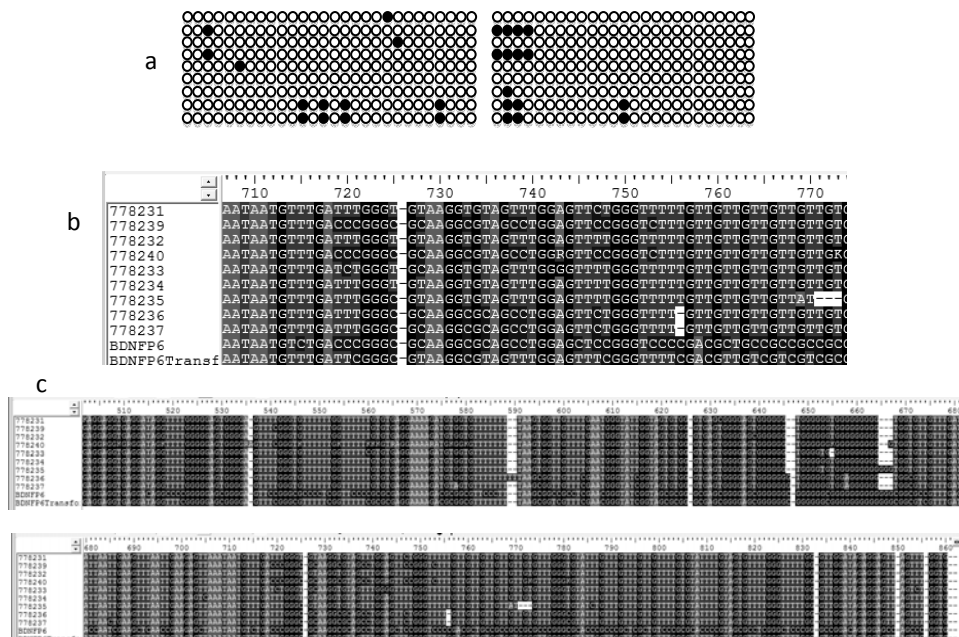


Figura 11: Primeras 5 CpGs después del sitio de inicio de la transcripción del promotor 6 del BDN, región que parece tener algunos problemas de transformación.

a) Resumen de los resultados b) Secuencia de la región localizada justo después del sitio de la transcripción que muestra que citocinas NO seguidas de una guanina se mantienen como C, indicando un problema de transformación. c) Se muestra toda la secuencia analizada, donde se evidencia que el problema solo se ve en la región justo después del sitio de inicio de la transcripción. \*BDNF6 es la secuencia de ADN no transformada y BDNF6 Transf. muestra que C son susceptibles de estar transformadas en T si no están metiladas.

## Análisis de metilación por piro-secuenciación:

En comparación con los resultados obtenidos con la técnica de clonación, en estos experimentos el protocolo de transformación con bisulfito de sodio fue realizado mediante una técnica distinta, en este caso se utilizó el *kit Epitech Bisulphite*, de Qiagen. Asimismo, se hizo un análisis con muestras de estándares que presentan diferentes niveles de metilación (0, 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100%), estas muestras fueron amplificadas para cada promotor y se analizaron con el piro-secuenciador. Una  $R^2$  mayor a 0.8 con  $p \leq 0.01$  se obtuvo al realizar una regresión lineal entre el porcentaje de metilación esperado y el obtenido (Figura 12), indicando que los niveles de metilación se están evaluando de forma correcta. Finalmente también es importante destacar que el piro-secuenciador tiene controles internos en el experimento que hacen evidente la presencia de Citocinas transformadas incorrectamente.

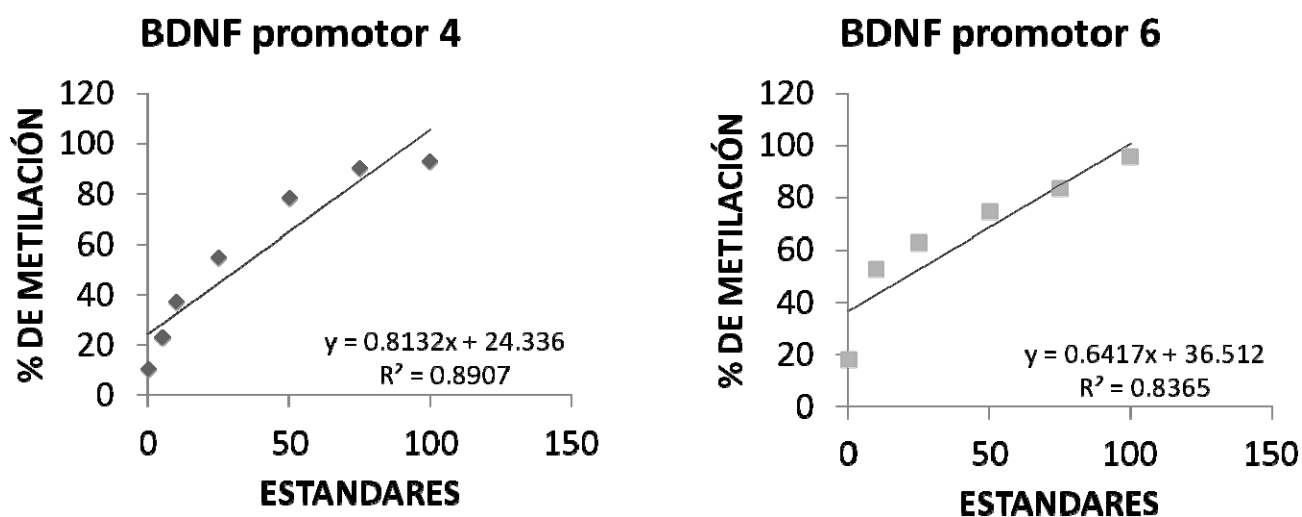


Figura 12: Regresión lineal de los resultados de metilación de los promotor 4 y 6 de BDNF en los análisis de piro-secuenciación con muestras estándares (0, 10, 25, 50, 75 y 100% de metilación).

Tanto en el promotor del exón VI como el exón IV encontramos que las primeras 5 CpGs localizadas justo después del sitio de inicio de las transcripción, se encuentra hipometiladas tanto en casos como autopsias, no encontrando diferencias significativas entre estos grupos de estudio (Figura 13) ni en relación a ninguna de las variables clínicas analizadas.

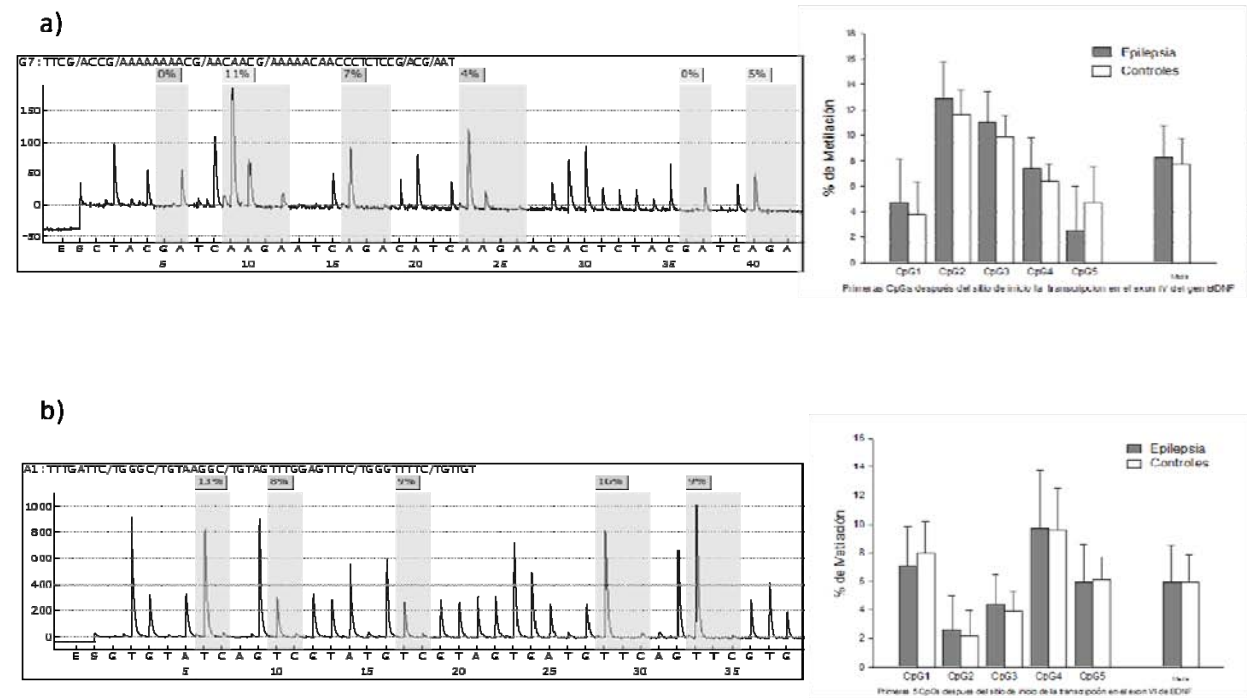


Figura 13: Patrón de metilación promotor del exón 4 y del exón 6 de BDNF en los análisis de piro-secuenciación.  
a) Promotor 4 de BDNF; b) Promotor 6 de BDNF.



## Discusión:

Este es el primer estudio que ha intentado contrastar los niveles de expresión de 4 transcritos de BDNF en hipocampo obtenido de pacientes con ELT con respecto a un grupo control de autopsias, así como en tratar de dilucidar si estos cambios están regulados por cambios en la metilación de sus promotores.

Lo anterior es de interés ya que además de sus efectos tróficos, el BDNF parece tener una participación importante en los mecanismos de remodelación sináptica que ocurren en respuesta a la actividad neuronal (Alsina *et al.*, 2001, Lee y Son, 2009) y que se han reportado afectados en la ELT (Binder, 2004). Lo anterior se sustenta en los trabajos que muestran un incremento en la expresión de esta neurotrofina en el hipocampo y la corteza de pacientes con ELT (Mathern *et al.*, 1997 y Murray *et al.*, 2001). Recientemente Tongiorgi y cols. (2006) han discutido que la regulación y expresión de los distintos transcritos de BDNF podría ser relevante para entender los efectos de esta molécula durante el proceso epileptogénico. Asimismo, se ha reportado que la expresión de los distintos transcritos de BDNF pudiesen estar regulados por mecanismos como la metilación de sus promotores (Aid *et al.*, 2007).

### **Datos clínicos y epidemiológicos de la muestra estudiada de pacientes con ELT:**

Los datos clínicos de la población de estudio mostraron que la edad y el número de años con crisis epilépticas fueron muy similares con lo reportado por los dos estudios previos que han evaluado la expresión de BDNF en pacientes con ELT (Mathern *et al.*, 1997 y Murray *et al.*, 2000).

Los tres medicamentos que utilizados con mayor frecuencia fueron: la Carbamazepina, el Valproato y la Fenitoína, y han sido reportados como los fármacos más comúnmente empleados para el tratamiento de las crisis parciales en pacientes con ELT (Consalvo *et al.*, 2005).

Asimismo, la comorbilidad más común en nuestra muestra de estudio es la presencia de depresión y/o ansiedad (Adda *et al.*, 2008, de Oliveira *et al.*, 2010); cabe señalar que la sertralina, un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina se ha reportado como un medicamento seguro y eficiente para la disminución de los síntomas depresivos, sin incrementar las crisis epilépticas (Kanner *et al.*, 2000, Thomé-Souza *et al.*, 2007), por lo que no resultó extraño que fuese este el medicamento más frecuentemente identificado en nuestros pacientes.

En relación con la EH, encontramos que los pacientes con esta lesión mostraron un mayor número de años con CE 22 *vs.* 10 años (U=84 p=0.04) y una edad de inicio de las CE significativamente menor 13 *vs.* 23 años (t= 2.31 p=0.03) al compararlos con pacientes en los que la epilepsia se asoció a otro tipo de lesiones (**Tabla 5**). Estos resultados son distintos a los reportados por Wang y colaboradores (2011) quienes muestran una duración en años de la epilepsia muy similar entre los casos con EH al compararlos con aquellos en los que la epilepsia se asocia con otro tipo de lesiones (13.3±5.4 *vs.* 14.9± 5.3), estos autores no describen que tipo de lesiones tenían los pacientes sin EH por lo que es difícil entender en que radica la diferencia. Sin embargo, es importante destacar que nuestros resultados coinciden con lo reportado previamente (Mathern *et al.*, 1997, Mathern *et al.*, 1995, Bad and Brown, 1987).

## **Cambios en la expresión de BDNF en pacientes con ELT**

El presente trabajo es el primero en evaluar la expresión de los 4 transcritos de BDNF mejor caracterizados en muestras de autopsias y de pacientes con ELT.

Cabe mencionar que al igual que Pruunsild y *cols.* (2007), encontramos que en las muestras de autopsias (que podrían ser consideradas como punto de referencia) los transcritos I y IV fueron los que mostraron los mayores niveles de expresión (**Figura 6**).

Aunque observamos un incremento en la expresión de todos los transcritos de BDNF en el grupo de casos con respecto a los controles, el único efecto que resulto significativo fue el aumento en los niveles de expresión del transcrito VI de BDNF en el hipocampo de pacientes con ELT con respecto a las obtenidas de autopsias (**Figura 6**). Estudios previos ya habían reportado un incremento de los niveles proteicos (Takahashi *et al.*, 1999, Hou *et al.*, 2010), así como también de la expresión del ARNm total (Mathern *et al.*, 1997, Murray *et al.*, 2000) del BDNF en una comparación similar. **En este sentido, nuestros resultados sugieren que el incremento en los niveles globales vistos en los estudios previos podría estar dado primordialmente por el incremento en la expresión de la variante BDNFVI.**

Cabe mencionar que hay pocos trabajos publicados en los que se haya evaluado la expresión del gen BDNF en modelos animales de epilepsia. En al menos dos de estos estudios se observó un incremento en la expresión (ARNm y proteína) de BDNF, en la etapa aguda (1-4 días) después de haberse inducido el *status epilepticus* por la administración de Pilocarpina o Ácido Kaínico; no obstante, dicha elevación se revirtió paulatinamente en el lapso de un mes hasta alcanzar los niveles

basales, coincidiendo con la presentación de crisis epilépticas espontáneas, lo que llevó a sugerir que BDNF pudiera jugar un papel relevante en el proceso epileptogénico, mas no en el tejido epiléptico (Shetty *et al.*, 2003, Tongiorgi *et al.*, 2004). Sin embargo, más recientemente se reportó que posterior a la administración de Ácido Káinico se mostró un incremento en la expresión de BDNF, efecto que se mantuvo en la etapa crónica (1-1.5 meses) después de haberse inducido el SE, indicando que esta neurotrofina también puede contribuir al mantenimiento de estado epiléptico (Heinrich *et al.*, 2011, Parrish *et al.*, 2013). Estos últimos datos son congruentes a lo que estamos reportando en el presente estudio.

Es importante destacar, que en los estudios descritos en el párrafo anterior no se evaluó que transcritos específicos fueron los que se veían incrementados, aunque Timmusk y cols. ya desde 1993 los habían descrito, no se sabía en ese entonces, si su regulación diferencial pudiera llegar a tener alguna implicación fisiológica, como se ha discutido en estudios más recientes (Pattarbiman *et al.*, 2005, Tongiorgi *et al.*, 2006, Chiarruttini *et al.*, 2008, Aliaga *et al.*, 2009, Baj *et al.*, 2011). En este sentido, un aspecto interesante de la organización del gen BDNF es la evidencia sustentada tanto por los análisis *in silico*, como por estudios *in vitro*, de que si bien existen diferentes transcritos, estos codifican para una misma proteína madura (Pruunsild *et al.*, 2007), lo cual en principio limita las posibilidades de entender las diferencias en sus efectos. **No obstante, los distintos transcritos parecen tener una localización particular dentro de la neurona y dependiendo del compartimento celular dentro del que se encuentren, ejercen efectos fisiológicos diferenciales, como se describe en la página 12, Figura 3 del presente trabajo (Martínez-Levy y Cruz-Fuentes, 2014).**

En particular el transcrito VI de BDNF se ha localizado en las regiones del árbol dendrítico alejadas del núcleo (**Figura 3**) tanto de neuronas del hipotálamo como de células piramidales del hipocampo y la corteza (Aid *et al.*, 2007, Chiaruttini *et al.*, 2008, Aliaga *et al.*, 2009). Asimismo, experimentos en cultivo de neuronas del hipocampo, muestran que el ARNm que contiene al exon VI de BDNF se traduce a la proteína madura en las dendritas (Baj *et al.*, 2011).

En relación con la epilepsia, Chiaruttini y colaboradores (2008) han discutido la posibilidad, de que el incremento en el transcrito VI de BDNF podría inducir la producción de pro-BDNF lo que a su vez se podría asociarse con la activación del receptor p75, el cual media procesos de muerte celular, y/o bien en la producción de un BDNF maduro que pudiese promover la formación de nuevas sinapsis excitadoras, presentes de forma más prominente en las dendritas distales, lo cual a su vez podría favorecer el proceso epileptogénico. Por otro lado, un estudio más reciente reportó un incremento en la expresión del transcrito del exon VI de BDNF en respuesta al tratamiento con antidepresivos y al ejercicio, lo que asoció con un aumento la formación de dendritas distales en la región CA3 del hipocampo, sugiriendo que esto podría implicar una recuperación de las conexiones con el giro dentado; asimismo, el incremento en la expresión de este transcrito se asoció con la activación del receptor TrkB promoviendo la sobrevivencia celular, implicando un efecto trófico de remodelación y recuperación del funcionamiento del hipocampo en este segundo modelo (Baj *et al.*, 2012).

Dado que en el presente estudio solamente se describe el incremento de este transcrito específico en el tejido afectado, no podemos saber si pudiera asociarse al proceso epileptogénico o alternativamente pudiese generar un mecanismo de recuperación del tejido como lo proponen Baj y cols. (2012). Sin embargo, dado las asociaciones que encontramos con otras variables clínicas

presentes en los casos con ELT, podríamos coincidir con alguna de estas hipótesis, como se discutirá más adelante en el presente trabajo

### **Cambios en la expresión de BDNF en relación a la presencia de EH:**

En contraste con un trabajo previo en el que se reportó un incremento en la expresión de los transcritos con los exones II, IV y VI en pacientes con EH (Wang *et al.*, 2011), en el presente estudio no encontramos ningún cambio en la expresión de los transcritos analizados al comparar pacientes con EH con aquellos en los que la epilepsia se asocia a otro tipo de lesiones (**Figura 7**). Nuestro hallazgo resulta, sin embargo, congruente con lo reportado previamente por Hou y *cols.* (2010), quienes no observaron diferencias al medir los niveles proteicos de BDNF en una comparación equivalente. Asimismo, se han reportado altos niveles proteicos de BDNF en tumores glioneurales de pacientes con epilepsia al compararlos con el grupo control de autopsias (Aronica *et al.*, 2001), indicando que BDNF parece incrementar en los pacientes con ELT y este efecto no es más evidente en relación con la presencia de EH.

Una explicación alternativa a la falta de similitud de resultados con respecto al artículo de Wang y *cols.* (2011) podría deberse al uso de diferentes genes de referencia en el procedimiento experimental, ya que mientras que el grupo de Wang uso al GAPDH, en el presente estudio usamos al TBP, que como se discutió en el apartado de metodología muestra características de expresión más adecuadas para ser empleado como control endógeno (**Figura 5**).

Sin bien la heterogeneidad clínica de la muestra analizada pudiera ser otra posible explicación (lo cual no fue analizada por Wang y *cols.* (2011), en el presente estudio encontramos que las variables de edad, el género, los años con epilepsia, la edad de inicio de la epilepsia, el número de crisis por

día y la lateralidad de la resección no afectaron los niveles de expresión de los 4 transcritos de BDNF analizados, sin embargo y como lo mencionaremos en el siguiente apartado el tratamiento farmacológico si influyó sobre la expresión del transcrito VI de BDNF.

### **Cambios en la expresión de BDNF en relación al uso de diversos tratamientos farmacológicos:**

Por otro lado, se ha reportado que diferentes medicamentos que se emplean de rutina en el tratamiento de síntomas asociados a la epilepsia como el Valproato, el Litio, la Fluoxetina, la Imipramina y el Topiramato, pueden incrementar o disminuir, según sea el caso, la expresión de BDNF (Castro *et al.*, 2005, Tsankova *et al.*, 2006, Onishchenko *et al.*, 2008, Hou *et al.*, 2010, Nishino *et al.*, 2012). En este sentido, recientemente se reportó una disminución en los niveles proteicos de BDNF cuando el hipocampo obtenido de pacientes con ELT farmacoresistentes, fue expuesto a una solución 0.3mM de Ácido Valpróico por un lapso de 3 horas (Hou *et al.*, 2010). Es de destacarse que este fármaco induce alteraciones hematológicas que incrementan el riesgo de sangrado durante la cirugía, por lo que de manera rutinaria es suspendido de una a dos semanas antes del procedimiento quirúrgico y esta podría ser la causa por la que no observamos ningún efecto con este tratamiento farmacológico en el presente estudio (**Tabla 6**).

El TPM fue el único fármaco anti-epiléptico que se asoció con una disminución en los niveles de expresión del transcrito de BDNF con el exón VI (**Tabla 6, Figura 8**), lo que a su vez de manera interesante, presentó una correlación negativa con el incremento en la dosis de droga utilizada; un resultado similar fue reportado por Shi *y cols.* (2010) quienes también mostraron una disminución dosis dependiente de los niveles de BDNF en el hipocampo de ratas sanas tratadas durante tres

semanas con TPM. Es importante destacar que independientemente del uso de TPM como tratamiento antiepiléptico, todos los pacientes fueron refractarios a algún tipo de tratamiento farmacológico; esto es, seguían presentando crisis epilépticas antes de la cirugía, por lo que la disminución en la expresión del transcrito VI de BDNF en este grupo particular nos llevan a proponer que los cambios que observamos probablemente no se deben a la presencia de las crisis.

Por otra parte observamos un incremento significativo en la expresión del transcrito del exon VI en relación al uso de SRT para tratar los síntomas de comorbilidad con ansiedad y depresión; (Tabla 6, Figura 9). En este sentido, se ha reportado que medicamentos que tienen como mecanismo de acción la inhibición de la recaptura de serotonina, como lo son la SRT y la Fluoxetina, incrementan la expresión de BDNF (Molendijk *et al.*, 2014, Hong *et al.*, 2014); este efecto ha sido recientemente replicado en pacientes que manifestaron ELT con comorbilidad con depresión, en quienes se notó un incremento en los niveles proteicos de BDNF en hipocampo, asociados al uso de fluoxetina (Kandratavicius *et al.*, 2013). El uso de inhibidores de la recaptura de serotonina se ha asociado a un incremento en los niveles de ARNm de BDNF, así como a un mejor desempeño en tareas cognitivas de memoria y aprendizaje (Gumuslu *et al.*, 2013), indicando que BDNF pudiera estar ayudando a mejorar estas tareas cognitivas en pacientes con ELT, tema que habrá que explorar en futuros estudios en modelos animales.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado un incrementó en la expresión de BDNFVI en respuesta tanto al uso de ciertos medicamentos empleados en el tratamiento contra la depresión, como al ejercicio en ratones; este efecto estimulante de la producción de esta neurotrofina podría proveer un soporte trófico local para la sobre-vivencia y diferenciación de los precursores



neuronales, así como la formación de nuevas dendritas y la ramificación axonal (Baj *et al.*, 2012). Todo lo anterior podría llevarnos a apoyar hipótesis de que el incremento de BDNFVI observado en el presente estudio, puede asociarse a un efecto trófico de remodelación y recuperación del funcionamiento del hipocampo.

Si bien este efecto pudiera llevar a considerar ciertas aplicaciones terapéuticas, no consideramos factible que la sola administración de BDNFVI pudiera ser suficiente para detener las CE, ya que como mencionamos anteriormente, la mayoría de estos pacientes tenían altos niveles de expresión de este transcrito y fueron refractarios a tratamiento farmacológico presentando CE antes de la cirugía. Probablemente y como lo proponen Simonato y Zucchini (2010), la administración conjunta de esta neurotrofina con otros factores tróficos pudiera ser más eficiente en el tratamiento de la epilepsia, estos autores proponen el uso tanto de-FGF2 como de BDNF.

### **Patrón de metilación de los promotores 6 y 4 de BDNF en pacientes con ELT:**

Los cambios en la expresión de genes pueden estar regulados por mecanismo epigenéticos como la metilación de sus promotores, siendo este el primer estudio en evaluar la metilación del promotor 6 de BDNF en tejido humano. El primer abordaje experimental que utilizamos fue a través de la metodología de clonación y secuenciación, en donde encontramos que el promotor estaba completamente des-metilado tanto en casos como controles (**Figura 10**).

Con los resultados de piro-secuenciación observamos la región que se localiza justo después del inicio de la transcripción también está completamente des-metilada tanto en el grupo control de autopsias como en los casos con ELT (**Figura 13**), indicando que esta marca epigenética no parece verse afectada por lo menos en la regiones de los promotores de BDNF analizados.

Dado que el incremento en el BDNFVI no se puede relacionar a la metilación de su promotor, entonces podríamos especular sobre otras alternativas. Por ejemplo, se ha observado en un modelo animal de epilepsia producido por kainato, se induce la separación del gen de la membrana nuclear hacia regiones más céntricas en el núcleo, efecto que se mantiene desde las 2 horas hasta las 4 semanas después de inducido el SE (Walczak *et al.*, 2013). Otro mecanismo pudiera relacionarse con la liberación de enzimas como la histona deacetilasa 1 o la proteína de unión a sitios metilados 2, lo que se ha asociado con un incremento en la excitabilidad neuronal producida por la estimulación de los NMDAR (Tian *et al.*, 2009). Asimismo, la sobre-expresión de la Proteína de Enlace de respuesta a Adenosin Monofosfato cíclico (CREB) fosforilado que se ha reportado en pacientes con ELT (Guo *et al.*, 2014) pudiera ser otro elemento importante para entender el incremento en la expresión de BDNF observada en el presente estudio.

## Limitaciones

El tamaño discreto de nuestra muestra representa una limitación importante, reduciendo el poder estadístico necesario y aumentando la posibilidad de generar errores tipo II. Esto fue particularmente importante en los casos en donde se analizaron las variables farmacológicas. Por todo esto será importante que otros investigadores repliquen estos resultados en muestras independientes con un mayor número de casos. Además, investigaciones futuras *in vitro* y en modelos animales son necesarias para identificar las implicaciones reales del cambio en la expresión del transcrito VI de BDNF, ya que la discusión previamente esgrimida es solamente una apuesta dirigida en base a nuestros resultados, pero no se ha demostrado si el incremento de BDNFVI en hipocampo de pacientes con ELT podría ayudar a mejorar el funcionamiento de esta estructura cerebral; además, los estudios previos que han evaluado los cambios en la expresión de distintos transcritos de BDNF en modelos animales lo han hecho posterior al SE y no en tejido epiléptico.

## Conclusiones

Estos resultados, indican que el incremento en la expresión de BDNF previamente reportado en otros estudios, podría estar dado por el aumento en la expresión del transcrito d el exón VI. Por los resultados observados en relación al uso de distintos tratamientos farmacológicos, podríamos proponer que este incremento está involucrado en intentar recuperar la organización funcional del hipocampo; sin embargo, no genera efectos suficiente para detener las CE, ya que algunos de estos pacientes que mostraron bajos niveles de BDNFVI son refractarios a tratamiento farmacológico. Falta investigación básica para poder corroborar esta hipótesis.

La metilación del promotor 6 de BDNF no parece ser un mecanismo molecular que ayude a explicar los cambios en la expresión este transcrito, por lo menos en las regiones analizadas, por lo que investigar otras marcas epigenéticas y otros mecanismos moleculares será de gran relevancia en el futuro.

## Literatura Citada

1. Adda CC, Castro LH, Além-Mar e Silva LC, de Manreza ML, Kashiara R.(2008) Prospective memory and mesial temporal epilepsy associated with hippocampal sclerosis. *Neuropsychologia* 46 (7): 1954-1964.
2. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007). Mouse and Rat BDNF structure and expression revisited. *Journal of Neuroscience Research* 85: 525-535.
3. Aliaga EE, Mendoza I, Tapia-Arancibia L. (2009) Distinct subcellular localization of BDNF transcripts in cultured hypothalamic neurons and modification by neuronal activation. *J Neural Transm.* 116(1):23-32.
4. Alonso-Vanegas MA (2011), Capítulo Tratamiento Quirúrgico de la Epilepsia de difícil control en Epilepsia, Editado por Rubio-Donnadieu F, Reséndiz-Aparicio JC, Alonso-Vanegas MA, Senties-Madrid H. Programa Prioritario de Epilepsia, 2da edición ISBN: 978-607-00-5132-6. Pp 199-225.
5. Alsina B, Vu T, Cohen-Cory S. (2001) Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nat Neurosci*; 4(11): 1093-101.
6. Altar CA, DiStefano PS. (1998). Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neurosci.* 21(10):433-7.
7. Aronica E, Leenstra S, Jansen GH, van Veelen CW, Yankaya B, Troost D. (2001). Expression of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor proteins in glioneuronal tumors from patients with intractable epilepsy: colocalization with N-methyl-D-aspartic acid receptor. *Acta Neuropathol.* 101(4):383-92.
8. Babb TL, Brown WJ (1987) Pathological findings in epilepsy in Surgical treatments of Epilepsy (Engel J Jr., ed) Raven New York, 511-540.

9. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1(5): 549-53.
10. Baj G, Leone E, Chao MV, Tongiorgi E. (2011). Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(40):16813-8.
11. Baj G, D'Alessandro V, Musazzi L, Mallei A, Sartori CR, Sciancalepore M, Tardito D, Langone F, Popoli M, Tongiorgi E. (2012). Physical exercise and antidepressants enhance BDNF targeting in hippocampal CA3 dendrites: further evidence of a spatial code for BDNF splice variants. *Neuropsychopharmacology.* 37(7):1600-11.
12. Baxendale S, Heaney D, Thompson PJ, Duncan JS. (2010). Cognitive consequences of childhood-onset temporal lobe epilepsy across the adult lifespan. *Neurology.* 75(8): 705-11.
13. Begley CE, Beghi E. (2002). The economic cost of epilepsy: a review of the literature. *Epilepsia.* 43 Suppl 4:3-9.
14. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia;* 51(4):676-85.
15. Binder DK. (2004). Chapter 3: The Role of BDNF in Epilepsy and Other Diseases of the Mature Nervous System, in *Recent Advances in Epilepsy Research*, edited by Devin K. Binder and Helen E. Scharfman. *Adv Exp Med Biol.* 548:34-56.
16. Binder DK, Scharfman HE. (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors.* 22(3):123-31.
17. Blümcke I, Suter B, Behle K, Kuhn R, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD. (2000). Loss of hilar mossy cells in Ammon's horn sclerosis. *Epilepsia.* 41 Suppl 6:S174-80.

18. Blümcke I, Coras R, Miyata H, Ozkara C. (2012). Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Pathol.* 22(3):402-11.
19. Bote RP, Blázquez-Llorca L, Fernández-Gil MA, Alonso-Nanclares L, Muñoz A, De Felipe J. (2008) Hippocampal sclerosis: histopathology substrate and magnetic resonance imaging. *Seminars in ultrasound, CT and MR.* 29(1): 2-14.
20. Boulle F, van den Hove DL, Jakob SB, Rutten BP, Hamon M, van Os J, Lesch KP, Lanfumeey L, Steinbusch HW, Kenis G. (2011) Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Mol Psychiatry.* 17(6):584-96
21. Casillas-Espinosa PM, Powell KL, O'Brien TJ. (2012) Regulators of synaptic transmission: roles in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Epilepsia.* 53 Suppl 9:41-58.
22. Castro LM, Gallant M, Niles LP. (2005) Novel targets for valproic acid: up-regulation of melatonin receptors and neurotrophic factors in C6 glioma cells. *J Neurochem;* 95(5):1227-36.
23. Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. (2006) DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nature Protocols.* 1(5): 2353-2364.
24. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989). Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes. *Epilepsia.* 30(4): 389-399.
1. Consalvo D, Thomson A, Saidón P, (2005) Guías para el tratamiento farmacológico de la epilepsia en adultos. *Revista Nerol. Argentina,* 30: 17-24.
2. Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS, Scharfman HE. (1999) Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience.* 93(4):1491-506.

3. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL (2010). A simple role for BDNF in learning and memory. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 3: 1-14.
4. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. (2006) Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)*. 110(2):167-73.
5. Chiaruttini C, Sonogo M, Baj G, Simonato M, Tongiorgi E. (2008) BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Mol Cell Neurosci*.; 37(1): 11-9.
6. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate –phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162(1): 156-159.
7. Danzer SC, Crooks KR, Lo DC, McNamara JO. (2002). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor induces formation of basal dendrites and axonal branching in dentate granule cells in hippocampal explant cultures. *J Neurosci*; 22(22): 9754-63.
8. Danzer SC, McNamara JO. (2004) Localization of brain-derived neurotrophic factor to distinct terminals of mossy fiber axons implies regulation of both excitation and feedforward inhibition of CA3 pyramidal cells. *J Neurosci*; 24(50):11346-55.
9. DeFelipe J, Garcia Sola R, Marco P, del Río MR, Pulido P, Ramón y Cajal S. (1993). Selective changes in the microorganization of the human epileptogenic neocortex revealed by parvalbumin immunoreactivity. *Cereb Cortex*. 3(1):39-48.
10. Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde YA. (2012). BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol*. 196(6):775-88.
11. de Oliveira GN, Kummer A, Salgado JV, Portela EJ, Sousa-Pereira SR, David AS, Teixeira AL. (2010). Psychiatric disorders in temporal lobe epilepsy: an overview from a tertiary service in Brazil. *Seizure*. 19(8):479-484



12. Engel J, Williamson PD, Wieser H-G (1997). Chapter 231: Mesial Temporal Lobe Epilepsy in *Epilepsy: A comprehensive text book* edited by Engel J., Pedley TA. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 2417-2424.
13. Foti SB, A. Roskams J (2011). A Tale of Two Epiphenomena: The Complex Interplay of Epigenetics and Epilepsy, In *Underlying Mechanisms of Epilepsy*, Edited by Prof. Fatima Shad Kaneez, ISBN: 978-953-307-765-9, InTech, DOI: 10.5772/24529. Available from: <http://www.intechopen.com/books/underlying-mechanisms-of-epilepsy/a-tale-of-two-epiphenomena-the-complex-interplay-of-epigenetics-and-epilepsy>.
14. First Michael B., Spitzer, Robert L, Gibbon Miriam, and Williams, Janet B.W (2002) *Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Research Version, Patient Edition. (SCID-I/P)* New York: Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute.
15. Goldenberg MM (2010) Overview of Drugs used for Epilepsy and Seizures. *P&T: a-peer reviewed journal for formulary management*. 35(7): 392-415.
16. Gómez-Arias B, Crail-Meléndez D, López-Zapata R, Martínez-Juárez IE (2012) Severity of anxiety and depression are related to a higher perception of adverse effects of antiepileptic drugs. *Seizure*. 21: 588-94.
17. Gumuslu E, Mutlu O, Sunnetci D, Ulak G, Celikyurt IK, Cine N, Akar F. (2013) The effects of tianeptine, olanzapine and fluoxetine on the cognitive behaviors of unpredictable chronic mild stress-exposed mice. *Drug Res (Stuttg)*; 63(10):532-9.
18. Guo J, Wang H, Wang Q, Chen Y, Chen S. (2014) Expression of p-CREB and activity-dependent miR-132 in temporal lobe epilepsy. *Int J Clin Exp Med*. 7: 1297-306.
19. Heinrich C, Lähtinen S, Suzuki F, Anne-Marie L, Huber S, Häussler U, Haas C, Larmet Y, Castren E, Depaulis A. (2011) Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes

- epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*; 42(1):35-47.
20. Herrero MJ, Blanch J, Peri JM, De Pablo J, Pintor L, Bulbena A. (2003) A validation study of the hospital anxiety and depression scale (HADS) in a Spanish population. *Gen Hosp Psychiatry*. 25: 277-83.
21. Hong Z, Li W, Qu B, Zou X, Chen J, Sander JW, Zhou D. (2014) Serum brain-derived neurotrophic factor levels in epilepsy. *Eur J Neurol*; 21(1):57-64.
22. Hou X, Wang X, Zhang L (2010) Conditional downregulation of brain derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B blocks epileptogenesis in the human temporal lobe epilepsy hippocampus. *Neurology India* 58(1): 29-34.
23. Jardim AP, Neves RS, Caboclo LO, Lancellotti CL, Marinho MM, Centeno RS, Cavalheiro EA, Scorza CA, Yacubian EM.(2012) Temporal lobe epilepsy with mesial temporal sclerosis: hippocampal neuronal loss as a predictor of surgical outcome. *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 70(5):319-324.
24. Kandravicius L, Monteiro MR, Assirati JA Jr, Carlotti CG Jr, Hallak JE, Leite JP. (2013) Neurotrophins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities. *J Neuropathol Exp Neurol*; 72(11):1029-42.
25. Kandravicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior LS, Leite JP. (2014) Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*; 10:1693-705.
26. Kanner AM, Kozak AM, Frey M. (2000). The Use of Sertraline in Patients with Epilepsy: Is It Safe? *Epilepsy Behav*; 1(2):100-105.
27. Kanner A, Campos M. (2004) Epilepsia del lóbulo temporal. En: Campos M, Kanner A. *Epilepsias diagnóstico y tratamiento*. Santiago, Mediterráneo: pp 252-268.

28. Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, Videtic A, Ferraro A, Carli V, Sacchetti S, Lembo F, Angiolillo A, Jovanovic N, Pisanti F, Tomaiuolo R, Monticelli A, Balazic J, Roy A, Marusic A, Cocozza S, Fusco A, Bruni CB, Castaldo G, Chiariotti L. (2010) Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*; 67(3):258-67.
29. Kelly KM, Chung SS. (2011). Surgical treatment for refractory epilepsy: review of patient evaluation and surgical options. *Epilepsy Res Treat*. 303624.
30. Koyama R, Yamada MK, Fujisawa S, Katoh-Semba R, Matsuki N, Ikegaya Y.(2004). Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus. *J Neurosci*. 24(33):7215-24.
31. Koyama R, Ikegaya Y (2005) To BDNF or not BDNF: That is the epileptic Hippocampus. *The neuroscientist* 11:282-287.
32. Kuruba R, Shetty AK (2007). Could hippocampal Neurogenesis be the future drug target for treating Temporal Lobe Epilepsy? *CNS & Neurological disorders – Drug Targets*.6: 342-357.
33. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 51(6):1069-77.
34. Larmet Y, Reibel S, Carnahan J, Nawa H, Marescaux C, Depaulis A. (1995). Protective effects of brain-derived neurotrophic factor on the development of hippocampal kindling in the rat. *Neuroreport*. 6(14):1937-41.
35. Lee S, Williamson J, Lothman EW, Szele FG, Chesselet MF, Von Hagen S, Sapolsky RM, Mattson MP, Christakos S. (1997). Early induction of mRNA for calbindin-D28k and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment. *Brain Res Mol Brain Res*. 47(1-2):183-94.

36. Lee P (2002) Epilepsy in the world today: the social point of view. *Epilepsia*;43 Suppl 6:14-5.
37. Lee E, Son H. (2009) Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep.* 2009; 42(5): 239-44.
38. Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM, Sweatt JD. (2006). Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem.* 281(23): 15763-73.
39. Löscher W. (2002). Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy; 50(1-2):105-23.
40. Lowenstein DH, Arsenault L. (1996) The effects of growth factors on the survival and differentiation of cultured dentate gyrus neurons. *J Neurosci.* 16(5):1759-69.
41. Lubin FD, Roth TL, Sweatt D (2008) Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *The journal of neuroscience.* 28(42): 10576- 10586.
42. Mai J, Fok L, Gao H, Zhang X, Poo MM. (2009) Axon initiation and growth cone turning on bound protein gradients. *J Neurosci.* 29(23):7450-8.
43. Martínez-Levy GA, Cruz-Fuentes CS. (2014) Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. *Yale J Biol Med*; 87(2):173-86.
44. Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Melendez M, Lévesque MF. (1995). The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*;21(2):133-47.
45. Mathern GW, Babb TL, Micevych PE, Blanco CE, Pretorius JK (1997). Granule Cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Molecular and Chemical Neuropathology.* 30: 53-76.

46. Marques CM, Caboclo LO, da Silva TI, Noffs MH, Carrete H Jr, Lin K, Lin J, Sakamoto AC, Yacubian EM. (2007) Cognitive decline in temporal lobe epilepsy due to unilateral hippocampal sclerosis. *Epilepsy Behav.* 10(3):477-85.
47. Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE. (2003). DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science.* 302(5646):890-3.
48. McNamara JO, Scharfman HE. Temporal Lobe Epilepsy and the BDNF Receptor, TrkB. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
49. Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, Bus BA, Penninx BW, Elzinga BM. (2014) Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Mol. Psychiatry.* 19:791-800.
50. Mudò G, Jiang XH, Timmusk T, Bindoni M, Belluardo N. (1996) Change in neurotrophins and their receptor mRNAs in the rat forebrain after status epilepticus induced by pilocarpine. *Epilepsia.* 37(2): 198-207.
51. Murray KD, Isackson PJ, Eskin TA, King MA, Montesinos SP, Abraham LA, Roper SN. (2000). Altered mRNA expression for brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in the hippocampus of patients with intractable temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol.* 418(4): 411-22.
52. Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM. (2008) Activity-dependent suppression of miniature neurotransmission through the regulation of DNA methylation. *J Neurosci.* 28: 395-406.
53. Nishino S, Ohtomo K, Numata Y, Sato T, Nakahata N, Kurita M. (2012) Divergent effects of lithium and sodium valproate on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) production in

- human astrocytoma cells at therapeutic concentrations. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 39(1):17-22.
54. O'Brien TJ, Kazemi NJ, Cascino GD (1997), Chapter 233: Localization-Related Epilepsies due to specific lesions in *Epilepsy: A comprehensive text book* edited by Engel J., Pedley TA. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 2417-2424.
55. Onishchenko N, Karpova N, Sabri F, Castrén E, Ceccatelli S. (2008) Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *J Neurochem*; 106(3):1378-87.
56. Ottem EN, Poort JE, Wang H, Jordan CL, Breedlove SM (2010) Differential expression and regulation of brain derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA isoforms in androgen-sensitive motoneurons of the rat lumbar spinal cord, *Molecular and cellular endocrinology* 328: 40-46.
57. Parrish R, Albertson AJ, Buckingham SC, Hablitz JJ, Mascia KL, Davis Haselden W, Lubin FD. (2013) Status epilepticus triggers early and late alterations in brain-derived neurotrophic factor and NMDA glutamate receptor *Grin2b* DNA methylation levels in the hippocampus. *Neuroscience*. 17; 248:602-19.
58. Pattabiraman PP, Tropea D, Chiaruttini C, Tongiorgi E, Cattaneo A, Domenici L. (2005). Neuronal activity regulates the developmental expression and subcellular localization of cortical BDNF mRNA isoforms in vivo. *Mol Cell Neurosci*. 28(3):556-70.
59. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K (2007) Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing and multiple promoters *Genomics* 90(3): 397-406.
60. Palma E, Torchia G, Limatola C, Trettel F, Arcella A, Cantore G, Di Gennaro G, Manfredi M, Esposito V, Quarato PP, Miledi R, Eusebi F. (2005). BDNF modulates GABA<sub>A</sub> receptors

- microtransplanted from the human epileptic brain to *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(5):1667-72.
61. Paradiso B, Marconi P, Zucchini S, Berto E, Binaschi A, Bozac A, Buzzi A, Mazzuferi M, Magri E, Navarro Mora G, Rodi D, Su T, Volpi I, Zanetti L, Marzola A, Manservigi R, Fabene PF, Simonato M. (2009). Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(17):7191-6.
  62. Paradiso B, Zucchini S, Su T, Bovolenta R, Berto E, Marconi P, Marzola A, Navarro Mora G, Fabene PF, Simonato M. (2011). Localized overexpression of FGF-2 and BDNF in hippocampus reduces mossy fiber sprouting and spontaneous seizures up to 4 weeks after pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsia.* 52(3): 572-8.
  63. Reddy DS, Kuruba R. (2013) Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci.*; 14(9):18284-318.
  64. Regesta G, Tanganelli P. (1999). Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy Res.* 34(2-3):109-22.
  65. Reibel S, Larmet Y, Lê BT, Carnahan J, Marescaux C, Depaulis A. (2000). Brain-derived neurotrophic factor delays hippocampal kindling in the rat. *Neuroscience.* 100(4):777-88.
  66. Rubio-Donnadieu F (2011), Capítulo II Epidemiología de la Epilepsia en Epilepsia, Editado por Rubio-Donnadieu F, Reséndiz-Aparicio JC, Alonso-Vanegas MA, Senties-Madrid H. Programa Prioritario de Epilepsia, 2nda edición ISBN: 978-607-00-5132-6. Pp 23-27
  67. Sambrook J, Russell DW. (2001), *Molecular Cloning: A laboratory manual*,. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

68. San-Juan D, Tapia CA, González-Aragón MF, Martínez Mayorga A, Staba RJ, Alonso-Vanegas M. (2011). The prognostic role of electrocorticography in tailored temporal lobe surgery. *Seizure*. 20: 564-9.
69. Santos AR, Duarte CB. (2008) Validation of internal control genes for expression studies: effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. 86: 3684-92.
70. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. (1999). Actions of brain-derived neurotrophic factor in slices from rats with spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the dentate gyrus. *J Neurosci*. 19(13):5619-31.
71. Scharfman HE. (2007). The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*; 7(4):348-54.
72. Schmittgen TD, Livak KJ. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 3(6):1101-8.
73. Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, Cavalcanti D, Baulac M. (1998) Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology*; 51(5):1256-62.
74. Sharma RP, Tun N, Grayson DR. (2008). Depolarization induces downregulation of DNMT1 and DNMT3a in primary cortical cultures. *Epigenetics*. 3(2):74-80.
75. Shetty AK, Zaman V, Shetty GA. (2003) Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting. *J Neurochem*; 87(1):147-59.
76. Shi XY, Wang JW, Cui H, Li BM, Lei GF, Sun RP. (2010) Effects of antiepileptic drugs on mRNA levels of BDNF and NT-3 and cell neogenesis in the developing rat brain. *Brain Dev*; 32(3):229-35.



77. Simonato M and Zucchini S. (2010) Are the neurotrophic factors a suitable therapeutic target for the prevention of epileptogenesis? *Epilepsia*. 51 Suppl 3:48-51.
78. Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. (1989). Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol*. 26(3):321-30.
79. Takahashi M, Hayashi S, Kakita A, Wakabayashi K, Fukuda M, Kameyama S, Tanaka R, Takahashi H, Nawa H. (1999). Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain Res*. 818(2):579-82.
80. Téllez-Zenteno JF, Hernández-Ronquillo L. (2012). A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Treat*. 2012; 630853.
81. Thomé-Souza MS, Kuczynski E, Valente KD. (2007) Sertraline and fluoxetine: safe treatments for children and adolescents with epilepsy and depression. *Epilepsy Behav*; 10(3):417-25.
82. Tian F, Hu XZ, Wu X, Jiang H, Pan H, Marini AM, Lipsky RH. (2009) Dynamic chromatin remodeling events in hippocampal neurons are associated with NMDA receptor-mediated activation of Bdnf gene promoter 1. *J Neurochem*. 109:1375-88.
83. Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, Persson H. (1993) Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*. 1993; 10(3):475-89.
84. Tongiorgi E, Armellin M, Giulianini PG, Bregola G, Zucchini S, Paradiso B, Steward O, Cattaneo A, Simonato M. (2004) Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. *J Neurosci*; 24(30):6842-52.

85. Tongiorgi E, Domenici L, Simonato M. (2006). What is the biological significance of BDNF mRNA targeting in the dendrites? Clues from epilepsy and cortical development. *Mol Neurobiol.* 33(1):17-32.
86. Tsankova NM<sup>1</sup>, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*; 9(4):519-25.
87. Tudesco Ide S, Vaz LJ, Mantoan MA, Belzunces E, Noffs MH, Caboclo LO, Yacubian EM, Sakamoto AC, Bueno OF (2010). Assessment of working memory in patients with mesial temporal lobe epilepsy associated with unilateral hippocampal sclerosis. *Epilepsy & Behavior* 18(3): 223-8.
88. Xu B, Michalski B, Racine RJ, Fahnstock M. (2004). The effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration on kindling induction, Trk expression and seizure-related morphological changes. *Neuroscience.* 126(3): 521-31.
89. Walczak A, Szczepankiewicz AA, Ruszczycki B, Magalska A, Zamlynska K, Dzwonek J, Wilczek E, Zybura-Broda K, Rylski M, Malinowska M, Dabrowski M, Szczepinska T, Pawlowski K, Pyskaty M, Wlodarczyk J, Szczerebal I, Switonski M, Cremer M, Wilczynski GM. (2013). Novel Higher-Order Epigenetic Regulation of the *Bdnf* Gene upon Seizures. *The Journal of Neuroscience*, 33(6):2507–2511
90. Wang FJ, Li CM, Hou XH, Wang XR, Zhang LM. (2011). Selective upregulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts and BDNF direct induction of activity independent N-methyl-D-aspartate currents in temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. *J Int Med Res* 39(4):1358-68.

91. Wierschke S, Gigout S, Horn P, Lehmann TN, Dehnicke C, Bräuer AU, Deisz RA. (2010) Evaluating reference genes to normalize gene expression in human epileptogenic brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 403: 385-90.
92. Wong J, Webster MJ, Cassano H, Weickert CS (2009) Changes in alternative brain-derived neurotrophic factor transcript expression in the developing human prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience*; 29: 1311-1322.
93. Wong J, Hyde TM, Cassano HL, Deep-Soboslay A, Kleinman JE, Weickert CS. (2010). Promoter specific alterations of brain-derived neurotrophic factor mRNA in schizophrenia. *Neuroscience*; 169(3):1071-84.
94. Zhu WJ, Roper SN. (2001) Brain-derived neurotrophic factor enhances fast excitatory synaptic transmission in human epileptic dentate gyrus. *Ann Neurol.* 50(2):188-94.

Anexo 1: Artículo Requisito

**Increase expression of BDNF transcripts with exon VI in hippocampus of patients with pharmacoresistant Temporal Lobe Epilepsy**

## INCREASED EXPRESSION OF BDNF TRANSCRIPT WITH EXON VI IN HIPPOCAMPI OF PATIENTS WITH PHARMACO-RESISTANT TEMPORAL LOBE EPILEPSY

G. A. MARTÍNEZ-LEVY,<sup>a</sup> L. ROCHA,<sup>b</sup> F. D. LUBIN,<sup>c</sup> M. A. ALONSO-VANEGAS,<sup>d</sup> A. NANI,<sup>e</sup> R. M. BUENTELLO-GARCÍA,<sup>f</sup> R. PÉREZ-MOLINA,<sup>g</sup> M. BRIONES-VELASCO,<sup>h</sup> F. RECILLAS-TARGA,<sup>i</sup> A. PÉREZ-MOLINA,<sup>j</sup> D. SAN-JUAN,<sup>k</sup> J. CIENFUEGOS<sup>l</sup> AND C. S. CRUZ-FUENTES<sup>m\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Genetics, National Institute of Psychiatry "Ramón de la Fuente Muñiz" (INPRFM), Mexico DF, Mexico

<sup>b</sup> Department of Pharmacobiology, Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV), Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Department of Neurobiology, Lubin Lab, University at Birmingham in Alabama, USA

<sup>d</sup> Neurosurgery Section, National Institute of Neurology and Neurosurgery "Manuel Velasco Suárez" (INNNMVS), Mexico City, Mexico

<sup>e</sup> Institute of Cell Physiology, National University of Mexico, UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>f</sup> Clinical Research Department, National Institute of Neurology and Neurosurgery "Manuel Velasco Suárez" (INNNMVS), Mexico City, Mexico

**Abstract**—A putative role of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in epilepsy has emerged from *in vitro* and animal models, but few studies have analyzed human samples. We assessed the BDNF expression of transcripts with exons I (BDNF<sub>I</sub>), II (BDNF<sub>II</sub>), IV (BDNF<sub>IV</sub>) and VI (BDNF<sub>VI</sub>) and methylation levels of promoters 4 and 6 in the hippocampi of patients with pharmac-resistant temporal lobe epilepsy (TLE) ( $n = 24$ ). Hippocampal sclerosis (HS) and pre-surgical pharmacological treatment were considered as clinical independent variables. A statistical significant increase for the BDNF<sub>VI</sub> ( $p < 0.05$ ) was observed in TLE patients compared to the autopsy control group ( $n = 8$ ). BDNF<sub>VI</sub> was also increased in anxiety/depression TLE ( $N = 4$ ) when compared to autopsies or to the remaining group of patients ( $p < 0.05$ ). In contrast, the use of the antiepileptic drug Topiramate (TPM) ( $N = 3$ ) was associated to a decrease in BDNF<sub>VI</sub> expression ( $p < 0.05$ ) when compared to the remaining group of patients. Methylation levels at the BDNF promoters 4 and 6 were similar between TLE and autopsies and in relation to

the use of either Sertraline (SRT) or TPM. These results suggest an up-regulated expression of a specific BDNF transcript in patients with TLE, an effect that seems to be dependent on the use of specific drugs. © 2015 Published by Elsevier Ltd. on behalf of IBRO.

**Key words:** pharmac-resistant temporal lobe epilepsy, BDNF, mRNA expression, epigenetics, promoter methylation, human.

### INTRODUCTION

Epilepsy affects 1–2% of the worldwide population. The most prevalent form of epilepsy is the one that affects the temporal lobe epilepsy (TLE) (Engel et al., 1997; Goldenberg, 2010); very often these patients are refractory to pharmacological treatment (70% of TLE patients) and in most cases surgery is indicated (Jardim et al., 2012).

Seizures in TLE are produced by the synchronized hyperactivity of neuron populations due to the disruption of the balance between excitatory and inhibitory synaptic transmission (Casillas-Espinosa et al., 2012). Cumulative evidence supports a role for the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), involved in synaptic plasticity, as a critical mediator in this pathological process (Koyama and Ikegaya, 2005; Cunha et al., 2010).

Several studies have evaluated BDNF expression in the brain tissue of TLE patients. For instance, in comparison to autopsy controls, Takahashi et al. (1999) found an increment of BDNF protein in the epileptic cortex. Similarly, an increased immunoreactivity of BDNF and its associated Tyrosine receptor kinase B (TrkB) was observed in the TLE hippocampus (Hou et al., 2010). Moreover, an increased hybridization of the BDNF mRNA is detected in hippocampal granule cells from affected individuals (Murray et al., 2000).

It has also been reported that expression of BDNF is affected by: hippocampal sclerosis (HS) (Mathem et al., 1997; Wang et al., 2011), duration and severity of seizures (Hong et al., 2014), fluoxetine treatment in patients with comorbid depression (Kandratavicius et al., 2013) and by antiepileptic drugs (Hou et al., 2010). Therefore, these variables warrant further consideration when the expression of this neurotrophin is being assessed.

\*Corresponding author. Tel: +52-55-41605074.

E-mail address: cruz@imp.edu.mx (C. S. Cruz-Fuentes).

**Abbreviations:** BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BDNF<sub>I</sub>, BDNF transcript with exon I; BDNF<sub>II</sub>, BDNF transcript with exon II; BDNF<sub>IV</sub>, BDNF transcript with exon IV; BDNF<sub>VI</sub>, BDNF transcript with exon VI; CT, cycle threshold; DEPC, diethyl-pyrocabonate; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HDACI, histone deacetylase inhibitor; HS, hippocampal sclerosis; MRI, magnetic resonance image; PMIs, post-mortem intervals; SE, status epilepticus; SRT, Sertraline; TBP, TATA-binding protein; TLE, temporal lobe epilepsy; TPM, Topiramate; VPA, valproate.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.11.046>  
0306-4522/© 2015 Published by Elsevier Ltd. on behalf of IBRO.

BDNF is highly expressed in brain areas implicated in limbic seizures (Lee et al., 1997). Studies in animal models have related seizure activity with changes in the expression of this neurotrophin (Mudó et al., 1996; Lee et al., 1997). For example, transgenic mice overexpressing BDNF, display an increased seizure severity in response to kainic acid, associated to a hippocampal hyperexcitability (Croll et al., 1999). Similarly, the administration of an intra-hippocampal bolus of BDNF, before electrical stimulation increases the susceptibility and duration of kindled seizures (Xu et al., 2004). Moreover, the chronic inhibition of TrkB receptor, initiated after the status epilepticus (SE), prevents the consequent generation of spontaneous and recurrent seizures, ameliorates the anxiety-like behavior and reduces the loss of hippocampal neurons (Liu et al., 2013). All these observations support a role of this neurotrophin in the development of epilepsy. On the contrary, the reports showing that viral vector-mediated of BDNF/Fibroblast Growth Factor 2 decrease the severity and number of spontaneous seizures in the pilocarpine-induced SE model (Paradiso et al., 2009, 2011) these have led to consider the use of BDNF as an alternative therapy for epilepsy treatment (Simonato et al., 2006).

The contrasting effects of this neurotrophin could be associated with the multiplicity of transcripts synthesized from the BDNF gene (for a review see Martínez-Levy and Cruz-Fuentes, 2014). Messenger RNAs containing exons I (BDNF<sub>I</sub>), II (BDNF<sub>II</sub>), IV (BDNF<sub>IV</sub>) and VI (BDNF<sub>VI</sub>) (Fig. 1) are the most commonly expressed in different tissues (Garzon and Fahnstock, 2007; Pruunsild et al., 2007). In the brain, they are localized in different neuronal compartments (Pattabiraman et al., 2005; Aliaga et al., 2009), affecting synaptic plasticity within each area (Baj et al., 2011). The specific cellular location of the transcripts raises the possibility that a distorted regulated trafficking and localized synthesis of BDNF might impact the delicate balance between excitatory and inhibitory transmission, with possible neuro-patho-physiological consequences, including epileptogenesis (Cunha et al., 2010). It is worth noting that no studies have evaluated the expression of these transcripts in human TLE.

Finally, a relation between DNA methylation and BDNF expression has been described for some

neurological and psychiatric disorders (Martínez-Levy and Cruz-Fuentes, 2014). De-methylation of BDNF promoter 1 induced by picrotoxin (a GABAA receptor chloride channel blocker) has been associated with a synaptic hyper-excitability in slices from mouse hippocampus (Nelson et al., 2008). Similarly, an increment in the expression of transcripts with exon IX has been associated with a decrease in the methylation levels on its specific promoter in the kainic acid model of TLE (Parish et al., 2013). Additionally, valproic acid (VPA) and other antiepileptic drugs (D'Addario et al., 2013; Guidotti and Gryson, 2014) seem to affect DNA methylation at specific BDNF promoters. These data indicate that changes in BDNF gene methylation could be associated with epilepsy; however, its role in human tissue remains to be analyzed.

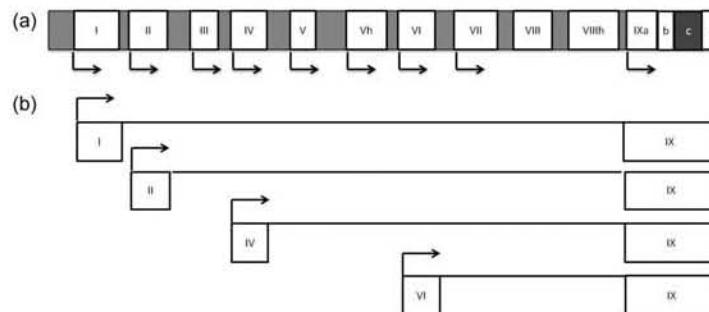
The aim of the present study is to assess the expression of four BDNF transcripts and methylation levels at specific BDNF promoters in the surgically resected hippocampi of patients with pharmacoresistant TLE, in comparison to the autopsy samples. Age, duration of epilepsy, HS and pre-surgical pharmacological treatment were considered as independent variables.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Subjects

All experiments were performed with the approval of the Ethics Committee of the National Institute of Neurology and Neurosurgery “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS) in Mexico City (project 70/12). All participants signed an informed consent. Patients ( $n = 24$ ) met diagnostic criteria for TLE and were refractory to pharmacological treatment. They underwent a detailed medical history, video electroencephalography (EEG) recordings and magnetic resonance image (MRI) studies. Hippocampus Sclerosis was defined by the presence of hippocampus atrophy and a hyper-intense signal on T2-weighted MRI (General Electric 3T unit).

The presence of depression and anxiety disorders was assessed by means of The Hospital and Anxiety Depression Scale (HADS; Spanish version) (Herrero et al., 2003; Gómez-Arias et al., 2012). Diagnoses were confirmed with the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) (First Michael et al.,



**Fig. 1.** BDNF gene structure and the four transcripts analyzed. White boxes indicate exons, gray spaces point to introns and arrows designate the alternative transcription start sites. Scheme showing the organization of the four alternative transcripts analyzed in this study.

2002), applied by a psychiatrist who was blind to the epilepsy diagnosis.

Relevant clinical data including: age of the subjects at the moment of surgery, gender, onset date year of epilepsy, epilepsy duration, epilepsy surgery date, precipitating factors of epilepsy, other diseases/diagnoses and treatments associated with epilepsy or with other comorbidities and the surgical outcome, were obtained from the clinical records.

Hippocampal samples from 18 patients displaying HS (10 men and 8 women) and from six patients without HS (3 men and 3 women) were collected. Clinical data from each patient and location of the epileptic focus are shown in Table 1.

Surgeries were performed between February 2012 and June 2013. The surgery procedure in patients with HS was carried out using the T2 or T3 trans-temporal approach guided by the electrocorticographic (ECoG) signals recorded on the brain surface (4 × 8 electrode-gird, Ad-Tech, Racine, WI, USA). The procedure consisted of the

unilateral amygdalo-hippocampectomy, which includes the microsurgical excision of the head of the anterior body of the hippocampus, amygdala, portions of the uncus, the parahippocampal gyrus and was followed by the tailored resection of the temporal neocortex (San Juan et al., 2011). Patients without HS were submitted to a similar surgical procedure; in this case amygdalo-hippocampectomy was practiced depending on the localization of the lesion. After a careful dissection, the hippocampus was stored for the following procedures. Biopsies from tumors, malformations or any other alteration were not included in the present study; in those cases where tumors or lesions were restricted to the hippocampus; lesion's margins were used for the present study.

All samples from TLE patients were stored immediately after resection in a Ringer solution (pH 7) containing diethyl-pyrocabonate (DEPC) and were transported on ice to the laboratory within a maximum of 2 h, where RNA extraction was performed.

Table 1. Demographic and clinical data of TLE patients and autopsies

| PX   | Gender | Age | Seizure onset age | Duration of epilepsy         | Precipitating factors | AED before surgery | Other drugs      | Side focus | Surgical out-come Engel's | Final diagnosis |
|------|--------|-----|-------------------|------------------------------|-----------------------|--------------------|------------------|------------|---------------------------|-----------------|
| 367  | F      | 22  | 12                | 10                           | FH, CET, FS           | CBZ, LMG           | –                | Right      | NA                        | HS              |
| 355  | M      | 60  | 8                 | 52                           | CET                   | VPA, CBZ, CNZ      | RSP, BP          | Left       | 1                         | HS              |
| 392  | M      | 41  | 2                 | 39                           | FH, FS                | PHE, LMG, CBZ      | SRT              | Left       | 1                         | HS              |
| 359  | F      | 33  | 27                | 6                            | FS                    | PHE, TPM, CBZ      | –                | Left       | 1                         | HS              |
| 215  | M      | 19  | 1                 | 18                           | FH, HYPOXIA           | VPA, LMG, TPM, LVT | –                | Right      | 1                         | HS              |
| 275  | F      | 23  | 13                | 10                           | FH                    | CBZ, LVT           | –                | Left       | 3                         | HS              |
| 289  | M      | 37  | 5                 | 32                           | FS, CET               | CBZ                | –                | Right      | 1                         | HS              |
| 290  | F      | 24  | 1                 | 23                           | CET                   | VPA, CBZ           | –                | Right      | 1                         | HS              |
| 295  | M      | 43  | 27                | 16                           | –                     | VPA, PMD           | –                | Right      | 1                         | HS              |
| 301  | M      | 56  | 11                | 45                           | –                     | PHE                | –                | Right      | 1                         | HS              |
| 283  | M      | 30  | 14                | 16                           | –                     | VPA, CBZ           | –                | Left       | 1                         | HS              |
| 296  | F      | 38  | 30                | 8                            | –                     | VPA                | –                | Left       | 1                         | HS              |
| 286  | F      | 33  | 12                | 21                           | FH                    | VPA, PHB           | –                | Right      | 1                         | HS              |
| 305  | F      | 21  | 14                | 7                            | FH, CET               | PHE                | –                | Left       | 1                         | HS              |
| 276  | M      | 54  | 13                | 41                           | FH, CET               | CBZ, LMG           | –                | Right      | 1                         | HS              |
| 293  | M      | 23  | 10                | 13                           | CET                   | PHE, VPA           | –                | Right      | 1                         | HS              |
| 292  | F      | 42  | 4                 | 38                           | –                     | CBZ, LMG           | –                | Left       | 1                         | HS              |
| 282  | M      | 37  | 9                 | 28                           | HYPOXIA               | VPA, CBZ           | SRT              | Right      | 1                         | HS              |
| 67   | F      | 27  | 27                | 0.2                          | CET                   | TPM                | –                | Right      | 1                         | CM              |
| 106  | F      | 29  | 12                | 17                           | FS, CET               | PHE, CBZ           | –                | Left       | 1                         | OA              |
| 207  | M      | 46  | 45                | 1                            | –                     | PHE                | DEX              | Right      | NA                        | GBM             |
| 279  | F      | 18  | 14                | 4                            | –                     | PHE                | –                | Left       | 1                         | GII A           |
| 309  | M      | 49  | 14                | 35                           | –                     | CBZ, LC            | SRT              | Left       | 1                         | Cysticercosis   |
| 291  | M      | 34  | 30                | 4                            | –                     | CBZ                | SRT              | Left       | 1                         | CD              |
| CTRL | Gender | Age | Side              | Post-mortem interval (hours) |                       |                    | Cause of death   |            |                           |                 |
| C1   | M      | 33  | Right             | 8–10                         |                       |                    | Fire arm missile |            |                           |                 |
| C2   | M      | 37  | Left              | 2–5                          |                       |                    | Fire arm missile |            |                           |                 |
| C3   | M      | 30  | Left              | 10–12                        |                       |                    | Fire arm missile |            |                           |                 |
| C4   | M      | 73  | Left              | 10–12                        |                       |                    | Pneumonia        |            |                           |                 |
| C5   | M      | 36  | Left              | 10–12                        |                       |                    | Fire arm missile |            |                           |                 |
| C6   | F      | 22  | Left              | 12–14                        |                       |                    | Suffocation      |            |                           |                 |
| C7   | F      | 18  | Left              | 16–18                        |                       |                    | Suffocation      |            |                           |                 |
| C8   | M      | 45  | Left              | 16–18                        |                       |                    | Suffocation      |            |                           |                 |

CET: craniocerebral trauma; FH: family history; FS: febrile seizures; PHE: phenytoin sodium; VPA: valproic acid; LMG: lamotrigine; TPM: Topiramate; LVT: levetricetam; CBZ: carbamazepine; GBP: gabapentin; PMD: pyrimidone; CNZ: clonazepam; PHB: phenobarbital; LC: lacosamide; DEX: dexamethasone; SRT: Serrtraline; RSP: risperidone; BP: biperiden; HS: hippocampal sclerosis; CM: cavernous malformation; OA: oligoastrocytoma; GBM: glioblastoma; GII A: grade II astrocytoma; CD: cortical dysplasia; ENGEL 1: free of disabling seizure; 2: rare disabling seizures; 3: worthwhile improvement; NA: not available.

Hippocampus of eight individuals with a cause of death unrelated to a neurological or psychiatric disorder was obtained (Table 1); these samples were immediately frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### Demographic data of the sample

The autopsy control group included six males and two females (mean age at the moment of death:  $35 \pm 12$  years old). In all but one of the samples, the left hippocampus was analyzed. In all cases, the post-mortem interval (PMI) was  $< 18$  h.

Patients with TLE were 13 males and 11 females with a mean age of  $35 \pm 12$  years. The male/female ratio ( $\chi^2 = 1.08$ ,  $df = 1$ ,  $p \geq 0.05$ ) and mean age ( $t = 0.37$ ,  $p \geq 0.05$ ) were statistically similar with respect to the autopsy group. Clinical features: age at seizure onset,  $14.6 \pm 10.7$ ; years with epilepsy,  $20.2 \pm 14.8$  and number of seizures the month before surgery  $2.2 \pm 4.5$ . The anti-epileptic treatment most commonly used was Carbamazepine (58.3%), followed by valproate (VPA) (40.9%), Phenytoin (33.3%), Lamotrigine (20.8%), Topiramate (TPM) (12.5%), Levetiracetam (8.3%), Clonazepam (4.2%) and Pyrimidine (4.2%). From six cases that received adjuvant pharmacological treatment for treating comorbidities, four used Sertraline (SRT) for ameliorating anxiety and depression symptoms. The post-operative outcome evaluated 1 year after surgery, indicated that in most cases (87.5%) the seizure freedom was achieved (Engel class I); in a single case a worthwhile improvement was demonstrated (Engel class III), while in two cases no data were available as they did not return to post-operative studies.

#### Extraction of nucleic acids

Brain tissue (100 mg) was homogenized in 1 ml of guanidinium isothiocyanate solution; the half of the volume was used for RNA extraction as described in Chomczynski and Sacchi (1987); high-molecular weight DNA was extracted from the remaining amount using the chloroform–phenol technique.

In order to assure appropriate comparisons between-groups, every DNA/RNA sample was checked for parameters of quantity and purity (NanoDrop spectrophotometer); the integrity was evaluated by gel electrophoresis. No differences were detected in these variables between hippocampus of cases and autopsies.

Since samples of hippocampus from patients with TLE and those of autopsies were not obtained under strictly similar conditions, the following assay was performed: 12 rats were euthanized by decapitation and their skulls left at room temperature for different PMIs: 0 h ( $N = 4$ ), 4 h ( $N = 2$ ), 8 h ( $N = 2$ ), 16 h ( $N = 2$ ) and 24 h ( $N = 2$ ). At the end of each period, the cerebrum was removed and the brain cortex dissected. Two samples of the experimental condition 0 h were stored for 2 h on ice in a Ringer solution (pH 7) containing DEPC while the remaining were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Total RNA was then extracted as described above.

Even though the amount of RNA recovered was inversely related to the postmortem interval; this

variable did not affect the integrity and purity, as well as the expression of the rat BDNFIV. Similarly, no significant differences were detected between the samples stored in Ringer/DEPC solution as compared to those from PMIs of 16 h. These results imply that different collecting methods did not exert important effects on the results obtained in the analysis of the human BDNF gene.

#### Expression analysis of BDNF transcripts

Reverse transcription reactions were set up using  $4 \mu\text{g}$  of total RNA, and 200 U of the Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Catalog: 28025-013). The cDNA was stored until further use at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

BDNF expression was assayed using the following ABI probes: BDNFI (Catalog: hs00538277-m1), BDNFII (Catalog: hs00538278-m1), BDNFIV (Catalog: hs00380947-m1), BDNFVI (Catalog: hs00156058-m1) (Wong et al., 2010).

TATA-binding protein (TBP) (Catalog: 4333769F) was chosen as the endogenous control probe. The rationale for its employment instead of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) used in previous reports (Mathem et al., 1997; Wang et al., 2011) was based on our experimental observation of an important delay in the cycle threshold (CT) values when using GAPDH (CT for epilepsy samples =  $34.7 \pm 3.7$  and CT for autopsies =  $31.2 \pm 1.7$ ,  $t = 2.4$ ,  $p \leq 0.05$ ) as opposed to TBP (CT for epilepsy:  $31.7 \pm 2.7$ ; CT for autopsies =  $31.6 \pm 1.2$ ,  $U = 93$ ,  $p \geq 0.05$ ).

Similar results have been previously reported in neocortical tissue of patients with TLE as compared to autopsy control groups (Wierschke et al., 2010). Moreover, it has also been reported that *in vitro* administration of BDNF changes GAPDH mRNA levels while TBP expression shows more stability (Santos and Duarte, 2008).

Each 25- $\mu\text{l}$  PCR reaction contained 250 ng of cDNA, 1.25  $\mu\text{l}$  of probe and 12.5  $\mu\text{l}$  of Taqman Universal PCR master mix, No-Amperase UNG (Catalog 4324018). No-template controls were included in each experiment. Samples were run in duplicate. Sds software (version 2.0; Applied Biosystems) was used for obtaining the Ct values.

#### Methylation analysis of BDNF promoters

One microgram of DNA was treated with sodium bisulfite using an EpiTect 96 Bisulfite Kit, according to the manufacturer's instructions. (Qiagen, USA).

After bisulfite modification, a promoter IV and promoter VI PCR was performed, employing a biotinylated primer. In the first case, the PCR reaction was carried out in a 25  $\mu\text{l}$  solution containing 1  $\mu\text{l}$  of bisulfite-modified genomic DNA, 1X PyroMark PCR Master Mix, 1X CoralLoad Concentrate, 1X Q-Solution,  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM (PyroMark PCR Kit, Qiagen, USA) and 0.5  $\mu\text{M}$  of the forward (F: 5'-[Bt]TTTGTGGGGTTGGA AGTGAAAAT-3') and reverse primers (R: 5'-CCCATCAA CRAAAAACCTCCATTTAATCTC-3') (Keller et al., 2010).



PCR conditions included an initial denaturation step for 5 min at 95 °C, followed by 49 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 59 °C, and 1 min at 72 °C and a final extension step of 10 min at 72 °C. For BDNF promoter VI, the PCR reaction was carried out in a 25 µl solution containing 1 µl of bisulfite-modified genomic DNA, 1× of KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems, USA) and 0.5 µM of the forward (F: 5'-GAGGAGGTGAG GATAGGTTT-3') and reverse primers (R: 5'-[Btrn]CTCAT TAAAACCCCCRAACAAAAATAA-3'). PCR conditions included an initial denaturation step for 5 min at 95 °C; 40 cycles of 15 s at 95 °C, 15 s at 60 °C and 45 s at 72 °C and a final extension step of 10 min at 72 °C.

For pyrosequencing analyses, 10 µl of bisulfite-PCR products (previously cleaned with 2 µl of exo-sap; Affimetrix, USA) were processed according to the manufacturer's standard protocol (Qiagen, USA) with the following sequencing primers (Promoter IV S: 5'-AC AAAAAATTTTCACTAA-3'; Promoter VI S: 5'-AGTT TAATYAGAAGAGTTAAATAATG-3').

Standard DNA samples (EpigenDX, USA) with methylation levels of 0%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, and 100%, were also bisulfite-treated and analyzed for each group of primers.

#### Statistical analyses

Expression levels are represented in graphs as  $2^{-\Delta\Delta CT}$  values. The  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula, as described in Schmittgen and Livak (2008) was used to calculate the fold of change between experimental groups. Percentage of methylation levels was obtained with the PyroMark CpG software. The results are presented in the graphs as mean  $\pm$  2 standard deviation (SD) and were considered significant when  $p < 0.05$ .

Statistical analyses were carried out with IBM SPSS Statistic v.20. *T* test for independent samples was used to evaluate differences between cases and autopsies, while the effect of specific clinical variables was evaluated using ANOVA and Dunnett's T3 post hoc test. A non-Parametric Mann–Whitney *U* Statistic test or the Kruskal–Wallis One-Way Analysis of Variance on Ranks was performed when necessary.

For the premixed methylation samples of DNA, a regression analysis was carried out for each group of primers (exons IV and VI) and linearity was evaluated.

## RESULTS

#### Changes in BDNF mRNA transcripts expression

The four assayed BDNF transcripts were detected in all samples, with higher expression levels for those BDNFI and BDNFIV (Fig. 2) in the autopsy sample, as previously reported (Pruunsild et al. 2007).

Compared to autopsies, the fold-of-change for the different BDNF transcripts analyzed in patients with TLE were: (BDNFI: 2.3, BDNFII: 1.7; BDNFIV: 1.0; BDNFVI: 2.0) but transcript with exon VI ( $t = 2.1$ ,  $p \leq 0.05$ ) was the only one that shows a statistical significant increase (Fig. 2). At the individual patient level the expression of the four BDNF transcripts changed in a similar way (i.e.

if a patient showed high levels of transcript with exon I, high levels of transcript with exon II, IV and VI were also observed). Nonetheless the degree of increment in epileptic tissue was higher for transcript VI.

*Changes of BDNF expression with respect to other clinical variables.* Age, gender, age at seizure onset, years with epilepsy, number of monthly seizures and laterality of resection did not correlate with the expression of BDNF transcripts. Likewise, BDNF transcript expression in TLE-HS cases was similar to that associated with other types of lesions (TLE non-HS) (Fig. 3).

Among the different antiepileptic drugs used by patients, only TPM ( $n = 3$ ) was associated with a significantly lower expression ( $F = 5.28$ ,  $p \leq 0.05$ ) of BDNFVI as compared to the remaining group of the patients (0.2 times) and to the autopsy sample (0.5 times) (Table 2, Fig. 4). Moreover, a negative but not statistically significant correlation between the expression levels and the dose of TPM used was found ( $F = 63.5$ ,  $R^2 = 0.97$ ,  $p = 0.07$ ).

In contrast, an increase in BDNF transcript with exon VI was observed in TLE patients that used SRT ( $n = 4$ ,  $F = 6.42$ ,  $p \leq 0.05$ ) as compared to the remaining affected individuals (2.5 times), and to autopsies (4.5 times) (Table 2, Fig. 5).

#### Methylation levels and BDNF promoters 4 and 6

For the premixed methylation samples of DNA, the analyses showed highly significant results ( $p \leq 0.01$ ) with  $R^2$  ranging from 0.84 to 0.92, indicating that our experiments adequately resemble the methylation levels of the samples.

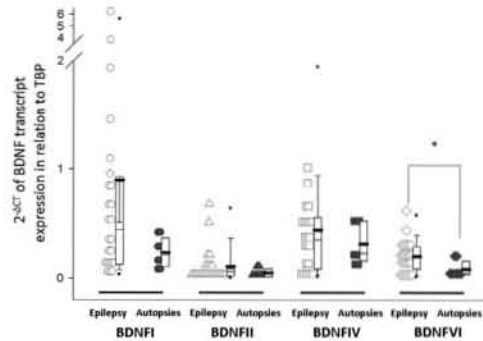
Low levels of methylation ( $\geq 15\%$ ) were detected in the first five CpGs located after the start site of transcription in promoters 4 and 6, but non-significant differences between TLE and autopsies were observed (Fig. 6).

No changes on DNA methylation was observed either with the presence of HS or with the use of specific pharmacological treatments such as TPM and SRT.

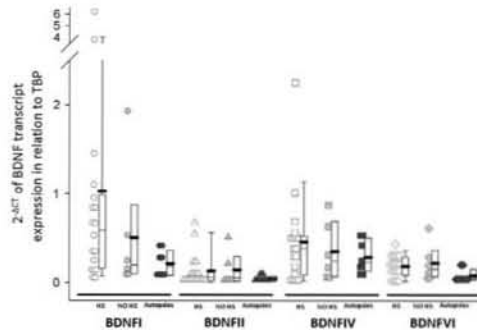
## DISCUSSION

We report here an increased expression of BDNF exon VI in pharmaco-resistant TLE patients' hippocampus compared to an autopsy control group. The heightened expression of a specific transcript is in agreement with previous studies in human epileptic tissue where a rise in BDNF protein and mRNA levels was reported (Mathem et al., 1997; Murray et al., 2000; Hou et al., 2010).

An increase in the expression of BDNF has been observed in the acute phase of the pilocarpine- or kainate-induced SE (Shetty et al., 2003; Tongiorgi et al., 2004). Some researchers (Heinrich et al., 2011; Parrish et al., 2013), but not others (Shetty et al., 2003; Tongiorgi et al., 2004) report that this increment is maintained during the late chronic phase (i.e. after at least 1 month of SE) when spontaneous recurrent seizures are already present, suggesting that BDNF could be impli-



**Fig. 2.** Expression of four BDNF transcripts in hippocampus of TLE patients and autopsies. Each symbol corresponds to individual data. Circles represent the expression of BDNF I, triangles BDNF II, square BDNF IV and diamonds BDNF VI. Open symbols represent TLE cases while dark gray symbols correspond to autopsies. The mean is described as a line in between the box-plot. Statistical significance was determined using an unpaired, two-tailed *t*-test,  $p < 0.05$ .



**Fig. 3.** Expression of four BDNF transcripts in relation to hippocampal sclerosis (HS). HS: presence of hippocampal sclerosis; no-HS: absence of hippocampal sclerosis. Each symbol corresponds to individual data. Circles represent the expression of BDNF I, triangles BDNF II, square BDNF IV and diamonds BDNF VI. Open symbols represent HS-TLE cases; light gray symbols indicate non-HS-TLE cases and dark gray symbols correspond to autopsies. The mean is described as a line in between the box-plot. Statistical significance was determined using a one-way ANOVA followed by T3 Dunnett's multiple comparison test.

**Table 2.** Effect of pharmacological treatment in the expression of BDNF transcripts

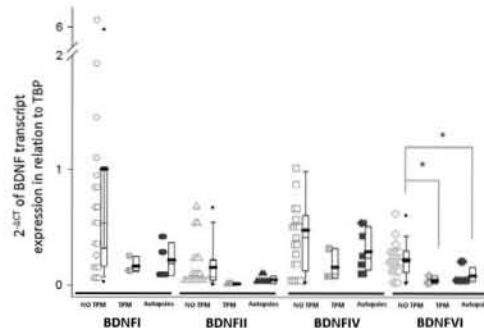
| Drug | Sample | BDNF I                 | BDNF II                | BDNF IV                | BDNF VI                                    |
|------|--------|------------------------|------------------------|------------------------|--|
| PHE  | 8      | $F = 0.86 p \geq 0.05$ | $F = 0.95 p \geq 0.05$ | $F = 0.49 p \geq 0.05$ | $F = 2.14 p \geq 0.05$                     |
| VPA  | 9      | $F = 1.74 p \geq 0.05$ | $F = 2.11 p \geq 0.05$ | $F = 0.79 p \geq 0.05$ | $F = 2.32 p \geq 0.05$                     |
| CBZ  | 14     | $F = 1.19 p \geq 0.05$ | $F = 0.62 p \geq 0.05$ | $F = 0.32 p \geq 0.05$ | $F = 2.14 p \geq 0.05$                     |
| LMG  | 5      | $F = 2.62 p \geq 0.05$ | $F = 0.66 p \geq 0.05$ | $F = 0.31 p \geq 0.05$ | $F = 2.19 p \geq 0.05$                     |
| TPM  | 3      | $F = 1.52 p \geq 0.05$ | $F = 1.30 p \geq 0.05$ | $F = 1.06 p \geq 0.05$ | <b><math>F = 5.28 p &lt; 0.05^*</math></b> |
| LVT  | 2      | $F = 1.11 p \geq 0.05$ | $F = 0.64 p \geq 0.05$ | $F = 0.41 p \geq 0.05$ | $F = 2.14 p \geq 0.05$                     |
| SRT  | 4      | $F = 0.89 p \geq 0.05$ | $F = 0.80 p \geq 0.05$ | $F = 0.33 p \geq 0.05$ | <b><math>F = 6.28 p &lt; 0.05^*</math></b> |

Statistical significance was determined using a one-way ANOVA. Text in bold indicates statistical significant effect with  $p < 0.05^*$ .

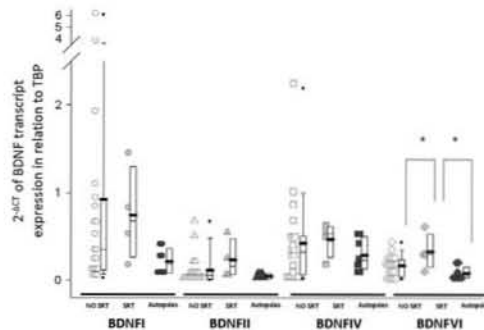
cated in the development of epilepsy while involvement in maintenance of the epileptic state remains uncertain.

The analysis of the expression of different BDNF transcripts is of interest since they show distinct spatial segregation within the neuron (Pattabiraman et al., 2005; Aliaga et al., 2009). It has been proposed that differential sorting of BDNF mRNAs to specific sub-cellular

compartments may modify the synaptic architecture, with possible implications for epilepsy (Tongiorgi et al., 2006). Remarkably, in animal model studies, BDNFVI increases in the distal dendrites a few hours after SE (Pattabiraman et al., 2005; Chiaruttini et al., 2008; Baj et al., 2013). It has been speculated that in this cellular location BDNF mRNAs may increase the production of pro-BDNF,



**Fig. 4.** Effect of the use of Topiramate (TPM) as an anti-epileptic drug previous to surgery on the hippocampal expression of the four BDNF transcripts analyzed. No TPM: no use of Topiramate; TPM: use of Topiramate. Each symbol corresponds to individual data. Circles represent the expression of BDNF I, triangles BDNF II, square BDNF IV and diamonds BDNF VI. Those cases that used (or not) TPM are represented by light gray or open symbols respectively. Dark gray symbols correspond to autopsies. The mean is described as a line in between the box-plot. Statistical significance was determined using a one-way ANOVA followed by T3 Dunn's multiple comparison test. \* $p < 0.05$ .



**Fig. 5.** Effect of the use of Sertraline (SRT) as an antidepressant previous to surgery, on the expression of the four BDNF transcripts analyzed. No SRT: no use of Sertraline; SRT: use of Sertraline. Each symbol corresponds to individual data. Circles represent the expression of BDNF I, triangles BDNF II, square BDNF IV and diamonds BDNF VI. Those cases that used (or not) SRT are represented by light gray or open symbols respectively. Dark gray symbols correspond to autopsies. The mean is described as a line in between the box-plot. Statistical significance was determined using a one-way ANOVA followed by T3 Dunn's multiple comparison test. \* $p < 0.05$ .

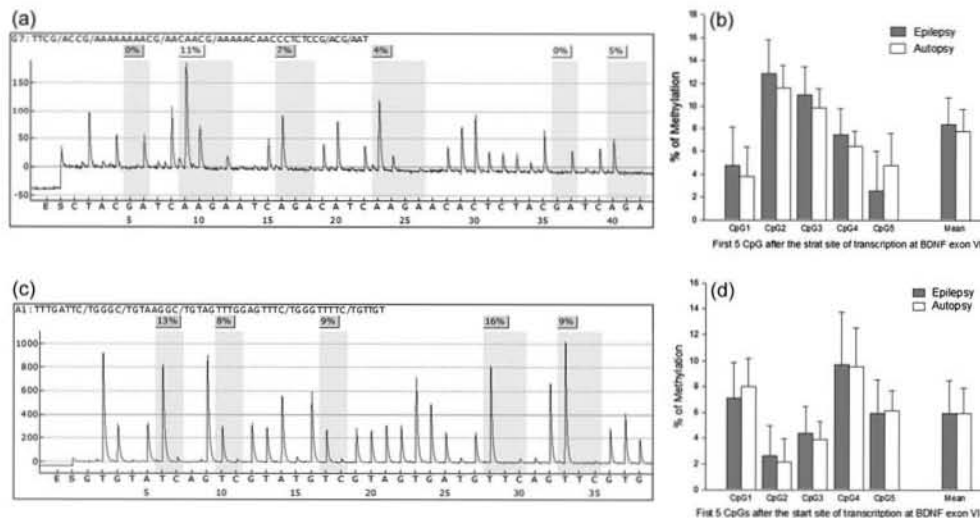
activate pro-apoptotic signaling cascades, potentiate excitatory synapses as well as increase synaptogenesis and dendrite arborization, eventually promoting epileptic seizures (Chiaruttini et al., 2008).

Even though Wang et al. (2011) previously reported an increase in BDNF exons II, IV and VI in TLE-HS patients as compared to those non-HS; in the present study HS did not affect the expression of the different BDNF transcripts analyzed; in contrast lack of association between BDNF protein levels and HS was also previously reported (Hou et al., 2010). Use of different endogenous controls in quantitative PCR (as described in the methodology) and/or the clinical heterogeneity of patients could also explain the lack of agreement among studies.

Variables such as age, gender, years with epilepsy, seizure onset age, number of seizures per day previous to surgery and the laterality of resection did not modify the results of BDNF expression. However, a decrease in BDNFVI was detected in three patients using TPM, a

drug with histone deacetylase inhibitor (HDACi) properties. An analogous dose-dependent decline of the expression of this neurotrophin was previously reported in rats' hippocampus chronically treated with TPM (Shi et al., 2010). Moreover, BDNF protein levels also decrease in hippocampal slices obtained from patients with pharmacoresistant TLE after *in vitro* infusion of another HDACi: VPA (Hou et al., 2010). Lack of effect of VPA on BDNF mRNA levels observed in the present study could be due to the suspension of this drug two weeks before surgery, in order to prevent the risk of hemorrhage during operation.

We also found an increment in the expression of BDNFVI in hippocampus of four patients that used the serotonin reuptake inhibitor (SRI) SRT to treat anxiety and depression symptoms. A similar result was observed when the immunoreactivity for this neurotrophin was measured in TLE patients' hippocampus using fluoxetine (Kandratavicius et al.,



**Fig. 6.** Comparison of the methylation levels at the first five CpGs located after the transcription start site at exons IV and VI, between TLE cases and autopsies. Left panel: representative pyrograms of methylation levels at the BDNF promoter IV (a) and VI (c). Right panel: methylation levels at the BDNF promoter IV (b) and VI (d), between TLE cases (gray bars) and autopsies (white bars). Statistical significance was determined using an unpaired, two-tailed *t*-test.

2013). In addition, in depressive patients a rise in serum BDNF protein and mRNA BDNF has been associated to the use of a variety of SRI's (Molendijk et al., 2014; Hong et al., 2014). Interestingly, in animal models it has been reported that anti-depressive treatment as well as exercise specifically increase BDNFVI, promoting the formation of new distal dendrites in the CA3 neurons (Baj et al., 2012). This effect could enhance the communication with the dentate gyrus promoting the hippocampus' functional recovery (Baj et al., 2011, 2012).

The effect of the pharmacological treatments on the expression of BDNF transcripts has barely been studied, especially in epileptic tissue, and our results suggest that they probably affect its mRNA levels. Nonetheless, due to the discrete number of individuals taking these drugs, caution should be taken when interpreting the association related to the use of TPM or SRT. Future research including higher number of samples is required in order to further discriminate between the effects dependent on pharmacological treatment from those associated with epilepsy.

Finally, different studies have reported an inverse relationship between BDNF expression and methylation levels in specific promoters (Martínez-Levy and Cruz-Fuentes, 2014). Nonetheless, under our experimental conditions, the analyzed regions near the start sites of transcription at exons IV and VI were completely unmethylated in autopsies and cases. Other mechanisms like the intra-nuclear position of BDNF gene (Walczak et al., 2013), histone modification (Tian et al., 2009) or changes in the expression of specific transcription factors, such as CREB (Guo et al., 2014) must be considered in

order to understand BDNF expression regulation and its role in epilepsy.

## CONCLUSION

The role of the different BDNF transcripts in epilepsy is still controversial. Even though, previous studies have analyzed the steady-state expression of BDNF gene in relation to SE, reports in epileptic tissue are scarce. To our knowledge this is the first study that analyzed these variants in epileptic tissue of TLE patients in comparison to autopsies. Changes in the expression of specific BDNF transcripts, as reported here could have functional implication in epilepsy or could be related to the use of other pharmacological treatments. Future *in vitro* and animal model studies are warranted to further investigate these possibilities.

**Acknowledgments**—This article constitutes a partial requirement to obtain the PhD grade in the Postgraduate program of Biological Sciences at the National Autonomous University of Mexico (UNAM) for GAM-L. This study was supported the Research fund of the National Institute of Psychiatry "Ramón de la Fuente Muñiz" Project IC142040.0. We would like to thank Georgina Guerrero Avendaño, Gianelli Cortes Gonzalez and Jose Perez Luna for their technical help.

## REFERENCES

- Allaga EE, Mendoza I, Tapia-Arancibia L (2009) Distinct subcellular localization of BDNF transcripts in cultured hypothalamic neurons and modification by neuronal activation. *J Neural Transm* 116 (1):23–32.

- Baj G, Leone E, Chao MV, Tongiorgi E (2011) Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (40):16813–16818.
- Baj G, D'Alessandro V, Musazzi L, Malloei A, Sartori CR, Sciancalepore M, Tardito D, Langone F, Popoli M, Tongiorgi E (2012) Physical exercise and antidepressants enhance BDNF targeting in hippocampal CA3 dendrites: further evidence of a spatial code for BDNF splice variants. *Neuropsychopharmacology* 37(7):1600–1611.
- Baj G, Del Turco D, Schlaudraff J, Torelli L, Deller T, Tongiorgi E (2013) Regulation of the spatial code for BDNF mRNA isoforms in the rat hippocampus following pilocarpine-treatment: a systematic analysis using laser microdissection and quantitative real time PCR. *Hippocampus* 23(5):413–423.
- Casillas-Espinosa PM, Powell KL, O'Brien TJ (2012) Regulators of synaptic transmission: roles in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Epilepsia* 53:41–58.
- Chiaruttini C, Sonogo M, Baj G, Simonato M, Tongiorgi E (2008) BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Mol Cell Neurosci* 37(1):11–19.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156–159.
- Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS, Scharfman HE (1999) Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience* 93(4):1491–1506.
- Cunha C, Brambilla R, Thomas KL (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3:1–14.
- D'Addario C, Caputi FF, Ekström TJ, Di Benedetto M, Maccarrone M, Romualdi P, Candelletti S (2013) Ethanol induces epigenetic modulation of prodynorphin and pronociceptin gene expression in the rat amygdala complex. *J Mol Neurosci* 49:312–319.
- Engel J, Williamson PD, Wieser H-G (1997). In: Engel J, Pedley TA, editors. Chapter 231: mesial temporal lobe epilepsy in epilepsy: a comprehensive text book. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. p. 2417–2424.
- First Michael B, Spitzer Robert L, Gibbon Miriam, Williams Janet BW (2002) Structured clinical interview for DSM-IV-TR axis I disorders, research version, patient edition. (SCID-I/P) New York: Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute.
- Garzon DJ, Fahnstock M (2007) Oligomeric amyloid decreases basal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA via specific downregulation of BDNF transcripts IV and V in differentiated human neuroblastoma cells. *J Neurosci* 27 (10):2628–2635.
- Goldenberg MM (2010) Overview of drugs used for epilepsy and seizures. *P&T* 35(7):392–415.
- Gómez-Arias B, Crail-Meléndez D, López Zapata R, Martínez-Juárez IE (2012) Severity of anxiety and depression are related to a higher perception of adverse effects of antiepileptic drugs. *Seizure* 21:588–594.
- Guidotti A, Grayson DR (2014) DNA methylation and demethylation as targets for antipsychotic therapy. *Dialogues Clin Neurosci* 16:419–429.
- Guo J, Wang H, Wang Q, Chen Y, Chen S (2014) Expression of p-CREB and activity-dependent miR-132 in temporal lobe epilepsy. *Int J Clin Exp Med* 7:1297–1306.
- Heinrich C, Lähäinen S, Suzuki F, Anne-Marie L, Huber S, Häussler U, Haas C, Larnet Y, Castren E, Depaulis A (2011) Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 42 (1):35–47.
- Herrero MJ, Blanch J, Peri JM, De Pablo J, Pintor L, Bulbena A (2003) A validation study of the hospital anxiety and depression scale (HADS) in a Spanish population. *Gen Hosp Psychiatry* 25:277–283.
- Hong W, Fan J, Yuan C, Zhang C, Hu Y, Peng D, Wang Y, Huang J, Li Z, Yu S, Liu X, Wu Z, Chen J, Yi Z, Xu L, Fang Y (2014) Significantly decreased mRNA levels of BDNF and MEK1 genes in treatment-resistant depression. *Neuroreport* 25(10):753–755.
- Hou X, Wang X, Zhang L (2010) Conditional downregulation of brain derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B blocks epileptogenesis in the human temporal lobe epilepsy hippocampus. *Neurol India* 58(1):29–34.
- Jardim AP, Neves RS, Caboclo LO, Lancellotti CL, Marinho MM, Centeno RS, Cavalheiro EA, Scorza CA, Yacubian EM (2012) Temporal lobe epilepsy with mesial temporal sclerosis: hippocampal neuronal loss as a predictor of surgical outcome. *Arq Neuropsiquiatr* 70(5):319–324.
- Kancratavicius L, Monteiro MR, Assirati Jr JA, Carloti Jr CG, Hallak JE, Leite JP (2013) Neurotrophins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities. *J Neuropathol Exp Neurol* 72(11):1029–1042.
- Keller S, Sarchiapone M, Zarnilli F, Videtic A, Ferraro A, Carli V, Sacchetti S, Lembo F, Angiolillo A, Jovanovic N, Pisanti F, Tomaiuolo R, Monticelli A, Balazic J, Roy A, Marusic A, Coccozza S, Fusco A, Bruni CB, Castalio G, Chiariotti L (2010) Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* 67(3):258–267.
- Koyama R, Ikegaya Y (2005) To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus. *Neuroscientist* 11(4):282–287.
- Lee S, Williamson J, Lothman EW, Szele FG, Chesselet MF, Von Hagen S, Sapolsky RM, Mattson MP, Christakos S (1997) Early induction of mRNA for calbindin-D28k and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment. *Brain Res Mol Brain Res* 47(1–2):183–194.
- Liu G, Gu B, He XP, Joshi RB, Wackerle HD, Rodriguez RM, Wetsel WC, McNamara JO (2013) Transient inhibition of TrkB kinase after status epilepticus prevents development of temporal lobe epilepsy. *Neuron* 79(1):31–38.
- Martínez-Levy GA, Cruz-Fuentes CS (2014) Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. *Yale J Biol Med* 87:173–186.
- Mathern GW, Babb TL, Micevych PE, Blanco CE, Pretorius JK (1997) Granule Cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Mol Chem Neuropathol* 30:53–76.
- Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, Bus BA, Penninx BW, Elzinga BM (2014) Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N = 9484). *Mol Psychiatry* 19:791–800.
- Mudó G, Jiang XH, Timmusk T, Bincioni M, Belluárcó N (1996) Change in neurotrophins and their receptor mRNAs in the rat forebrain after status epilepticus induced by pilocarpine. *Epilepsia* 37(2):198–207.
- Murray KD, Isackson PJ, Eskin TA, King MA, Montesinos SP, Abraham LA, Roper SN (2000) Altered mRNA expression for brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in the hippocampus of patients with intractable temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 418(4):411–422.
- Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM (2008) Activity-dependent suppression of miniature neurotransmission through the regulation of DNA methylation. *J Neurosci* 28:395–406.
- Paradiso B, Marconi P, Zucchini S, Berto E, Binaschi A, Bozac A, Buzzi A, Mazzuferi M, Magri E, Navarro Mora G, Rodi D, Su T, Volpi I, Zanetti L, Marzola A, Manservigi R, Fabene PF, Simonato M (2009) Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (17):7191–7196.
- Paradiso B, Zucchini S, Su T, Bovolenta R, Berto E, Marconi P, Marzola A, Navarro Mora G, Fabene PF, Simonato M (2011) Localized overexpression of FGF-2 and BDNF in hippocampus reduces mossy fiber sprouting and spontaneous seizures up to 4

- weeks after pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsia* 52:572–578.
- Parrish R, Albertson AJ, Buckingham SC, Hablitz JJ, Mascia KL, Davis Haselden W, Lubin FD (2013) Status epilepticus triggers early and late alterations in brain-derived neurotrophic factor and NMDA glutamate receptor Grin2b DNA methylation levels in the hippocampus. *Neuroscience* 17(248):602–619.
- Pattabiraman PP, Tropea D, Chiaruttini C, Tongiorgi E, Cattaneo A, Domenici L (2005) Neuronal activity regulates the developmental expression and subcellular localization of cortical BDNF mRNA isoforms in vivo. *Mol Cell Neurosci* 28(3):556–570.
- Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K (2007) Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing and multiple promoters. *Genomics* 90(3):397–406.
- San-Juan D, Tapia CA, González-Aragón MF, Martínez Mayorga A, Staba RJ, Alonso-Vanegas M (2011) The prognostic role of electrocorticography in tailored temporal lobe surgery. *Seizure* 20:564–569.
- Santos AR, Duarte CB (2008) Validation of internal control genes for expression studies: effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 86:3684–3692.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C<sub>T</sub> method. *Nat Protoc* 3(6):1101–1108.
- Shetty AK, Zaman V, Shetty GA (2003) Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting. *J Neurochem* 87(1):147–159.
- Shi XY, Wang JW, Cui H, Li BM, Lei GF, Sun RP (2010) Effects of antiepileptic drugs on mRNA levels of BDNF and NT-3 and cell neogenesis in the developing rat brain. *Brain Dev* 32(3):229–235.
- Simonato M, Tongiorgi E, Kokaia M (2006) Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 27(12):631–638.
- Takahashi M, Hayashi S, Kakita A, Wakabayashi K, Fukuda M, Kameyama S, Tanaka R, Takahashi H, Nawa H (1999) Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain Res* 818:579–582.
- Tian F, Hu XZ, Wu X, Jiang H, Pan H, Marini AM, Lipsky RH (2009) Dynamic chromatin remodeling events in hippocampal neurons are associated with NMDA receptor-mediated activation of BDNF gene promoter 1. *J Neurochem* 109:1375–1388.
- Tongiorgi E, Armellin M, Giulianini PG, Bregola G, Zucchini S, Paradiso B, Steward O, Cattaneo A, Simonato M (2004) Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. *J Neurosci* 24(30):6842–6852.
- Tongiorgi E, Domenici L, Simonato M (2006) What is the biological significance of BDNF mRNA targeting in the dendrites? Clues from epilepsy and cortical development. *Mol Neurobiol* 33(1):17–32.
- Walczak A, Szczepankiewicz AA, Ruszczycki B, Magalska A, Zamlynska K, Dzwonek J, Wilczek E, Zybura-Broda K, Ryłski M, Malinowska M, Dabrowski M, Szczepinska T, Pawłowski K, Pyskaty M, Włodarczyk J, Szczerbal I, Switonski M, Cremer M, Wilczynski GM (2013) Novel higher order epigenetic regulation of the BDNF gene upon seizures. *J Neurosci* 33:2507–2511.
- Wang FJ, Li CM, Hou XH, Wang XR, Zhang LM (2011) Selective upregulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts and BDNF direct induction of activity independent N-methyl-D-aspartate currents in temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. *J Int Med Res* 39(4):1358–1368.
- Werschke S, Gigout S, Horn P, Lehmann TN, Dehnicke C, Bräuer AU, Deisz RA (2010) Evaluating reference genes to normalize gene expression in human epileptogenic brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 403:385–390.
- Wong J, Hyde TM, Cassano HL, Deep-Soboslay A, Kleinman JE, Weickert CS (2010) Promoter specific alterations of brain-derived neurotrophic factor mRNA in schizophrenia. *Neurosci* 169:1071–1084.
- Xu B, Michalski B, Racine RJ, Fahnestock M (2004) The effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration on kindling induction, Trk expression and seizure-related morphological changes. *Neuroscience* 126(3):521–531.

(Accepted 19 November 2015)  
(Available online 24 November 2015)

Anexo 2: Artículo de revisión BDNF  
**Genetic and epigenetic regulation of  
the Brain Derived Neurotrophic Factor  
in the Central Nervous system**

REVIEW

## Genetic and Epigenetic Regulation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Central Nervous System

Gabriela A. Martínez-Levy and Carlos S. Cruz-Fuentes\*

*Psychiatric Genetics Department, Clinical Research Branch, National Institute of Psychiatry Ramón de la Fuente Muñiz, Mexico City, Mexico*

The BDNF is required for the development and proper function of the central nervous system, where it is involved in a variety of neural and molecular events relevant to cognition, learning, and memory processes. Although only a functional mature protein is synthesized, the human *BDNF* gene possesses an extensive structural complexity, including the presence of multiple promoters, splicing events, and 3' UTR poly-adenylation sites, resulting in an intricate transcriptional regulation and numerous messengers RNA. Recent data support specific cellular roles of these transcripts. Moreover, a central role of epigenetic modifications on the regulation of *BDNF* gene transcription is also emerging. The present essay aims to summarize the published information on the matter, emphasizing their possible implications in health and disease or in the treatment of different neurologic and psychiatric disorders.

---

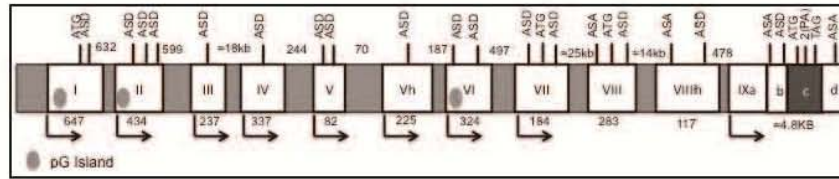
\*To whom all correspondence should be addressed: Carlos S Cruz Fuentes, Calzada México Xochimilco 101, Colonia San Lorenzo Huipulco, Delegación Tlalpan, CP 14370, México DF; Tele: 0155-41605073; Fax: 0155-55133722; Email: cruz@imp.edu.mx.

†Abbreviations: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; NT, neurotrophin; NS, nervous system; LTP, long-term potentiation; proBDNF, BDNF immature isoform; ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis; pre-pro-BDNF, precursors of proBDNF; p, promoter; miRNAs, small non-coding RNAs; Ca<sup>++</sup>, calcium; VGCC, voltage gated calcium channels; AP1RE, Adaptor Protein 1 Response Element; PasRE, Pas Response element with a reverse direction; CRERE, AMPc/Ca<sup>++</sup> Response Element; CaRE, calcium response element type 1; UBERE, Upstream Stimulatory Factor Binding Response Element; bHLHB2RE, Basic Helix Loop Helix B2 Response Element; NFκβRE, Nuclear Factor κβ Response Element; NFATRE, Nuclear Factor of Activated T cells Response Element; 5azadC, 5-azacitidine; Neuro2A, mouse neural crest-derived cell 2A; TSA, Trichostatin A; H, Histone; MeCP2, methyl-CpG binding protein 2; HDAC1, Type I histone deacetylase; AMPc, cyclic Adenosin monophosphate; Gaad45B, DNA-damage-inducible 45B protein; CBP, CREB binding protein; UTR, untranslated region; TrKB, Tyrosine kinase receptor B; P, postnatal day; SERT, serotonin transporter; JNK, Jun Kinase; PI3PK, phosphatidylinositol-3 phosphate kinase; BPD, borderline personality disorder.

Keywords: BDNF, alternative promoters, transcripts, epigenetic, psychiatric and neurological disorders

Author contributions: GAML: Search of bibliography; review, summary and discussion of the information, draft of the work; CSCF: Discussion of the reviewed information, evaluation and comments of the draft.





**Figure 1. BDNF human gene structure.** The white boxes indicate exons, the numbers below show the base pairs that comprise them. The grey spaces point to introns, and the numbers above the base pair that constitute them. The arrows designate the alternative start transcription sites. ASD represents Alternative Splicing donors, while ASA represents Alternative Splicing acceptor sites; the ATG symbols indicate start translation codons. The PA inscription correspond to alternative poly-adenylation sites, and the TAG mark designates the only termination codon for translation within this gene. It is important to point out that the 5' regions of exon I, II, III, IV, V, VI, VII, and IX correspond to independent promoters that regulate the expression of at least 17 transcripts and that exon I, II, and VI present CpG islands that in this figure are marked by ovals. Finally, the region c of exon IX marked with dark grey corresponds to the codification region of proBDNF.

## INTRODUCTION

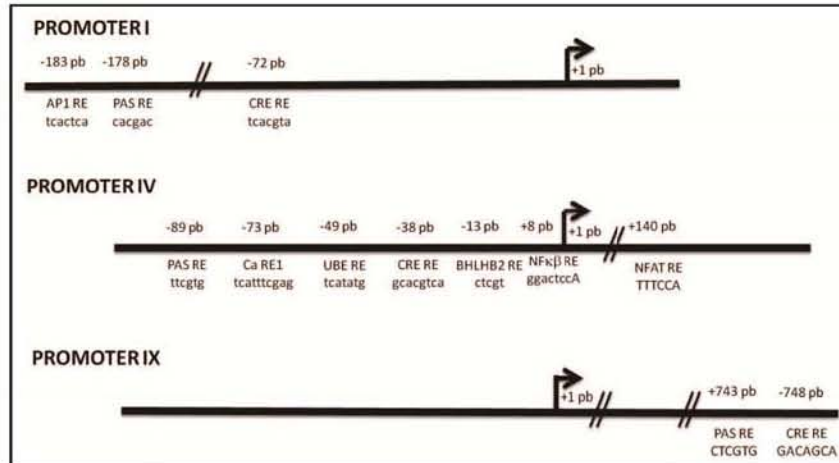
The Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF<sup>†</sup>), purified from the porcine brain in 1982 by Barde et al. [1], is member of the neurotrophins (NTs) family, is involved in the development of the vertebrate nervous system (NS) [2,3], and regulates synaptic plasticity in the adult brain, influencing the migration of axons and adjusting the number and size of dendrite spines in neurons [4]. It is also involved in neurogenesis [5] and synaptogenesis [6] and facilitates the physiological mechanism of long-term potentiation (LTP) in hippocampus [7], so it has been associated with processes of learning and memory [8]. In contrast, the immature isoform (proBDNF) has been associated with the activation of neural apoptosis [9] and facilitation of long-term depression in hippocampus [10].

In addition to its neurotrophic function, BDNF strongly promotes cell survival in various animal models of neurological disorders such as the Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), Parkinson's and Alzheimer's diseases [11], and epilepsy [12]. Moreover, the observation that the *in vitro* application of some antidepressant drugs increases the levels of BDNF [13] supports a relevant role of this neurotrophin in the patho-physiology of depression [14]. Overall, this leads to consider that failures in the regulation of BDNF synthesis could be related to diverse neurological and psychiatric disorders [15], as well

as sustains the proposal of its possible therapeutic use [11-13].

The *BDNF* possess a structural and functional complexity reflected in 1) the presence of multiple gene promoters; 2) the expression of multiple transcripts, susceptible to alternative splicing events and/or different poly-adenylation patterns; 3) the synthesis of diverse precursor isoforms (pre-pro-BDNF), but only a single mature molecule; 4) the activation of two different receptors regulating opposite effects. In summary, all of these features imply the existence of a very selective molecular mechanism that regulates the proper production of BDNF [16,17].

This review will attempt to summarize the complex *BDNF* transcription regulation, taking into consideration relevant epigenetic mechanisms. A strong similarity in sequence and gene structure for *BDNF* among vertebrates is acknowledged; therefore, although some important aspects of the human *BDNF* gene are still unknown, inferences can be obtained from other species. For instance, the *BDNF* 5' exon sequence identity among the human (*Homo sapiens*), rodent (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*), and fish (*Dicentrarchus labrax*) ranges from 95 percent to 38 percent, with the exon II showing the highest value ( $\approx 90\%$ ) [18]. In the same way, exon I, IV, and VI are quite similar when rodents and humans are compared [15]. Moreover, they share the same alternative 5' exon splicing mechanism [15,18].



**Figure 2.** Structure of the human BDNF promoters pI, pIV, and pIX. Describes the transcription factors that *in vitro* studies have demonstrated that can join this gene. The arrows correspond to the site where the start transcription codon is located. The numbers above the line indicate the base pairs where the consensus regions for each transcription factor were identified. The legends below the line specify the transcription factor that binds to that locus and the sequence of nucleotides important for that. Abbreviations: AP1 RE: Adaptor Protein 1 Response Element; Pas RE: Pas Response Element with a reverse direction; CRE RE: cAMP/Ca<sup>++</sup> Response Element; Ca RE1: Calcium Response Element type 1; UBE RE: Upstream Stimulatory Factor Binding Response Element; bHLHB2 RE: Basic Helix Loop Helix B2 Response Element; NFκB RE: Nuclear Factor κB Response Element; NFAT RE: Nuclear Factor of Activated T cells Response Element.

We will also attempt to discuss the putative implication of these molecular events to health and disease. Other important cellular processes involved in the proper function of the mature protein as the regulation of post-translational modifications or the constitutive or regulated secretion will not be covered here.

#### HUMAN BDNF GENE STRUCTURE

The human *BDNF* gene is located at chromosome 11, region p13-14. The current expert agreement indicates the existence of 11 exons (Figure 1), nine of which contain a specific promoter that regulates its expression [17,19]. Although the use of alternative promoters is not uncommon (i.e., the presence of two to three promoters has been described in approximately 50 percent of the human genes [20]), the existence of nine different promoter sequences is an exceptional characteristic of the *BDNF* gene. Moreover, the intron-exon boundaries possess the ar-

chetypal GU-AG consensus signals for alternative splicing events [19,21].

Additionally, an interesting but frequently ignored feature of the structure of the *BDNF* gene is the existence of a 200 kb antisense region that includes 10 exons transcribed from a single promoter [22] with the ability to synthesize a wide variety of anti-BDNF small non-coding RNAs (miRNAs) [17,19,20].

As illustrated in Figure 2, a number of DNA binding sites for distinct transcription factors have been characterized in the different promoters of the rodent *BDNF* gene [23-26]. Interestingly, an increase in intracellular calcium (Ca<sup>++</sup>) levels has been associated with the activation of these binding sites [27,28]. This is relevant because it has been described that either the activation of glutamate receptors or voltage-gated calcium channels (VGCC) promotes the differential expression of particular BDNF transcripts [29,30]. Intriguingly, in cultured primary neurons obtained from a transgenic mice to which the

human *BDNF* gene was inserted, the Calcium Response Element (CaRE), the Nuclear Factor Activated T cells Response Element (NFATRE), and the Nuclear Factor  $\kappa\beta$  Response Element (NF $\kappa\beta$ RE) [19] — activated by an influx of  $Ca^{++}$  in the rodent *BDNF* gene after the glutamate receptor stimulation [31-34] — showed otherwise to be insensitive to the neural depolarization elicited by the activation of L-type VGCC [19]. These results underscore the notion that the involvement of specific intracellular second messenger pathways (activated by intracellular  $Ca^{++}$ ) dictates the expression of different BDNF transcripts, possibly via the synthesis and binding of different transcription factors to a particular promoter sequence [35].

Moreover, the preferential activation of certain promoters could have a significant role in the susceptibility of developing certain neurological or psychiatric disorders [15,22], as exemplified in reports on depression [36], bipolar disorder [37], schizophrenia [37,38], epilepsy [39], and Alzheimer's disease [40], where changes in the *BDNF* expression have been described.

#### EPIGENETIC REGULATION OF *BDNF*

Other molecular events involved in the regulation of *BDNF* expression are those related to the epigenetic modifications. In a broad sense, epigenetics refers to the way in which chromatin structure is remodeled without affecting the sequence of nucleotides within the DNA. For many years, these processes were only implicated in cellular differentiation and development; however, it is currently recognized that they are also relevant for differentiated cells [41-44]. A case in point are neurons in which the cell plasticity, necessary for processes of learning and memory, needs to be long-lasting or permanent; therefore, epigenetic mechanisms could help to explain, for example, why neurons do not actively divide [45].

Experimental results obtained from *in vitro* and animal models support the role of epigenetics mechanisms on the regulation of *BDNF* gene expression. For instance, the *in*

*silico* analysis of the gene sequence shows a number of CpG islands in promoters (p) pI, pII and pIV of the human gene and pI, pII, pIV, pV, pVI, and pIX in the rodent gene [16]. Moreover, the treatment with the DNA methyl inhibitor 5-azacitidine (5azadC) stimulates the expression of exons I, IV, V, VIII, and IX in C6 rat glioma cells and exons I, III [15] and IV [46] in mouse neuroblastoma cells (Neuro2A). On the other hand, addition of the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A (TSA) promotes an increased expression of exons III, VII, and VIII in C6 cells, although it did not affect the expression of any transcript in Neuro2A cells [15]. Nonetheless, in the latter example, an increment in the expression of exon I and IV was detected when higher concentrations of TSA were used, an outcome also linked with an increase in Histone (H) 3 and H4 acetylation in the *BDNF* pI, an epigenetic mark linked with gene expression [46]. Interestingly, in the latter study, the highly methylated status of the 5' proximal region of the *BDNF* exon I — but not the exon IV — observed under basal conditions disappears after treatment with 5AzadC [46]. As a whole, these results suggest that there must be an extremely specific epigenetic regulation of *BDNF* expression regarding promoters and cell types.

On the other hand, several molecules participate in the epigenetic regulation of *BDNF*. One example is the methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2), identified by its ability to add methyl groups in the genome [47] and for recruiting the type I histone deacetylase (HDAC1) Sin3A [48]. It was recently described in cultured mouse cortical neurons that the MeCP2-Sin3A complex generates a long-term inhibition of the *BDNF* pIV [49]. Moreover, the experimental observation of the phosphorylation and further dissociation of MeCP2 from this locus, either after depolarization of cultured rat neurons [28,49,50] or following the activation of the cyclic adenosin monophosphate (AMPC) pathway in the human neuroblastoma cells [51], support a relevant role of MeCP2 in the regulation of *BDNF* gene expression.

**Table 1. Epigenetic effects of the pharmacological treatment for neuropsychiatric disorders.**

| Reference | Treatment     | Model                    | mRNA BDNF  | Epigenetic   | Brain region         |
|-----------|---------------|--------------------------|------------|--|----------------------|
| [59]      | Fluoxetine    | Perinatal stress in rats | ↑          | ↑ H3 acetylation in pIV                                      | Hippocampus          |
| [60]      | Imipramine    | Social defeated mice     | ↑          | ↑ H3 acetylation in pIV and pVI and H3K9 methylation in pIII | Hippocampus          |
| [61]      | Valproic acid | Fear conditioning rats   | ↑ IV       | ↑ H3 acetylation in pIV                                      | Prefrontal cortex    |
| [62]      |               | <i>In Vitro</i>          | ↑ I and IV | ↑ H3 and H4 acetylation in pI and H4 acetylation in pIV      | Rat cortical neurons |

Another relevant instance is the growth arrest and DNA damage-inducible 45B protein (Gadd45B) involved in the demethylation of neurogenesis-related genes [44,52]. This molecule binds to pIX of the rat gene, promoting hippocampal neurogenesis [44,53]. Additional germane examples with a putative epigenetic effect over this neurotrophin are 1) the transcription factor NF $\kappa$ B, since a di-methylation of lysine 4 residue at H3 histone on the *BDNF* pI has been detected in a locus containing a potential NF $\kappa$ B binding site [54]; and 2) the CREB binding protein (CBP), which adds acetyl groups to histones in other gene sequences (like the Major Histocompatibility Complex class II gene) [55,56]. It is known that CREB binds to different *BDNF* promoters (Figure 2) [19,23], although it remains to be demonstrated that the complex CREB/CBP can acetylate histones at *BDNF* specific loci.

Lastly, the anti-BDNF transcripts (miRNAs) may also have the potential to regulate the expression of this neurotrophin through epigenetic mechanisms. For instance, *in vitro* studies show that these molecules can diminish both the expression of mRNA and synthesis of the protein through the recruitment of EZH2, a methyl-transferase promoting the three-methylation of lysine 27 residue at H3 on the *BDNF* locus, an epigenetic mark frequently linked with repression of transcription [20]. Moreover,

the genetically engineered over-expression of miRNA 212 in the rat striatum decreases the BDNF protein levels through deactivation of MeCP2 [57]. However, no changes were observed in the expression of *BDNF* after exposure to an enrichment environment in which an increment of mir124, mir132, mir133, and mir14 were also noted [58].

It is worth to note that epigenetic marks in different promoters of the murine *BDNF* gene have been described in relation to several "external/environmental" events like consumption of cocaine, stress in the early stages of life, memory related to fear, voluntary exercise, and enriched environment [16], as well as after psychopharmacological manipulation (Table 1) [59-62]. Remarkably, in some of these studies, there is a significant correlation among specific histone modification, DNA methylation patterns at pI, pIV, and pVI, and changes in the expression of the correspondent transcripts [61-63]. Unfortunately, changes in epigenetic marks related to neuropsychiatric disorders has been analyzed only recently in a limited number of studies (Table 2) [64-74].

#### TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF BDNF

As result of the existence of multiple promoters and alternative splicing events, at

**Table 2. Epigenetic modification in *BDNF* human gene.**

| Reference | Study Subjects                | Variables                    | BDNF   | Epigenetic Changes                     | Tissue                              | Sample Status  |
|-----------|-------------------------------|------------------------------|--|--|-------------------------------------|----------------|
| [64]      | Schizophrenia                 | BDNF Val66Met SNP            |  | ↓ Methylation at exon IX               | Frontal cortex                      | Post-mortem    |
| [65]      | Suicide victims               | Suicide death                | ↓ mRNA and protein                                   | ↑ Methylation at pIV                   | Wernicke Area                       | Post-mortem    |
| [66]      | Healthy adolescents           | Smoking during pregnancy     |  | ↑ Methylation at pVI, but no at pIV    | Peripheral blood                    | <i>In vivo</i> |
| [67]      | Mother                        | Prenatal maternal depression |  | Any effect                             | Peripheral blood and umbilical cord | <i>In vivo</i> |
| [68]      | Depression                    | Antidepressant treatment     | ↑ mRNA   | ↓ H3K27me3 at pIV                      | Frontal cortex                      | Post-mortem    |
| [69]      | Alzheimer and bipolar disease | Cases vs. controls           | ↓ mRNA   | ↑ Methylation                          | Frontal cortex                      | Post-mortem    |
| [70]      | Bipolar disorder              | Cases vs. controls           | ↓ mRNA   | ↑ Methylation at pI                    | Peripheral blood                    | <i>In vivo</i> |
| [71]      | Schizophrenia                 | Cases vs. controls           | ↑ mRNA   | ↓ Methylation                          | Peripheral blood                    | <i>In vivo</i> |
| [72]      | Bipolar disorder              | Cases vs. controls           | ↑ protein but not associated with methylation status | ↑ Methylation at pI and exon IV        | Peripheral blood                    | <i>In vivo</i> |
| [73]      | Post-stroke depression        | Presence of depression       |  | ↓ Methylation                          | Peripheral blood                    | <i>In vivo</i> |
| [74]      | Major depression disorder     | Antidepressant treatment     | ↓ protein (non significant)                          | ↓ Methylation at pIV in non-responders | Peripheral blood                    | <i>In vivo</i> |

least 17 transcripts with different 5' and 3'UTR (untranslated region) segments could be synthesized from the *BDNF* human gene [17]. Nonetheless, all these messengers share a common coding region included in exon IX that comprises the complete sequence of the proBDNF molecule. Additionally, this exon contains two poly-adenylation sites generating transcripts with either a long or a short 3' UTR [17]. The putative functional relevance of this structural feature is revealed by animal model studies showing that mRNAs with a long 3' UTR are primarily located in dendritic spines [75] and only translated in response to neuronal activation. In contrast,

those with a short 3'UTR are actively translated in the soma to maintain the protein BDNF basal levels [76].

Furthermore, a preferential location of specific transcripts, in particular cellular compartments, has been described. For example, in the rodent visual cortex and hippocampus, the messengers from exons I and IV are predominantly expressed near the neural soma, whereas those generated from exons II and VI are mainly located in distal dendrites [77-79]. Interestingly, the aforementioned transcriptional compartmentalization appears to have functional consequences, as indicated by recent *in vitro* experiments in which the

**Table 3. Changes In BDNF transcript expression in humans.**

| Reference | Variables                | Changes in BDNF transcript expression | Tissue          | Samples status |
|-----------|--------------------------|---------------------------------------|-----------------|----------------|
| [88]      | Alzheimer's              | ↓ I, II and IV                        | Parietal Cortex | Post-mortem    |
| [89]      | Cocaine Addiction        | ↓ I and IV                            | Cortex          | Post-mortem    |
| [89]      | Cocaine Addiction        | ↓ IV                                  | Cerebellum      | Post-mortem    |
| [90]      | Schizophrenia            | ↓ II                                  | Frontal Cortex  | Post-mortem    |
| [90]      | Antidepressant Treatment | ↓ I, II, IV and VI                    | Frontal Cortex  | Post-mortem    |
| [90]      | Antidepressant Treatment | ↓ I and II                            | Parietal Cortex | Post-mortem    |
| [90]      | Antidepressant Treatment | ↓ IV                                  | Hippocampus     | Post-mortem    |

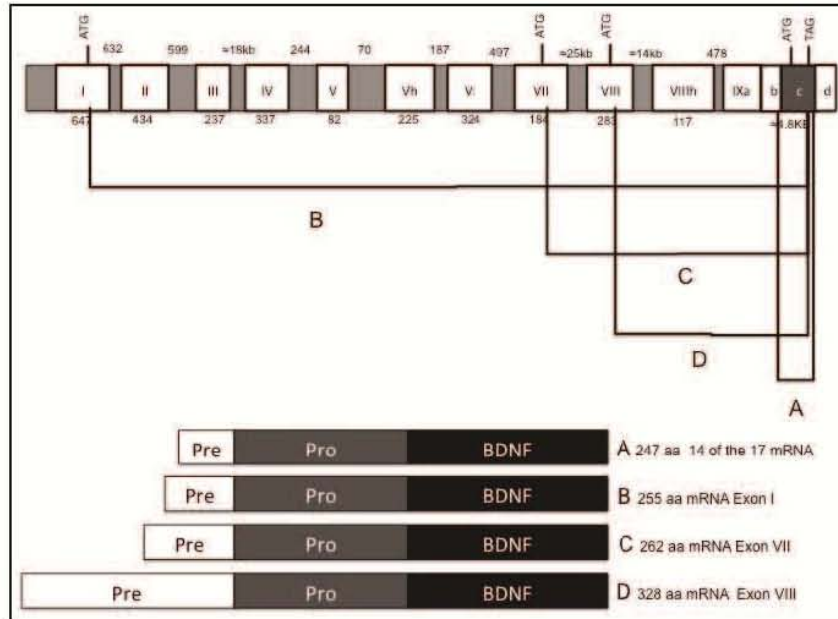
over expression or silencing of these specific BDNF 5' splice variants affect in a spatial fashion the dendritic branching and phosphorylation of the BDNF Tyrosine Kinase B (TrkB) receptor. These experimental data also suggest that the different splice variants could represent a spatial code used by neurons to target the effects of BDNF to distinct neural compartments [80].

Finally, although the BDNF expression along the ontogeny of the brain has been described elsewhere [81,82], the analysis of the different transcripts has been barely addressed. For instance, Pattabiraman et al. [77] noted a pattern of differential expression in the rat visual cortex of various splicing forms at different postnatal days (P). In this brain area, exons IV and VI were noticeable at P13 (a developmental early period linked with the start of eye opening), while exons I and II were detected only until P40 (a mature stage of this sensory cortex and where monocular deprivation has no effect). Moreover, an important increase in the expression of exons IV, and in lesser extent, exon VI, is observed, an effect that remains stable throughout adulthood (P90). Interestingly, it was also found that the expression of exons II, IV, and VI were importantly reduced at P40 in the occipital cortex, as a consequence of temporary blocking the electrical activity of retinal ganglion cells,

suggesting a link between the rat visual experience and the *BDNF* gene transcription during the critical period of formation of ocular dominance columns in the Visual Cortex [83,84]. Unfortunately, an equivalent developmental event in the human visual cortex has not been yet described.

On the other hand, the developmental BDNF expression in the human Dorsolateral Prefrontal Cortex was recently reported [85]. In this cortical region, exons I and VI were steadily expressed throughout the first phases of infancy (neonate, infant, toddler) but decline in the following years (6 to 40 years). In contrast, transcripts II and IV, barely detected in neonates, increased their expression in infants and toddlers to finally diminish and reach a steady level from 5 years through adolescence and adulthood. These data show important brain regional and temporal variation in *BDNF* expression and important differences among species.

Another putative implication of the expression of this neurotrophin during development was recently discussed by Calabrese et al. [86], who reported that compared to wild type animals, SERT (serotonin transporter) knockout rats displayed a reduced expression of BDNF transcripts I, IV, VI in ventral hippocampus and prefrontal cortex 1 to 4 weeks after birth. The simultaneous decrease of both SERT



**Figure 3. BDNF protein products.** Shows the protein isoforms that can be synthesized from the *BDNF* gene and the transcripts that give them origin.

and BDNF in these animals seems to explain the evident signs of depression and anxiety observed in these genetically modified animals [87], probably affecting neural plasticity. Moreover, it is tempting to assume that changes at critical time windows of development of the expression of this neurotrophin can increase the risk for mood/anxiety, particularly in those individuals carrying certain genetic variants of the SERT [86].

In summary, there is solid experimental evidence of the existence of multiple BDNF transcripts with apparently distinct functional properties. Further studies are encouraged, as the accurate time and spatial description of the splice variants might provide key information about the particular cell types or neuronal circuits involved in specific neuropsychiatric disorders, also stimulating the development of alternative pharmacological treatments [80]. Regrettably, only few studies have determined the expression of more than a single transcript at once (Table 3) [88-90].

### POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS AND BDNF ISOFORMS

As illustrated in Figure 3, exons I, VII, VIII, and IX possess an alternative translation start codon, but only exon IX includes a translation stop codon. Therefore, theoretically, four different pre-pro-BDNF protein isoforms could be synthesized differing in an extended amino terminal region according to the particular transcribed exon (exon I, VI, and VIII: 8, 15 and 81 amino acids, respectively) [17]. It has been proposed that the length of the pre-domain could affect the intracellular BDNF trafficking, with the longer versions preferentially promoting the secretion of the immature isoform [15].

In the brain, the 32 kDa proBDNF can experience at least three final paths: 1) to be edited mainly in Golgi and secreted as the mature BDNF molecule; 2) to be secreted as proBDNF and processed to mature BDNF in the synaptic space; or 3) to be secreted as proBDNF without any subsequent digestion [91]. In any case, the proper understanding

of the different mechanisms and circumstances associated with the neurotrophin secretion will be of great biological relevance as the fine-tuned equilibrium between the different isoforms could dictate different physiological outputs.

ProBDNF binds to the receptor p75 (a member of the tumor necrosis factor receptor family). This binding has been associated with the boosting of long-term depression in neurons of the hippocampus [10] and neuronal pruning in the nervous system [92] or with initiating programmed neuronal death [93]. Similar effects have also been reported when proBDNF binds to the hetero-dimeric p75/sortilin receptor [94]. Moreover, the p75 receptor can also be associated with the Nogo receptor complex (NogoR, Lingo, p75NTR) that mediates inhibition of axon growth [95]. In any case, the binding of proBDNF to p75 activates the Jun kinase signal cascade pathway (JNK), more specifically triggering JNK3 [93], causing apoptosis through the activation of p53 tumor suppressor gene and caspases [95]. Moreover, proBDNF/p75 also activates the small GTPase RhoA and its downstream effector Rho Kinase that has been associated to inhibition of neurite outgrowth [96].

On the other hand, the mature BDNF molecule has an important affinity for TrkB ( $K_d = 9.9 \times 10^{-10}$  M) [97]. Binding to this membrane receptor has been related to the increase of synaptic transmission and plasticity, neural proliferation and survival, and axonal sprouting [91,92]. In the absence of TrkB, mature BDNF could also bind to p75 receptor in order to regulate axon pruning [91,92]. The BDNF/TrkB interaction leads to the activation of three intracellular signaling cascades: 1) the phospholipase C; 2) the phosphatidylinositol-3 phosphate kinase (PI3K); or 3) the kinases regulated by extracellular signals. These mechanisms promote calcium entrance into the cell that leads to an increment in gene expression, associated with cellular differentiation [8] and dendrite formation [98]. Moreover, TrkB activation stimulates AKT signaling pathway through PI3K to modulate cell survival [99,100].

As previously mentioned, the transcripts with a long 3'UTR are located

mainly to distal dendrite. This could largely lead to the secretion of the proBDNF molecule, as this neural compartment does not possess Golgi [75]. Remarkably, in the fish *Dicentrarchus labrax*, the differential expression of BDNF transcripts after stress can produce an increment in the secretion of proBDNF [18]. To our knowledge, no single study has evaluated if the differential expression of BDNF transcripts could affect the proportion of which proBDNF and BDNF isoforms are secreted in the human brain, information that could have important implications for neuropsychiatric disorders.

## CONCLUSION

As revealed by the increasing number and variety of papers in recent years related to a very broad spectrum of BDNF-associated topics, including health, disease, neuroscience, or cognition, this neurotrophin has become a paradigmatic example of a "multitask" neural molecule.

More specifically, the multiple neural functions associated with its effects in the nervous system have foreseen certain therapeutic applications for a variety of neurological and psychiatric disorders, including ALS, epilepsy, depression, Parkinson's, and Alzheimer's disease [11,12,14,101]. Of special interest is the case of ALS, where the administration of BDNF (and other neurotrophins) has been already evaluated in humans. Although the preclinical studies appeared promising, phase III trials showed only minimal beneficial effects for a subgroup patients (e.g., those in an advanced stage of the disease) [101], a failure probably related to the complex regulation of BDNF within the nervous system.

Moreover, the recent description of an accurate distinction between patients with major depression or healthy controls, based on the methylation profiles of CpG units within the *BDNF* pI in peripheral samples (e.g., leucocytes, blood mononuclear cells), envisage its putative use as an efficient diagnostic biomarker of depression [102].

This approach has been recently attempted for other psychiatric conditions



such as schizophrenia [71], borderline personality disorder (BPD) [72], depression after a stroke event [73], and bipolar disorder [70], or as a surrogate marker of clinical response for psychopharmacological response in depression [74,102] or psychotherapy in BPD [72]. Interestingly, in the latter example, the methylation status of *BDNF* was positively associated with the history of child maltreatment [72], showing that this neurotrophin is an important modulator of the gene/environment interplay, as we have previously reported by evaluating the genetic variance of BDNF in depressive patients [103].

As it has been highlighted in this review, the functional effects of this molecule in a particular brain region would depend on multiple time/location-regulated molecular events, including the synthesis of their different transcripts; the presence of specific transcription factors; the recruitment of molecules with epigenetic effects; and the activation of particular receptors; among others. Moreover, epigenetic mechanisms that seem to be strongly dependent on external/environmental events must be included in this complex molecular equation. This is particularly important to neuropsychiatry stimulating new avenues for clinical experimentation (e.g., by using methylation/acetylation histones-modifying drugs) as currently attempted in cancer treatment.

In any case, further investigation at clinical and basic levels of BDNF production is warranted.

**Acknowledgments:** This review article constitutes a partial requisite to obtain the PhD grade in the postgraduate program of Biological Sciences at the National Autonomous University of Mexico (UNAM) for GAM-L.

#### REFERENCES

1. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1(5):549-553.
2. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 2004; 22(3):123-31.
3. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signaling in health and disease. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(2):167-73.
4. Tongiorgi E. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dentrites: facts and open questions. *Neurosci Res*. 2008;61(4):335-46.
5. Lee E, Son H. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep*. 2009;42(5):239-44.
6. Alsina B, Vu T, Cohen-Cory S. Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nat Neurosci*. 2001;4(11):1093-101.
7. Mei F, Nagappan G, Ke Y, Sacktor TC, Lu B. BDNF facilitates L-LTP maintenance in the absence of protein synthesis through PKM $\zeta$ . *PLoS One*. 2011;6(6):e21568.
8. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*. 2010;9:3:1.
9. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*. 2005;25(22):5455-63.
10. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, et al. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*. 2005;8(8):1069-77.
11. Nagahara AH, Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(3):209-19.
12. Simonato M, Zucchini S. Are the neurotrophic factors a suitable therapeutic target for the prevention of epileptogenesis? *Epilepsia*. 2010;51(Suppl 3):48-51.
13. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. 1995;15(11):7539-47.
14. Castrén E, Rantamäki T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol*. 2010;70(5):289-97.
15. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res*. 2007;85(3):525-35.
16. Boule F, Van den Hove DL, Jakob SB, Rutten BP, Hamon M, Van Os J, et al. Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. 2011;17(6):584-96.
17. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*. 2007;90(3):397-406.
18. Tognoli C, Rossi F, Di Cola F, Baj G, Tongiorgi E, Terova G, et al. Acute stress alters transcript expression pattern and reduces processing of proBDNF to mature BDNF in *Dicentrarchus labrax*. *BMC Neurosci*. 2010;14(11):4.
19. Pruunsild P, Sepp M, Orav E, Koppel I, Timmusk T. Identification of cis-elements and

- transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *J Neurosci*. 2011;31(9):3295-308.
20. Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, et al. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res*. 2006;16(1):55-65.
  21. Modarresi F, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, Fatemi RP, Magistri M, Brothers SP, et al. Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional up regulation. *Nat Biotechnol*. 2012;30(5):453-9.
  22. Davuluri RV, Suzuki Y, Sugano S, Plass C, Huang TH. The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends Genet*. 2008;24(4):167-77.
  23. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*. 1998;20(4):709-26.
  24. Timmusk T, Palm K, Lendahl U, Metsis M. Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restrictive silencer element. *J Biol Chem*. 1999;274(2):1078-84.
  25. Tabuchi A, Sakaya H, Kisukeda T, Fushiki H, Tsuda M. Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. *J Biol Chem*. 2002;277(39):35920-31.
  26. Tao X, West AE, Chen WG, Corfas G, Greenberg ME. A calcium-responsive transcription factor, CaRF that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron*. 2002;33(3):383-95.
  27. Marnigère F, Rage F, Tapia-Arancibia L. Regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts by neuronal activation in rat hypothalamic neurons. *J Neurosci Res*. 2001;66(3):377-89.
  28. West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, et al. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(20):11024-31.
  29. Mellstrom B, Torres B, Link WA, Naranjo JR. The BDNF gene: exemplifying complexity in Ca<sup>2+</sup>-dependent gene expression. *Crit Rev Neurobiol*. 2004;16(1-2):43-9.
  30. Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, et al. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*. 1993;10(3):475-89.
  31. Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, et al. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science*. 2003;302(5646):885-9.
  32. Jiang X, Tian F, Du Y, Copeland NG, Jenkins NA, Tessarollo L, et al. BHLHB2 controls Bdnf promoter 4 activity and neuronal excitability. *J Neurosci*. 2008;28(5):1118-30.
  33. Vashishta A, Habas A, Pruunsild P, Zheng JJ, Timmusk T, Hetman M. Nuclear factor of activated T-cells isoform c4 (NFATc4/NFAT3) as a mediator of antiapoptotic transcription in NMDA receptor-stimulated cortical neurons. *J Neurosci*. 2009;29(48):15331-40.
  34. Quadrato G, Benevento M, Alber S, Jacob C, Floriddia EM, Nguyen T, et al. Nuclear factor of activated T cells (NFATc4) is required for BDNF-dependent survival of adult-born neurons and spatial memory formation in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(23):E1499-508.
  35. Zheng F, Zhou X, Luo Y, Xiao H, Wayman G, Wang H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor exon IV transcription through calcium responsive elements in cortical neurons. *PLoS One*. 2011;6(12):e28441.
  36. Otsuki K, Uchida S, Watanuki T, Wakabayashi Y, Fujimoto M, Matsubara T, et al. Altered expression of neurotrophic factors in patients with major depression. *J Psychiatr Res*. 2008;42(14):1145-53.
  37. Thompson RM, Weickert CS, Wyatt E, Webster MJ. Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. *J Psychiatry Neurosci*. 2011;36(3):195-203.
  38. Paz RD, Andreasen NC, Daoud SZ, Conley R, Roberts R, Bustillo J, et al. Increased expression of activity-dependent genes in cerebellar glutamatergic neurons of patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2006;163(10):1829-31.
  39. Murray KD, Isackson PJ, Eskin TA, King MA, Montesinos SP, Abraham LA, et al. mRNA expression for brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in the hippocampus of patients with intractable temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol*. 2000;418(4):411-22.
  40. Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, Castelo VT, Fahnestock M. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;76(2):347-54.
  41. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
  42. Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect*. 2006;114(3):A160-7.
  43. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 2007;128(4):635-8.
  44. Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, et al. Neuronal activity induced Gadd45b promotes epigenetics DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science*. 2009;32(5917):1074-7.

45. Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron*. 2011;70(5):813-29.
46. Ishimaru N, Fukuchi M, Hirai A, Chiba Y, Tamura T, Takahashi N, et al. Differential epigenetic regulation of BDNF and NT-3 genes by trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine in Neuro-2a cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(1):173-7.
47. Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*. 1997;88:471-81.
48. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998;393:386-9.
49. Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, et al. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*. 2003;302(5646):890-3.
50. Zhou Z, Hong EJ, Cohen S, Zhao WN, Ho HY, Schmidt L, et al. Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron*. 2006;52(2):255-69.
51. He DY, Neasta J, Ron D. Epigenetic regulation of BDNF expression via the scaffolding protein RACK1. *J Biol Chem*. 2010;285(25):19043-50.
52. Wu H, Sun YE. Reversing DNA methylation: new insight from neuronal activity induced Gadd45b in adult neurogenesis. *Sci Signal*. 2009;2(64):pe17.
53. Naegel J. Epilepsy and the plastic mind. *Epilepsy Curr*. 2009;9(6):166-9.
54. Tian F, Hu XZ, Wu X, Jiang H, Pan H, Marini AM, et al. Dynamic chromatin remodeling events in hippocampal neurons are associated with NMDA receptor mediated activation of BDNF gene promoter I. *J Neurochem*. 2009;109(5):1375-88.
55. Chen CJ, Deng Z, Kim AY, Blobel GA, Lieberman PM. Stimulation of CREB binding protein nucleosomal histone acetyltransferase activity by a class of transcriptional activators. *Mol Cell Biol*. 2001;21(2):476-87.
56. Harton JA, Zika E, Ting JP. The histone acetyltransferase domains of CREB-binding protein (CBP) and p300/CBP-associated factor are not necessary for cooperativity with the class II transactivator. *J Biol Chem*. 2001;276(42):38715-20.
57. Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci*. 2010;13:1120-7.
58. Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Hareyama N, Imai S, Narita M, et al. Hippocampal epigenetic modification at brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. *Hippocampus*. 2011;21(2):127-32.
59. Onishchenko N, Karpova N, Sabri F, Castrén E, Ceccatelli S. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methyl mercury. *J Neurochem*. 2008;106(3):1378-87.
60. Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*. 2006;9(4):519-25.
61. Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem*. 2007;14(4):268-76.
62. Fuchikami M, Morinobu S, Kurata A, Yamamoto S, Yamawaki S. Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009;12:73-82.
63. Fuchikami M, Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, Yamawaki S. Epigenetic regulation of BDNF gene in response to stress. *Psychiatry Investig*. 2011;7:251-6.
64. Mill J, Tang T, Kaminsky Z, Khare T, Yazdanpanah S, Bouchard L, et al. Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am J Hum Genet*. 2008;82(3):696-711.
65. Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, Videtic A, Ferraro A, Carli V, et al. Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(3):258-67.
66. Toledo-Rodriguez M, Lotfipour S, Leonard G, Perron M, Richer L, Veillette S, et al. Maternal smoking during pregnancy is associated with epigenetic modifications of the brain-derived neurotrophic factor-6 exon in adolescent offspring. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010;153B(7):1350-4.
67. Devlin AM, Brain U, Austin J, Oberlander TF. Prenatal exposure to maternal depressed mood and the MTHFR C677T variant affect SLC6A4 methylation in infants at birth. *PLoS One*. 2010;5(8):e12201.
68. Chen ES, Ernst C, Turecki G. The epigenetic effects of antidepressant treatment on human prefrontal cortex BDNF expression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011;14(3):427-9.
69. Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI. Epigenetic modification in frontal cortex from Alzheimer disease and bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e132.
70. D'Addario C, Dell'Osso B, Palazzo MC, Benatti B, Lietti L, Cattaneo E, et al. Selective DNA methylation of BDNF promoter in bipolar disorder: differences among patients with BDI and BDII. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(7):1647-55.
71. Kordi-Tamandani DM, Sahranavard R, Torkamanzahi A. DNA methylation and ex-

- pression profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and dopamine transporter (DAT1) genes in patients with schizophrenia. *Mol Biol Rep.* 2012;39(12):10889-93.
72. Perroud N, Salzmann A, Prada P, Nicastro R, Hoeppli ME, Furrer S, et al. Response to psychotherapy in borderline personality disorder and methylation status of the BDNF gene. *Transl Psychiatry.* 2013;3:e207.
  73. Kim JM, Stewart R, Kang HJ, Kim SY, Kim SW, Shin IS, et al. A longitudinal study of BDNF promoter methylation and genotype with poststroke depression. *J Affect Disord.* 2013;149(1-3):93-9.
  74. Tadić A, Müller-Engling L, Schlicht KF, Kotsiari A, Dreimüller N, Kleimann A, et al. Methylation of the promoter of brain-derived neurotrophic factor exon IV and antidepressant response in major depression. *Mol Psychiatry.* 2013. Epub ahead of print.
  75. An JJ, Gharami K, Liao GY, Woo NH, Lau AG, Vanevski F, et al. Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell.* 2008;134(1):175-87.
  76. Lau AG, Frier HA, Gu J, Tian D, Ku L, Liu G, et al. Distinct 3'UTRs differentially regulate activity-dependent translation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(36):15945-50.
  77. Pattabiraman PP, Tropea D, Chiaruttini C, Tongiorgi E, Cattaneo A, Domenici L. Neuronal activity regulates the developmental expression and subcellular localization of cortical BDNF mRNA isoforms in vivo. *Mol Cell Neurosci.* 2005;28(3):556-70.
  78. Chiaruttini C, Sonogo M, Baj G, Simonato M, Tongiorgi E. BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Mol Cell Neurosci.* 2008;37(1):11-9.
  79. Aliaga EE, Mendoza I, Tapia-Arancibia L. Distinct subcellular localization of BDNF transcripts in cultured hypothalamic neurons and modification by neuronal activation. *J Neural Transm.* 2009;116(1):23-32.
  80. Baj G, Leone E, Chao MV, Tongiorgi E. Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(40):16813-8.
  81. Webster MJ, Herman MM, Kleinman JE, Shannon Weickert C. BDNF and trkB mRNA expression in the hippocampus and temporal cortex during the human lifespan. *Gene Expr Patterns.* 2006;6(8):941-51.
  82. Silhol M, Bonnichon V, Rage F, Tapia-Arancibia L. Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience.* 2005;132(3):613-24.
  83. Cabelli RJ, Shelton DL, Segal RA, Shatz CJ. Blockade of endogenous ligands of trkB inhibits formation of ocular dominance columns. *Neuron.* 1997;19(1):63-76.
  84. Mandolesi G, Menna E, Harauzov A, von Bartheld CS, Caleo M, Maffei L. A role for retinal brain-derived neurotrophic factor in ocular dominance plasticity. *Curr Biol.* 2005;15(23):2119-24.
  85. Wong J, Webster MJ, Cassano H, Weickert CS. Changes in alternative brain-derived neurotrophic factor transcript expression in the developing human prefrontal cortex. *Eur J Neurosci.* 2009;29(7):1311-22.
  86. Calabrese F, Guidotti G, Middelmann A, Racagni G, Homberg J, Riva MA. Lack of serotonin transporter alters BDNF expression in the rat brain during early postnatal development. *Mol Neurobiol.* 2013;48(1):244-56.
  87. Olivier JD, Van Der Hart MG, Van Swelm RP, Dederen PJ, Homberg JR, Cremers T, et al. A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders. *Neuroscience.* 2008;152(3):573-84.
  88. Garzon D, Yu G, Fahnestock M. A new brain-derived neurotrophic factor transcript and decrease in brain-derived neurotrophic factor transcripts 1, 2 and 3 in Alzheimer's disease parietal cortex. *J Neurochem.* 2002;82(5):1058-64.
  89. Jiang X, Zhou J, Mash DC, Marini AM, Lipsky RH. Human BDNF isoforms are differentially expressed in cocaine addicts and are sorted to the regulated secretory pathway independent of the met66 substitution. *Neuromolecular Med.* 2009;11(1):1-12.
  90. Wong J, Hyde TM, Cassano HL, Deep-Soboslay A, Kleinman JE, Weickert CS. Promoter specific alterations of brain-derived neurotrophic factor mRNA in schizophrenia. *Neuroscience.* 2010;169(3):1071-84.
  91. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(8):603-14.
  92. Deinhardt K, Chao MV. Shaping neurons: Long and short range effects of mature and proBDNF signalling upon neuronal structure. *Neuropharmacology.* 2013. Epub ahead of print.
  93. Kenchappa RS, Tep C, Korade Z, Urra S, Bronfman FC, Yoon SO, et al. p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme/ADAM17. *J Biol Chem.* 2010;285(26):20358-68.
  94. Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL. Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol.* 2010;70(5):350-9.
  95. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1473):1545-64.
  96. Sun Y, Lim Y, Li F, Liu S, Lu JJ, Haberberger R, et al. ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA. *PLoS One.* 2012;7(4):e35883.

97. Jang SW, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, et al. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(6):2687-92.
98. Shen K, Cowan CW. Guidance molecules in synapse formation and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(4):a001842.
99. Sossin WS, Barker PA. Something old, something new: BDNF-induced neuron survival requires TRPC channel function. *Nat Neurosci*. 2007;10(5):537-8.
100. Koshimizu H, Hazama S, Hara T, Ogura A, Kojima M. Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett*. 2010;473(3):229-32.
101. Henriques A, Pitzer C, Schneider A. Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: where do we stand? *Front Neurosci*. 2010;4:32.
102. Fuchikami M, Morinobu S, Segawa M, Okamoto Y, Yamawaki S, Ozaki N, et al. DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. *PLoS One*. 2011;6(8):e23881.
103. Cruz-Fuentes CS, Benjet C, Martínez-Levy GA, Pérez-Molina A, Briones-Velasco M, Suárez-González J. BDNF Val 66 Met but not 5HTT-LPR modulates the cumulative effect of psychosocial childhood adversities on Major Depression in adolescents of Mexico City. *Brain and Behavior*. In Press.

Anexo 3: Resultados de las cortezas  
cerebrales

**Incremento de los transcritos I y VI de  
BDNF así como de CREB y GR en  
corteza temporal de pacientes con  
ELT**

### **Antecedentes:**

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más comunes (Engel *et al.*, 1997, Goldenberg, 2010) que afecta de forma considerable la vida social de aquellos que la presentan ya que estos sufren discriminación, lo que culmina en su aislamiento y exclusión (Lee, 2002). En México, se ha estimado una prevalencia de por vida de este trastorno del 1-2 % (Rubio-Donnadieu, 2011). Se ha reportado que en el 66% de los pacientes, estas crisis tienen su inicio en el sistema límbico, incluyendo el hipocampo, y en consecuencia se les clasifica como Epilepsia del Lóbulo temporal (ELT) (Semah *et al.*, 1998).

Estudios de electroencefalogramas (EEG), de Tomografía por emisión de Positrones (PET) y de RM han propuesto a la ELT como una enfermedad que afecta a una red neuronal más que a una región particular del cerebro como es el hipocampo (Reiderer *et al.*, 2008). En particular, los estudios de RM han demostrado consistentemente que la atrofia cerebral presente en los pacientes con ELT afecta regiones que están funcional y anatómicamente comunicadas con el hipocampo como la corteza temporal y las regiones límbicas (Bonilha *et al.*, 2003, 2004; Mueller *et al.*, 2006, Bonilha *et al.*, 2010) y se ha especulado que la aparición y el progreso de esta atrofia puede asociarse a la pérdida de las fibras eferentes del hipocampo que disminuyen la conectividad entre estas regiones cerebrales (Sutula *et al.*, 2003).

En términos histológicos, la atrofia global del lóbulo temporal en pacientes con ELT se asocia en el 10 al 50% de los casos con la presencia de displasia cortical (Diehl *et al.*, 2004) y con EH en el 70% de los pacientes con ELT (Tassi *et al.*, 2009, 2010). La displasia cortical se caracteriza por la desorganización laminar o columnar de la Corteza Temporal (CT), la presencia de células piramidales hipertróficas fuera la capa V de la CT y/o la presencia de neuronas dismórficas y en

forma de balón (Palimini *et al.*, 1994), lo que implica una afección en la migración y maduración de las neuronas; procesos, que como mencionamos en el cuerpo de la presente tesis, pueden estar regulados por el BDNF.

En este sentido, existe una gran cantidad de información que sugiere que el BDNF tiene un papel relevante en la epilepsia; sin embargo, la expresión de esta molécula no se limita a un solo transcrito (Pruunsild *et al.*, 2007) y los distintos ARNm de BDNF pudieran llegar a tener un efectos diferenciales en términos del proceso epileptogénico (Tongiorgi *et al.*, 2006). En particular, nosotros encontramos que después de analizar la expresión de los transcritos de los exones I, II, IV y VI de BDNF solo incremento la expresión del transcrito del exón VI en hipocampo de pacientes con ELT, como se observa en la figura 6 de la presente tesis. Como primer objetivo de este trabajo consideramos corroborar si este cambio también se observa en la corteza temporal de estos pacientes, ya que es una región que guarda comunicación intrínseca con el hipocampo y como mencionamos en los párrafos anteriores se encuentra afectada en pacientes con ELT.

Por otro lado, evaluamos si la ELT se encuentran asociados a cambios en la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta del Adenosín Monofosfato Cíclico (CREB), que es una de nuestras hipótesis alternativas para explicar los cambios en la expresión de BDNF que no parecen estar asociados a cambios en la metilación de los promotores analizados al estudiar las muestras de hipocampo. En este sentido, recientemente se identificaron sitios de unión CREB en los promotores 1, 2, 4 y 6 de gen BDNF de ratas y se reportaron cambios en la unión de pCREB en el área tegmental ventral lo que se asoció con cambios en la expresión de los transcritos II, IV, VI (Koo *et al.*, 2015).



La proteína CREB se fosforila en la serina 133 y actúa como factor de transcripción, promoviendo la expresión de diversos genes que regulan procesos como la diferenciación, sobrevivencia y plasticidad neuronal que parecen estar involucrados en el desarrollo de las CE, entre los que se encuentra BDNF (Tanis *et al.*, 2008). Estudios en modelos animales transgénicos han reportado que la inactivación de CREB suprime o disminuye el desarrollo de las CE (Zhu *et al.*, 2012) y estudios en pacientes con ELT han encontrado un incremento en los niveles de esta proteína, tanto fosforilada como no fosforilada en tejido cerebral de pacientes con ELT (Park *et al.*, 2003, Guo *et al.*, 2014).

Finalmente, también analizamos la expresión del receptor de glucocorticoides (GR, de sus siglas en inglés), ya que existen trabajos que indican que el estrés exacerba las crisis epilépticas (Nakken *et al.*, 2005, Sperling *et al.*, 2008); y se ha reportado un incremento en los niveles de cortisol en pacientes con ELT en comparación con un grupo control (Galimberti *et al.*, 2005). Asimismo, un aumento en la expresión de GR gen se ha asociado con altos niveles de expresión del BDNF en respuesta al tratamiento antidepresivo (Ridder *et al.*, 2005 and Schulte-Herbrüggen *et al.*, 2006) y nosotros encontramos que el uso de sertralina como tratamiento antidepresivo se asoció a un incremento en la expresión del transcrito del exon VI de BDNF en hipocampo de pacientes con ELT (Martínez-Levy *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta el momento solo un par de estudios han evaluado la expresión del GR en paciente con ELT y se compararon con los niveles de expresión de este receptor en otros tejidos de los mismos pacientes, siendo importante destacar que no se consideró un grupo de referencia o control (Watzka *et al.*, 2000a, Watzka *et al.*, 2000b).

Por lo tanto, el objetivo del presente anexo fue analizar en muestras de corteza humano el patrón de expresión de 4 transcritos de gen BDNF (I, II, IV y VI), así como del GR y CREB en relación a un grupo control obtenido de autopsias. Asimismo, evaluamos si diversas variables clínicas de interés

como la presencia de EH, los años con crisis epilépticas y el número de crisis o el tratamiento farmacológico previo a la cirugía se relacionan con los cambios observados en los niveles de expresión de los diferentes transcritos analizados.

### **Especificaciones metodológicas:**

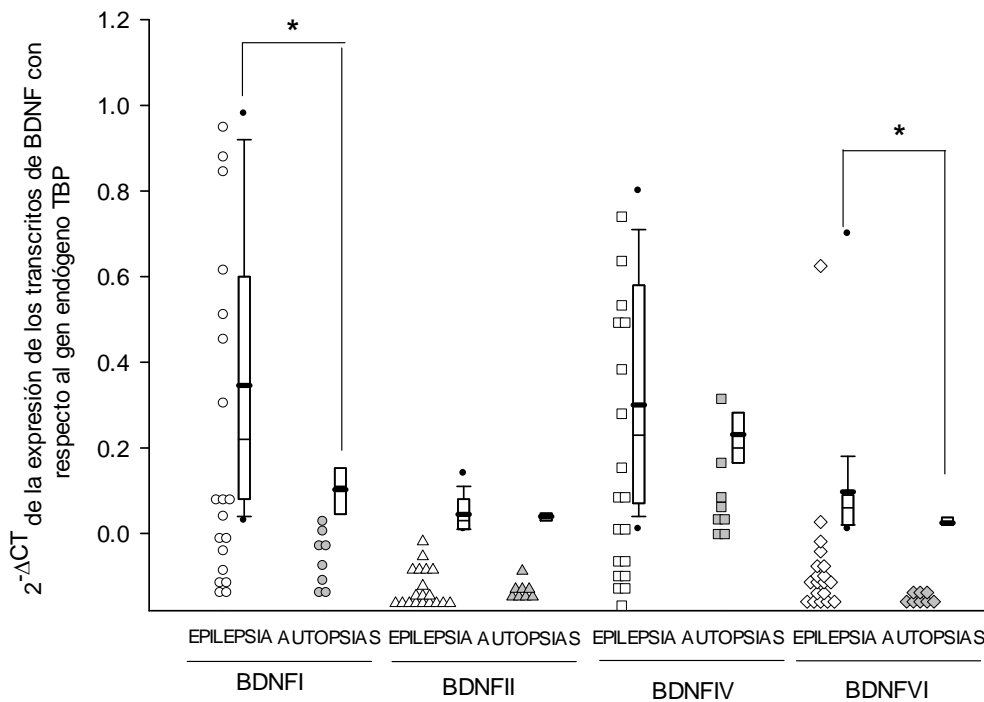
En términos globales seguimos la misma metodología planteada en la tesis objeto del presente trabajo. Sin embargo solamente se obtuvo corteza temporal de 19 pacientes con respecto a las 24 muestras de hipocampos (las muestras faltantes fueron la 67, 106, 207, 215 y 279).

Las muestras de autopsias utilizadas para esta segunda parte del proyecto, corresponden a los mismos sujetos de las muestras de hipocampos.

En este segundo esfuerzo, la reacción de PCR en tiempo real se realizó con 100 ng de cDNA, en comparación con los 250ng utilizados para los estudios con los hipocampos y para los genes de CREB y GR se utilizaron las sondas Hs01081733\_m1 y Hs00353740\_m1 respectivamente.

## Resultados

Encontramos un incremento en la expresión del transcrito del exon I y replicamos el aumento del transcrito VI de BDNF observado en hipocampo de pacientes con ELT (BDNF I: MW=38.5  $p \leq 0.05$ ; BDNF II: MW=62.5  $p \geq 0.05$ ; BDNFIV:  $t=75.5$   $p \geq 0.05$ ; BDNFVI MW=31  $p \leq 0.05$  (Figura I)).

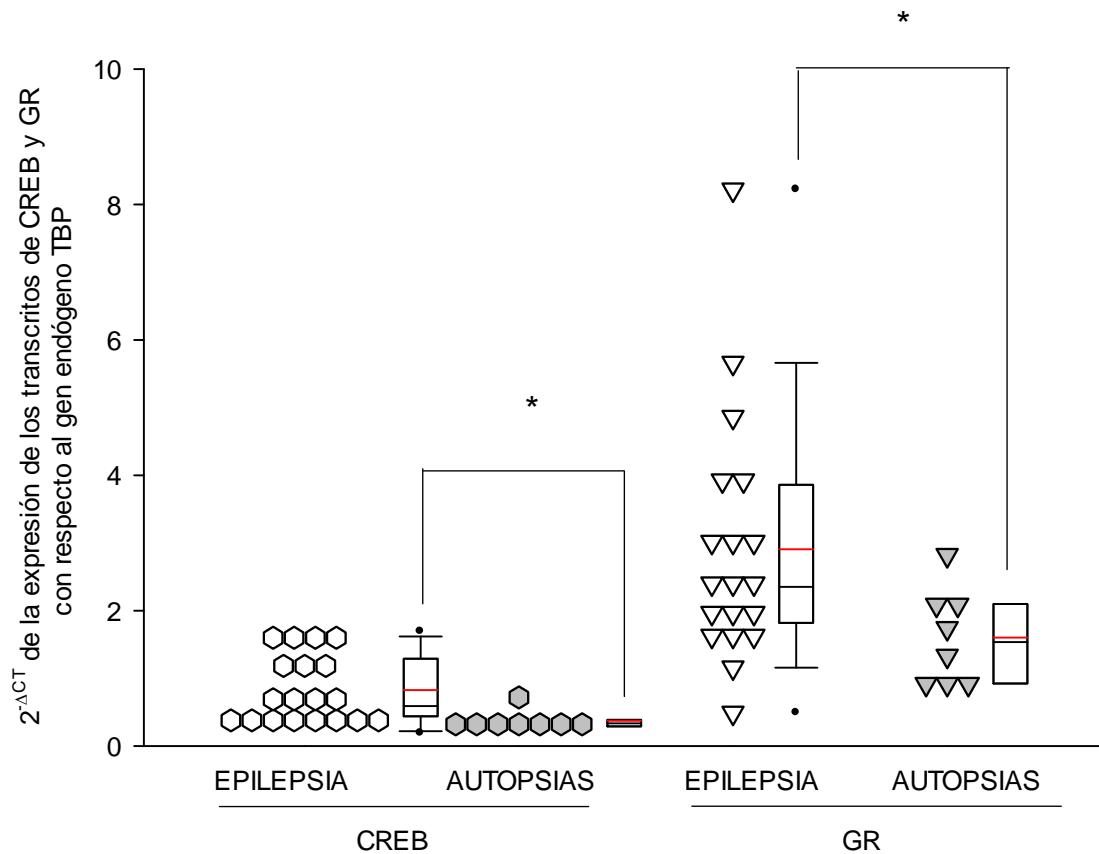


**Figura I:** Expresión de 4 transcritos de BDNF en corteza temporal de pacientes con ELT en comparación con el grupo control

Las figuras blancas representan a los casos con epilepsia, mientras que las grises a las autopsias. Los círculos representan la expresión del transcrito del exon I de BDNF; los triángulos los del exon II, los cuadrados los del exon IV y los rombos los del exon VI. La prueba estadística utilizada fue una t de Student para muestras independientes. Los resultados muestran la Media  $\pm$  la Desviación Estándar. \* $p \leq 0.05$ .

Por otro lado, reportamos un incremento significativo en la expresión de CREB y GR al comparar casos con ELT con respecto al grupo de autopsias (Figura II).

Asimismo, encontramos que si bien los pacientes que usaron SRT como fármaco antidepresivo no mostraron un aumento significativo, si se nota una tendencia estadística en el transcrito del exon I ( $p=0.08$ ) y un incremento significativo del transcrito del exon VI de BDNF con respecto al grupo de autopsias (BDNFI:  $H=4.8$   $p \geq 0.05$ ; BDNFII:  $H=2.6$   $p \geq 0.05$ ; BDNFIV:  $H=3.2$   $p \geq 0.05$ ; BDNFVI:  $H=7.5$   $p \leq 0.05$  Figura III). Por otro lado, observamos un aumento en la expresión de CREB y GR en respuesta al tratamiento con SRT (Figura IV).



**Figura II:** Expresión de de CREB y GR en corteza temporal de pacientes con ELT en comparación con el grupo control

Las figuras blancas representan a los casos con epilepsia, mientras que las grises a las autopsias. Los pentágonos representan la expresión de CREB, mientras que los triángulos de cabeza la expresión del GR. La prueba estadística utilizada fue una t de Student para muestras independientes. Los resultados muestran la Media  $\pm$  la Desviación Estándar. \* $p \leq 0.05$ .

No se hicieron los análisis con respecto al TPM ya que dos de las muestras faltantes pertenecían a este criterio. Tampoco se observó ningún efecto con respecto al resto de las variables clínicas analizadas como la edad, el género, la edad en la que se reportó la primera crisis epiléptica, el número de crisis al mes antes de la cirugía y la lateralidad de la resección.

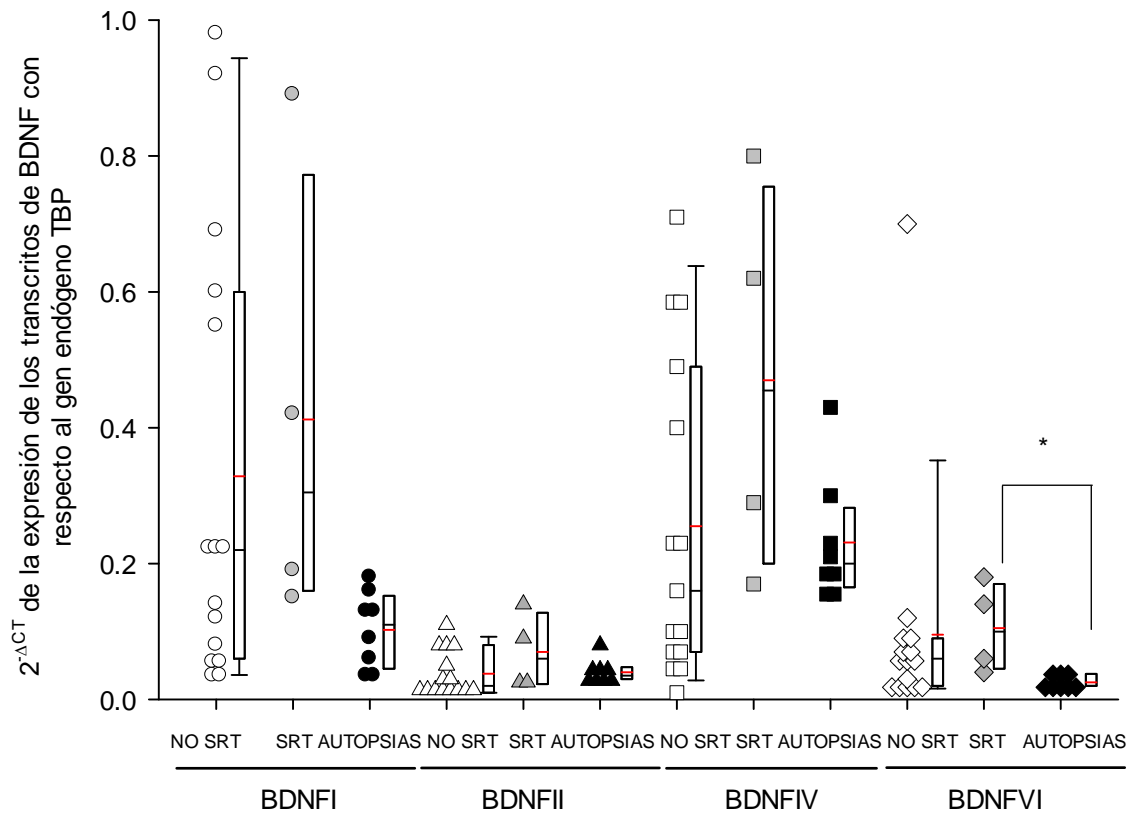
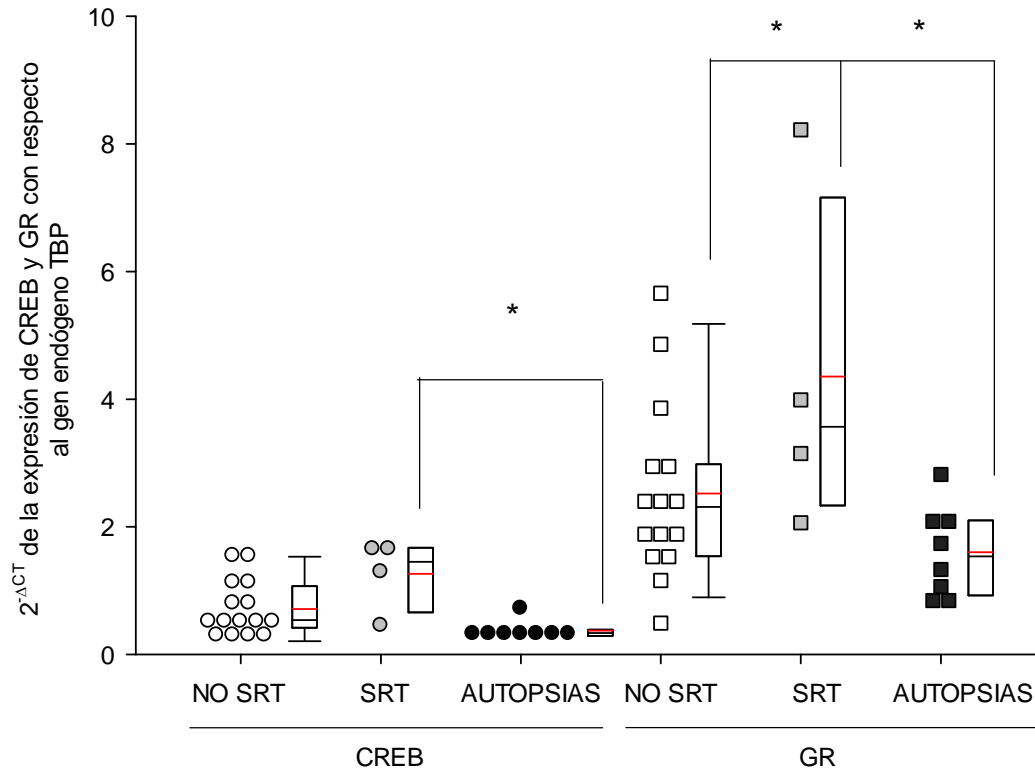


Figura III: Expresión de 4 transcritos de BDNF en relación al uso de SRT antes de la cirugía en corteza de pacientes con ELT y en relación a un grupo control

Las figuras blancas representan a los casos con epilepsia que usaron sertralina, mientras que las grises los casos con epilepsia que NO usaron sertralina y las negras a las autopsias. Los círculos representan la expresión del transcrito del exon I de BDNF; los triángulos los del exon II, los cuadrados los del exon IV y los rombos los del exon VI. La prueba estadística utilizada fue una ANOVA. Los resultados muestran la Media  $\pm$  la Desviación Estándar. \* $p \leq 0.05$ .



**Figura IV : Expresión de CREB y GR en relación al uso de SRT antes de la cirugía en hipocampo de pacientes con ELT y en relación a un grupo control**

Las figuras blancas representan a los casos con epilepsia que usaron sertralina, mientras que las grises los casos con epilepsia que NO usaron sertralina y las negras a las autopsias. Los pentágonos representan la expresión de CREB, mientras que los triángulos de cabeza la expresión del GR. La prueba estadística utilizada fue una ANOVA. Los resultados muestran la Media  $\pm$  la Desviación Estándar. \* $p \leq 0.05$ .

## Discusión:

Este es el primer estudio que ha contrastado los niveles de expresión de 4 transcritos de BDNF, GR y CREB en corteza obtenida de pacientes con ELT con respecto a un grupo control de autopsias. Lo anterior es de relevancia ya que estas moléculas parecen tener una participación importante en la epilepsia (Binder, 2004, Sperling *et al.*, 2008, Zhu *et al.*, 2012) y nadie ha evaluado cómo se comportan en corteza de pacientes con ELT.

### Aumento de la expresión de los transcritos I y VI de BDNF en pacientes con ELT:

Existen dos estudios previos que han evaluado la expresión de BDNF en pacientes con ELT y encontraron en el hipocampo, un incremento tanto del ARNm como de la proteína (Murray *et al.*, 2000, Hou *et al.*, 2010). Solamente un estudio evaluó los niveles de esta neurotrofina en corteza de individuos con ELT reportando un aumento en sus niveles proteicos (Takahashi *et al.*, 1999). Este es el primer estudio en evaluar como se expresan los 4 transcritos más comunes de BDNF en la corteza temporal de estos pacientes y encontramos un incremento en la expresión del transcrito del exon I en casos con ELT, efecto que **NO** se identificó en el hipocampo de estos pacientes; aunque es importante destacar que si se detectó una tendencia, como se muestra en la figura 6 de la presente tesis. Este transcrito se expresa principalmente en el sistema nervioso y su localización se restringe al soma neuronal, donde puede promover la fosforilación de TrKB y la proliferación de dendritas primarias (Baj *et al.*, 2011).

A diferencia del resto de los transcritos analizados de BDNF, el que contiene al exon I se caracteriza por presentar un sitio de inicio de la traducción dentro del exon 5' (Pruunsild *et al.*, 2007), que se ha



asociado a una traducción más eficiente resultando en un incremento en los niveles de proteínas de esta neurotrofina (Jiang *et al.*, 2009, Koppel *et al.*, 2015). A partir de este mecanismo se sintetiza la proteína precursora preproBDNF que contiene 8 aminoácidos extra, los cuáles al ser removidos generan a proBDNF, que es idéntica a la proteína inmadura que producen el resto de los transcritos analizados, posteriormente esta molécula es digerida por enzimas particulares para producir a BDNF maduro (Martínez-Levy y Cruz-Fuentes, 2014). Se ha reportado que la presencia del péptido señal en la preproBDNF puede afectar mecanismos fisiológicos asociados al funcionamiento de la proteína y en este sentido Jiang y cols. (2009) reportaron que en comparación con proBDNF se observó un incremento en el mecanismo de secreción regulado de la proteína madura BDNF, lo que podría implicar una mayor secreción de esta neurotrofina en la corteza de pacientes con ELT.

Por otro lado, replicamos el incremento en la expresión del transcrito del exón VI de BDNF que reportamos previamente en hipocampo de estos pacientes. Como ya se mencionó en el texto de la tesis, el transcrito del exón VI de BDNF tiene una localización preferente en las regiones distales de las dendritas de neuronas del hipotálamo y células piramidales del hipocampo y la corteza (Aid *et al.*, 2007, Chiaruttini *et al.*, 2008, Aliaga *et al.*, 2009). Asimismo, en cultivo de neuronas del hipocampo, el ARNm que contiene al exón VI de BDNF se traduce a proteína en esta región celular (Baj *et al.*, 2011). El incremento en la expresión de este transcrito se ha asociado con un aumento en la formación de dendritas distales (Chiaruttini *et al.*, 2008, Baj *et al.*, 2011, Baj *et al.*, 2013); así como a la activación del receptor TrkB promoviendo la sobrevivencia celular (Baj *et al.*, 2012).

Nuestros resultados indican un incremento de solo algunos de los transcritos de BDNF, efecto que además parece depender del tejido que estamos analizando (corteza vs. hipocampo). Por otro lado, el aumento tanto del transcrito del exón I como el del exón VI de BDNF en individuos con ELT podría

implicar un incremento de la sobrevivencia neuronal, la arborización a todo lo largo de sus dendritas en la corteza temporal, así como en la secreción de esta neurotrofina, que promovería este mismo efecto en neuronas vecinas.

#### Aumento en la expresión de CREB y GR en pacientes con ELT:

Con respecto al factor de transcripción CREB, previamente se había reportado un incremento en los niveles de la proteína CREB y pCREB en hipocampo de pacientes con ELT en relación a un grupo de autopsias (Park *et al.*, 2003) y un incremento de pCREB en corteza de paciente con ELT en comparación con corteza de pacientes con trauma cerebral que entraron a cirugía como tratamiento para disminuir la presión intracraneal (Guo *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado la expresión del ARNm de CREB en pacientes con ELT. Nuestros resultados indican que el incremento en este transcrito puede explicar los resultados previos observados en relación a los niveles proteicos de esta molécula.

Asimismo, se han reportado elementos respuesta a CREB en los promotores I, IV y IX del gen BDNF humano (Pruunsild *et al.*, 2011); a los que se les suma el promotor VI del gen de la rata (Koo *et al.*, 2015). Asimismo, en neuronas corticales de ratón tratadas con fenciclidina, un fármaco que produce síntomas parecidos a la esquizofrenia, se reportó una disminución en los niveles proteicos de pCREB, asociado a un decremento en la expresión global de BDNF y en particular de transcritos con los exones I, IV y VI (Katanuma *et al.*, 2014), apoyando la idea de que CREB puede ser importante para regular la expresión de los transcritos de BDNF, como se planteó en la introducción de este escrito.

Por otro lado, se ha reportado que el aumento en la expresión de BDNF se asocia a un incremento en la expresión de GR (Ridder *et al.*, 2005 and Schulte-Herbruggen *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2012) y hasta el momento no existen estudios que hayan evaluado la expresión de GR en pacientes con ELT en relación con un grupo control. Sin embargo, existen algunos estudios en modelos animales que muestran resultados contradictorios, por ejemplo Bao y *cols.* (2011) reportaron una disminución en los niveles de ARNm de GR en hipocampo de ratas, al ser evaluadas 24 horas después del kindling; en este mismo sentido se reportó un decremento en la inmuno-reactividad de GR en el hipocampo de jerbos sensibles a las crisis epilépticas (jerbos que desarrollaron crisis epilépticas (CE) después de ser estimulados vigorosamente en la espalda con un lápiz), al compararlos con aquellos que bajo el mismo tratamiento no desarrollaron CE (Hwang *et al.*, 2005); asimismo, una disminución de los niveles proteicos de GR se observó en corteza temporal de ratas a las que se les indujo CE con fluoretil vía inhalada por 6 días consecutivos, en comparación con un grupo control (Wang *et al.*, 2010). Por el contrario Clark y *cols.* (1994) reportaron en el hipocampo de ratas un incremento en el ARNm de GR 4 horas después del kindling, valores que regresaron a sus niveles normales después de 24 horas; de igual forma, al comparar un grupo de ratas tratadas con kainato con un grupo control se observó que después de 15 días de la lesión incrementaron los niveles proteicos del GR (Nyakas *et al.*, 1983). Este es el único estudio que evaluó los niveles de este receptor en un modelo semi-crónico de epilepsia, siendo importante recordar que los pacientes de nuestro estudio ya llevan muchos años con el trastorno.

Previamente, el estudio de Nyakas y *cols.* (1983) ya había especulado que el incremento en la expresión de GR podría compensar los receptores perdidos por las CE, lo cual podría ser también una posible explicación para nuestros hallazgos. Por otro lado, aunque no se ha detectado un sitio de unión a GR en los distintos promotores de BDNF (Martínez-Levy y Cruz-Fuente, 2015) si existen

algunos estudios que han reportado que un incremento en la expresión de BDNF en respuesta a la incremento de corticosterona, probablemente por un mecanismo transcripcional indirecto que parece estar regulado por GR (Chao *et al.*, 1998, Hansson *et al.*, 2000).

Este es el primer estudio en evaluar los niveles de expresión de CREB y GR en tejido nervioso de pacientes con ELT, nuestros datos son consistentes con algunos estudios tanto en humanos como en modelos animales; asimismo la literatura indica que el incremento en la expresión de estos transcritos podría tener alguna implicación en el incremento que observamos en la expresión de transcritos particulares de BDNF.

#### Efecto de la sertralina sobre la expresión de BDNF, CREB y GR:

Con respecto a BDNF encontramos un incremento del transcrito VI pero no del I en los pacientes que utilizaron SRT como tratamiento para síntomas de ansiedad y depresión; como mencionamos en el cuerpo de esta tesis esto es similar al incremento en los niveles proteicos de esta neurotrofina previamente reportado por Kandratavicius *y cols.* (2013) en hipocampo de pacientes con ELT. Asimismo, estos resultados son consistentes con el incremento en particular del transcrito del exon VI de BDNF en respuesta tanto al uso de ciertos medicamentos empleados en el tratamiento contra la depresión, como al ejercicio en ratones; en este estudio se propuso que este incremento podría estimular la sobre-vivencia y diferenciación de los precursores neuronales, así como la formación de nuevas dendritas y la ramificación axonal (Baj *et al.*, 2012).

En relación a CREB, una revisión reciente reportó que en diversos estudios en modelos animales los niveles de esta molécula incrementan en respuesta al tratamiento antidepresivo; asimismo, varios

estudios postmortem también han reportado un aumento en los niveles de CREB en pacientes que utilizaban tratamiento para la depresión al momento del deceso (Blendy, 2006). En particular, un incremento en los niveles de ARNm de CREB se reportó en hipocampo de ratas tratadas con sertralina y fluoxetina, lo que de forma interesante se asoció a un aumento en los niveles globales de ARNm de BDNF (Nibuya *et al.*, 1996), lo que es concordante con lo que encontramos en el presente estudio.

Finalmente, el incremento en la expresión de GR principalmente en pacientes con ELT que usaron sertralina como medicamento para controlar síntomas de ansiedad y depresión también es concordante con estudios previos en modelos animales que ha encontrado un incremento en la expresión de GR en respuesta a distintos tratamientos con antidepresivos, como lo reporta Anackery *cols.* (2011) en una revisión reciente.

Los anteriores resultados indican que el tratamiento para síntomas de ansiedad y depresión en pacientes con ELT muestran un incremento en el ARNm de transcrito con el exon VI de BDNF, CREB y GR, similar a lo que se ha reportado en pacientes con depresión y refuerza nuestra hipótesis de que el incremento en transcritos particulares de BDNF, CREB y GR pueden ser relevantes para generar un efecto trófico de remodelación y recuperación del funcionamiento del tejido nervioso en pacientes con ELT.

## Literatura citada:

1. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007). Mouse and Rat BDNF structure and expression revisited. *Journal of Neuroscience Research* 85: 525-535.
2. Aliaga EE, Mendoza I, Tapia-Arancibia L. (2009) Distinct subcellular localization of BDNF transcripts in cultured hypothalamic neurons and modification by neuronal activation. *J Neural Transm.* 116(1):23-32.
3. Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM. (2011). The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment?. *Psychoneuroendocrinology.* 36(3):415-25.
4. Baj G, D'Alessandro V, Musazzi L, Mallei A, Sartori CR, Sciancalepore M, Tardito D, Langone F, Popoli M, Tongiorgi E. (2012). Physical exercise and antidepressants enhance BDNF targeting in hippocampal CA3 dendrites: further evidence of a spatial code for BDNF splice variants. *Neuropsychopharmacology.* 37(7):1600-11.
5. Baj G, Del Turco D, Schlaudraff J, Torelli L, Deller T, Tongiorgi E. (2013). Regulation of the spatial code for BDNF mRNA isoforms in the rat hippocampus following pilocarpine-treatment: a systematic analysis using laser microdissection and quantitative real-time PCR. *Hippocampus.* 23(5):413-23.
6. Baj G, Leone E, Chao MV, Tongiorgi E. (2011). Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(40):16813-8.
7. Bao GS, Cheng XQ, Hua Y, Wang ZD, Liu ZG. (2011) Changes of glucocorticoid receptor mRNA expression in basolateral amygdala-kindled rats. *Chin Med J (Engl).* 124(17):2622-7.
8. Blendy JA. (2006). The role of CREB in depression and antidepressant treatment . *Biol Psychiatry;* 59: 1144-1150.

9. Bonilha L, Kobayashi E, Rorden C, Cendes F, Li LM. (2003). Medial temporal lobe atrophy in patients with refractory temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 74(12):1627-30.
10. Bonilha L, Rorden C, Castellano G, Pereira F, Rio PA, Cendes F, Li LM. (2004). Voxel-based morphometry reveals gray matter network atrophy in refractory medial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol*. 61(9):1379-84.
11. Bonilha L, Elm JJ, Edwards JC, Morgan PS, Hicks C, Lozar C, Rumboldt Z, Roberts DR, Rorden C, Eckert MA. (2010). How common is brain atrophy in patients with medial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia*. 51(9):1774-9.
12. Clark M, Smith MA, Weiss SR, Post RM. (1994) Modulation of hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression by amygdaloid kindling. *Neuroendocrinology*.59(5):451-6.
13. Chao HM, Sakai RR, Ma LY, McEwen BS. (1998). Adrenal steroid regulation of neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. *Endocrinology*. 139(7):3112-8.
14. Chen DY, Bambah-Mukku D, Pollonini G, Alberini CM. (2012). Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII $\alpha$ -BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nat Neurosci*. 15(12):1707-14.
15. Chiaruttini C, Sonogo M, Baj G, Simonato M, Tongiorgi E. (2008) BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Mol Cell Neurosci*. 37(1): 11-9.
16. Diehl B, Najm I, LaPresto E, Prayson R, Ruggieri P, Mohamed A, Ying Z, Lieber M, Babb T, Bingaman W, Lüders HO. (2004). Temporal lobe volumes in patients with hippocampal sclerosis with or without cortical dysplasia. *Neurology*. 62(10):1729-35.

17. Engel J, Williamson PD, Wieser H-G (1997). Chapter 231: Mesial Temporal Lobe Epilepsy in *Epilepsy: A comprehensive text book* edited by Engel J., Pedley TA. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 2417-2424.
18. Galimberti CA, Magri F, Copello F, Arbasino C, Cravello L, Casu M, Patrone V, Murialdo G. (2005). Seizure frequency and cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) levels in women with epilepsy receiving antiepileptic drug treatment. *Epilepsia*. 46(4):517-23.
19. Goldenberg MM (2010) Overview of Drugs used for Epilepsy and Seizures. *P&T: a-peer reviewed journal for formulary management*. 35(7): 392-415.
20. Guo J, Wang H, Wang Q, Chen Y, Chen S. (2014). Expression of p-CREB and activity-dependent miR-132 in temporal lobe epilepsy. *Int J Clin Exp Med*. 7(5):1297-306.
21. Hansson AC, Cintra A, Belluardo N, Sommer W, Bhatnagar M, Bader M, Ganten D, Fuxe K. (2000). Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *Eur J Neurosci*. 12(8):2918-34.
22. Hou X, Wang X, Zhang L (2010) Conditional downregulation of brain derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B blocks epileptogenesis in the human temporal lobe epilepsy hippocampus. *Neurology India* 58(1): 29-34.
23. Hwang IK, Lee YB, Yoo KY, Kang TC, Kim DW, Moon WK, Kim SM, Oh YS, Sohn HS, Won MH. (2005). Seizure-induced changes of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the hippocampus in seizure sensitive gerbils. *Neurosci Res*. 53(1):14-24.
24. Jiang X, Zhou J, Mash DC, Marini AM, Lipsky RH. (2009). Human BDNF isoforms are differentially expressed in cocaine addicts and are sorted to the regulated secretory pathway independent of the Met66 substitution. *Neuromolecular Med*. 11(1):1-12.



25. KandrataVICIUS L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior LS, Leite JP. (2014) Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*; 10:1693-705.
26. Katanuma Y, Numakawa T, Adachi N, Yamamoto N, Ooshima Y, Odaka H, Inoue T, Kunugi H. (2014). Phencyclidine rapidly decreases neuronal mRNA of brain-derived neurotrophic factor. *Synapse*. 68(6):257-65.
27. Koo JW, Mazei-Robison MS, LaPlant Q, Egervari G, Braunscheidel KM, Adank DN, Ferguson D, Feng J, Sun H, Scobie KN, Damez-Werno DM, Ribeiro E, Peña CJ, Walker D, Bagot RC, Cahill ME, Anderson SA, Labonté B, Hodes GE, Browne H, Chadwick B, Robison AJ, Vialou VF, Dias C, Lorsch Z, Mouzon E, Lobo MK, Dietz DM, Russo SJ, Neve RL, Hurd YL, Nestler EJ. (2015). Epigenetic basis of opiate suppression of Bdnf gene expression in the ventral tegmental area. *Nat Neurosci*. 18(3):415-22.
28. Koppel I, Tuvikene J, Lekk I, Timmusk T. (2015). Efficient use of a translation start codon in BDNF exon I. *J Neurochem*. 134(6):1015-25.
29. Lee S, Williamson J, Lothman EW, Szele FG, Chesselet MF, Von Hagen S, Sapolsky RM, Mattson MP, Christakos S. (1997). Early induction of mRNA for calbindin-D28k and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment. *Brain Res Mol Brain Res*. 47(1-2):183-94.
30. Martínez-Levy GA, Cruz-Fuentes CS. (2014) Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. *Yale J Biol Med*; 87(2):173-86.
31. Mueller SG, Laxer KD, Cashdollar N, Buckley S, Paul C, Weiner MW. (2006). Voxel-based optimized morphometry (VBM) of gray and white matter in temporal lobe epilepsy (TLE) with and without mesial temporal sclerosis. *Epilepsia*. 47(5):900-7.

32. Murray KD, Isackson PJ, Eskin TA, King MA, Montesinos SP, Abraham LA, Roper SN. (2000). Altered mRNA expression for brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in the hippocampus of patients with intractable temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol.* 418(4): 411-22.
33. Nakken KO, Solaas MH, Kjeldsen MJ, Friis ML, Pellock JM, Corey LA. (2005), Which seizure-precipitating factors do patients with epilepsy most frequently report?. *Epilepsy Behav.* 6(1):85-9.
34. Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. (1996). Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci.* 16(7):2365-72.
35. Nyakas C, De Kloet ER, Veldhuis HD, Bohus B. (1983). Hippocampal corticosterone receptors and novelty-induced behavioral activity: effect of kainic acid lesion in the hippocampus. *Brain Res.* 288(1-2):219-28.
36. Palmieri A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, Jackson G, Lüders HO, Prayson R, Spreafico R, Vinters HV. (2004). Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology.* 62(6 Suppl 3):S2-8.
37. Park SA, Kim TS, Choi KS, Park HJ, Heo K, Lee BI. (2003). Chronic activation of CREB and p90RSK in human epileptic hippocampus. *Exp Mol Med.* 35(5):365-70.
38. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K (2007) Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing and multiple promoters *Genomics* 90(3): 397-406.
39. Ridder S, Chourbaji S, Hellweg R, Urani A, Zacher C, Schmid W, Zink M, Hörtnagl H, Flor H, Henn FA, Schütz G, Gass P. (2005). Mice with genetically altered glucocorticoid receptor

- expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J Neurosci.*25(26):6243-50.
40. Riederer F, Lanzenberger R, Kaya M, Prayer D, Serles W, Baumgartner C. (2008). Network atrophy in temporal lobe epilepsy: a voxel-based morphometry study. *Neurology.* 71(6):419-25.
41. Rubio-Donnadieu F (2011), Capitulo II Epidemiología de la Epilepsia en Epilepsia, Editado por Rubio-Donnadieu F, Reséndiz-Aparicio JC, Alonso-Vanegas MA, Sentíes-Madrid H. Programa Prioritario de Epilepsia, 2nda edición ISBN: 978-607-00-5132-6. Pp 23-27
42. Schulte-Herbrüggen O, Chourbaji S, Ridder S, Brandwein C, Gass P, Hörtnagl H, Hellweg R. (2006). Stress-resistant mice overexpressing glucocorticoid receptors display enhanced BDNF in the amygdala and hippocampus with unchanged NGF and serotonergic function. *Psychoneuroendocrinology.* 31(10):1266-77.
43. Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, Cavalcanti D, Baulac M. (1998) Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology;* 51(5):1256-62.
44. Sperling MR, Schilling CA, Glosser D, Tracy JI, Asadi-Pooya AA. (2008). Self-perception of seizure precipitants and their relation to anxiety level, depression, and health locus of control in epilepsy. *Seizure.* 17(4):302-7.
45. Sutula TP, Hagen J, Pitkänen A. (2003). Do epileptic seizures damage the brain?. *Curr Opin Neurol.* 16(2):189-95.
46. Takahashi M, Hayashi S, Kakita A, Wakabayashi K, Fukuda M, Kameyama S, Tanaka R, Takahashi H, Nawa H. (1999). Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain Res.* 818(2):579-82.

47. Tanis KQ, Duman RS, Newton SS. (2008). CREB binding and activity in brain: regional specificity and induction by electroconvulsive seizure. *Biol Psychiatry*. 63(7):710-20.
48. Tassi L, Meroni A, Deleo F, Villani F, Mai R, Russo GL, Colombo N, Avanzini G, Falcone C, Bramerio M, Citterio A, Garbelli R, Spreafico R. (2009). Temporal lobe epilepsy: neuropathological and clinical correlations in 243 surgically treated patients. *Epileptic Disord*. 11(4):281-92.
49. Tassi L, Garbelli R, Colombo N, Bramerio M, Lo Russo G, Deleo F, Milesi G, Spreafico R. (2010). Type I focal cortical dysplasia: surgical outcome is related to histopathology. *Epileptic Disord*. 12(3):181-91.
50. Tongiorgi E, Domenici L, Simonato M. (2006). What is the biological significance of BDNF mRNA targeting in the dendrites? Clues from epilepsy and cortical development. *Mol Neurobiol*. 33(1):17-32.
51. Wang L, Zhou C, Zhu Q, Luo J, Xu Y, Huang Y, Zhang X, Wang X. (2010). Up-regulation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 in the brain tissue of human and experimental epilepsy. *Neurochem Int*. 57(8):899-905.
52. Watzka M, Beyenburg S, Blümcke I, Elger CE, Bidlingmaier F, Stoffel-Wagner B. (2000). Expression of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA in the human hippocampus. *Neurosci Lett*. 290(2):121-4.
53. Zhu X, Dubey D, Bermudez C, Porter BE. (2015). Suppressing cAMP response element-binding protein transcription shortens the duration of status epilepticus and decreases the number of spontaneous seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsia*. 56(12):1870-8.

## ANEXO 4: Material extra

# Estancias

Febrero – Abril 2012

Estancia de Investigación en el Laboratorio 122 Norte del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, a cargo del Dr Felix Recillas Targa

Actividad: **Aprender las técnicas necesarias para evaluar patrones de metilación en el ADN.**

Junio- Agosto 2014:

Estancia de Investigación en la Universidad de Birmingham en Alabama, en el laboratorio a cargo de la Dra Farah Lubin

Actividad: **Evaluar el patrón de metilación de promotores de BDNF en hipocampo de pacientes con ELT con la técnica de Pirosecuenciación.**

# **Presentación de trabajo en reuniones, congresos nacionales e internacionales**

Tercer Congreso de Alumnos de Posgrado. 25-26 de Abril, 2013. México, DF. Ciudad Universitaria. Estudio de la expresión de 4 transcritos del gen BDNF en tejido nervioso de pacientes con Epilepsia del Lóbulo Temporal.

Neuroscience 2013. 9 al 13 de Noviembre; San Diego, California. **Specific transcripts of the Brain Derived Neurotrophic Factor in Hippocampus of Patients with Sclerosis-Associated Temporal Lobe Epilepsy.**

XXIX Reunión Anual de Investigación. 8 al 10 de octubre, 2014 Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz". **Cambios en la expresión del transcrito VI de BDNF en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal.**

Quinto Congreso de Alumnos de Posgrado. 23-25 de marzo, 2015. México, DF. Ciudad Universitaria. Estudio de la expresión del gen BDNF y análisis de la metilación diferencial de distintos promotores de este gen en pacientes con Epilepsia del Lóbulo Temporal.

9th World Congress of the International Brain Research Organization. 7 al 11 de Julio del 2015, Río de Janeiro, Brasil. **Increased expression of BDNF transcript with exon VI in hippocampus of patients with pharmaco-resistant Temporal Lobe Epilepsy.**

XXX Reunión Anual de Investigación. 7 al 9 de octubre, 2015 Instituto Nacional de Psiquiatría  
"Ramón de la Fuente Muñiz". Cambios en la expresión de GR y CREB en pacientes con  
Epilepsia del Lóbulo Temporal.



# Reconocimientos

Octubre 2014:

Reconocimiento por haber **ganado el primer lugar en el treceavo concurso de carteles categoría estudiantes en el área de de Investigaciones Clínicas**. Como autora con el trabajo: Cambios en la expresión del transcrito VI de BDNF en pacientes con Epilepsia del Lóbulo Temporal.

Otorga: Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" en el marco de la XXVI Reunión anual de investigación

Octubre 2015:

Reconocimiento por haber **ganado el primer lugar en el catorceavo concurso de carteles categoría Investigadores en el área de de Investigaciones Clínicas**. Como autora con el trabajo: Cambios en la expresión de GR y CREB en pacientes con Epilepsia del Lóbulo Temporal.

Otorga: Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" en el marco de la XXVI Reunión anual de investigación