



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Participación del factor de crecimiento transformante beta en la
sobreexpresión de Tenascina-C en un modelo de epilepsia
inducido por pilocarpina.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

Jorge Landgrave Gómez

**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
México D.F., Noviembre 2014**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Indice

Dedicatorias.....	3
Portada.....	4
Resúmen.....	5
Abstract.....	6
Introducción	
<i>Epilepsia</i>	7 a 9
<i>Status epilepticus</i>	9
<i>Modelos animales de epilepsia de lobulo temporal</i>	9 a 12
<i>Tenascina-C</i>	12 a 15
<i>Factor de crecimiento transformante β</i>	15 a 18
Planteamiento del problema.....	18
Hipotesis.....	19
Objetivos.....	19 a 20
Material y Metodos.....	20 a 24
Resultados	
<i>La dosis de Pilocarpina está involucrada en la mortalidad de los animales</i>	24 a 26
<i>Sobreexpresión de la proteína de matriz extracelular Tenascina-C a lo largo del curso temporal agudo</i>	26 a 29
<i>La activación de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta se encuentra involucrado en la sobreexpresión de Tenascina-C</i>	29 a 33
<i>El inhibidor específico del receptor de TGF-β tipo 1(SB-431542) revirtió parcialmente el incremento de TN-C y previene la traslocación del complejo pSmad2/3 al núcleo</i>	33 a 36
<i>Discusion</i>	36 a 41

<i>Conclusiones</i>	41 a 42
<i>Agradecimientos</i>	42
<i>Publicaciones</i>	43
<i>Referencias</i>	44 a 48

Para mi familia con todo mi cariño, me enseñó a no volverme un hombre de éxito, más bien un hombre de valor.

Para tí por enseñarme que soy mucho más que sólo la ciencia.

Para mis profesores que me enseñaron a no tomar el estudio como una obligación, si no como una oportunidad de penetrar en el maravilloso mundo del saber.

Para mis amigos que me enseñaron que la vida es hermosa y que vivirla no es casualidad.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Participación del factor de crecimiento transformante beta en la sobreexpresión de
Tenascina-C en un modelo de epilepsia inducido por pilocarpina.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
Biólogo

PRESENTA

Jorge Landgrave Gómez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MIEMBROS DEL COMITÉ DE TUTORES Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE
ADSCRIPCIÓN

Presidente: Dra. Pilar Durán Hernández
Vocal: M.en C. Miguel Ángel Palomino Garibay
Secretario: Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
Suplente: Dr. Octavio Fabián Mercado Gómez
Suplente: Dr. Saúl Cano Colín

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

MÉXICO, D. F. Noviembre, 2014

Resumen

La epilepsia es un desorden neurológico crónico que afecta aproximadamente a 50 millones de personas a nivel mundial, la cual, se caracteriza por convulsiones recurrentes y espontáneas. El hipocampo es una región del cerebro susceptible a desencadenar descargas eléctricas que contribuyen al daño cerebral y al mecanismo epileptogénico. Asimismo, las características histopatológicas del padecimiento incluyen muerte celular en CA1, así como la gliosis reactiva y la aparición y dispersión de fibras musgosas en la capa de células granulares. Por otro lado, se ha mostrado que las convulsiones promueven la sobreexpresión de numerosas moléculas de matriz extracelular. La Tenascina-C (TN-C) es una proteína de matriz celular involucrada en distintos procesos celulares y funciones fisiológicas, como la migración celular y la interacción célula-célula, en la regulación de la matriz extracelular en distintas condiciones patológicas como el infarto al corazón, lesiones pulmonares y el cáncer. Sin embargo, a pesar de que se ha descrito la sobreexpresión de TN-C en distintos modelos de epilepsia del lóbulo temporal, en la actualidad, no existen estudios que indiquen cuál es la vía de señalización intracelular que provoque el aumento de TN-C, en respuesta a una señal extracelular. Por lo que en el siguiente proyecto de tesis se analizó la participación del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en la sobreexpresión de la TN-C. Se encontró un incremento en el contenido de la proteína a partir de las 24 hrs y continuó a los 3 y 7 días posteriores a la inyección de pilocarpina. Asimismo, la inmunorreactividad de TN-C estaba incrementada en distintas partes del hipocampo (i.e. *radiatum* y *lacunosum-moleculare*), siendo la zona subgranular del giro dentado con mayor inmunotinción. Por otro lado, también se observó un incremento significativo en la expresión proteica de TGF- β 1; junto con el incremento en

la fosforilación en uno de los complejos de factores transcripcionales fundamentales de esta vía de señalización, el complejo Smad 2/3. Estos hallazgos sugieren la participación de la vía de señalización de TGF- β en la sobreexpresión de la proteína de matriz celular TN-C posterior al estado epiléptico mediado por la inyección de altas dosis de pilocarpina.

Abstract

Epilepsy is a chronic neurological disorder that affects 50 million people, which is characterized by recurrent, spontaneous brain seizures. Hippocampus is a brain region susceptible to trigger electrical discharges contributing to brain damage and epileptogenic mechanism. Histopathological features include cellular death in CA1 as well as reactive astrocytic gliosis, mossy fiber sprouting and dispersion of granule cell layer. On the other hand, seizures have been shown to upregulate the expression of numerous extracellular matrix molecules. Tenascin C (TN-C) is an extracellular matrix protein involved in several physiological roles such as cell migration, cell-cell interaction and in pathological conditions such as cancer invasion, wound healing or inflammation. Though TN-C upregulation has been described after intrahippocampal excitotoxins injection, to date there is no research about which signal transduction pathway(s) are participating on TN-C protein overproduction. Thus, in the present investigation we analyzed the participation of transforming growth factor beta (TGF- β) signaling pathway in the upregulation of TN-C. We found that TN-C immunoreactivity is increased in several hippocampal strata (i.e. radiatum and lacunosum-moleculare) being the subgranular zone of the dentate gyrus area where more dramatic changes occur. An increase of TN-C protein content after 1, 3 and 7 days after pilocarpine-induced status epilepticus were also found. On the other hand, we observed significant increase of both TGF- β 1 and presumably its protein precursor,

moreover we found an increase of phosphorylation of a critical downstream effector of TGF- β , the complex Smad2/3. These findings suggest the participation of TGF- β signaling pathway on the upregulation of extracellular matrix protein TN-C after pilocarpine-induced status epilepticus.

Introducción

Epilepsia

La epilepsia comprende un grupo de desórdenes neurológicos, la cual, se caracteriza por crisis espontáneas y recurrentes (Aroniadou-Anderjaska et. al., 2007). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor de 50 millones de personas (aproximadamente el 1% de la población mundial) pueden padecer alguna clase de epilepsia, siendo la epilepsia del lóbulo temporal (ELT) la forma más común de esta patología (Engel, 1998). La epilepsia ha sido definida funcional y conceptualmente por la Liga Internacional en Contra de la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) en el 2005 como una afección del sistema nervioso central caracterizada por una predisposición a generar convulsiones epilépticas. Esta definición aplica generalmente para un individuo que ha tenido al menos dos convulsiones epilépticas con una diferencia de tiempo mayor a 24 horas (Fisher et al., 2005). Así mismo, para entender esta definición debemos aclarar cómo se describe una convulsión epiléptica, la cual también fue definida por la ILAE, como un evento transitorio de signos y síntomas específicos como las convulsiones tónico-clónicas, debido a una actividad neuronal anormal y excesiva en el cerebro (Fisher et al., 2005). Sin embargo, estas definiciones están sujetas a cambios debido a los distintos signos y síntomas presentados en casos clínicos a lo largo del tiempo, por lo que la ILAE durante el

transcurso de este año ha hecho algunas modificaciones a dicha definición, las cuales no serán discutidas en el presente trabajo, pero es importante mencionar que debido a las características e implicaciones en materia social y de salud es necesaria una definición fisiológica más clara de la patología.

Como se mencionó anteriormente, la epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es la forma más común de esta patología; de tal manera que las estructuras de sistema límbico como el hipocampo, la amígdala y la corteza piriforme son susceptibles a desencadenar potenciales eléctricos que contribuyen al daño cerebral y al mecanismo epileptogénico. (Aroniadou-Anderjaska et al., 2007). Asimismo, en el hipocampo existen mecanismos de muerte celular en las áreas CA1 y en el giro dentado, cuyo proceso se ha reportado tanto en resecciones quirúrgicas de pacientes con ELT, como en modelos murinos (Blümcke et al., 1999). Aunado a esto, se ha observado gliosis reactiva de astrocitos, la aparición de fibras musgosas y la dispersión de las células granulares, las cuales, forman parte de los cambios morfológicos que ocurre durante esta condición patológica (Houser, 1990). Por otra parte, se ha sugerido fuertemente que todos estos cambios morfológicos se encuentran involucrados en la formación de circuitos excitatorios aberrantes que podrían contribuir a la generación de las convulsiones epilépticas (Heck et al., 2004).

Para algunos tipos de epilepsia, la etiología es desconocida y puede involucrar predisposición genética (epilepsia idiopática, Berkovic y Scheffer, 2001), mientras que en otros tipos de epilepsia son secundarias a otras enfermedades como displasias, tumores, o a daños cerebrales agudos tal como una isquemia o un traumatismo cráneo-encefálico (epilepsia adquirida, Angeleri y cols., 1999).

Fisiológicamente, todos estos cambios son característicos de la epilepsia; sin embargo, es probable que otros mecanismos moleculares y/o celulares se encuentren involucrados tanto en la epileptogénesis como en la cronicidad de esta patología.

Status epilepticus

El estado epiléptico o *status epilepticus* (SE) se define como la condición en la cual existen convulsiones epilépticas continuas. Generalmente se desarrolla en las fases agudas de la epilepsia y se caracteriza por convulsiones electrofisiológicas recurrentes que pueden permanecer hasta por 24 horas. En la clínica se considera una emergencia médica que se puede presentar en algunos pacientes con epilepsia, con un alto índice de mortalidad si no es controlada (Engel et al., 1998). Por otro lado, en modelos animales la aparición de este estado es una de las características clave para considerar que el modelo animal epileptogénico recapitula dicha condición (Heck et al., 2004).

Modelos animales de epilepsia del lóbulo temporal

Debido a las implicaciones sociales de esta enfermedad neurológica, la mayor parte del trabajo científico y experimental sobre la epilepsia se realiza principalmente en modelos de epilepsia en animales los cuales se obtienen por agentes farmacológicos o estímulos eléctricos, las cuales, ambos tipos de inducción tienen sus ventajas y desventajas (Mares, 2012). Uno de los modelos de epilepsia en animales más utilizado es el inducido mediante inyecciones de distintas dosis de pilocarpina ya sean altas (300-380 mg/kg de peso) o bajas (30 o 60 mg/kg de peso) con una inyección previa (18 hrs) de cloruro de litio (3mEq/kg de peso) cuyas tasas de mortalidad se exponen en la tabla 1. La pilocarpina es un alcaloide extraído de las plantas del género *Pilocarpus sp.*, y este compuesto es un agonista no

específico de los receptores muscarínicos en el sistema parasimpático. La administración sistémica de este agente promueve cambios secuenciales conductuales y electroencefalográficos que pueden dividirse en tres distintos períodos:

- a) Un período agudo caracterizado por crisis convulsivas electrofisiológicas recurrentes que permanecen por lo menos durante 24 horas. Este período es llamado *status epilepticus*.
- b) Un período con una normalización progresiva de los electroencefalogramas y el comportamiento, el cual varía de 4 a 44 días.
- c) Un período crónico con convulsiones recurrentes y espontáneas.

Las principales características de las convulsiones del último periodo son muy similares a las crisis parciales complejas en humanos y se repiten de dos a tres veces por semana en cada animal (Scorza et al., 2009). Por lo tanto, este modelo farmacológico es una valiosa herramienta no sólo para estudiar los procesos de esta patología, sino también para evaluar el potencial de las drogas antiepilépticas.

Tabla 1. Tasas de mortalidad encontradas en otros laboratorios en los cuales se utilizó el modelo de pilocarpina o el modelo de litio-pilocarpina.

Dosis de pilocarpina (mg/kg)	Duración del SE (min)	Mortalidad (%)	Promedio ± D.S.	Referencias
320–360	90	17b		Williams et al. (2002)

	120	55a	37.3 ± 19.1	Esclapez et al. (1999)
	>120	40a		Goffin et al. (2007)
380	>120	5b		Poirier et al. (2000)
	>120	30a	22.0 ± 14.7	Leite et al. (1990)
	>120	31b		Liu et al. (1994b)
30 (pretratamiento con cloruro de litio, 3 mEq/kg)	90	45a		Fujikawa et al. (1999)

Nótese la amplia variabilidad encontrada en las diferentes sesiones experimentales, incluso cuando se utilizan protocolos similares. Estas discrepancias indican que las variables ambientales difíciles de controlar podrían influir en la inducción al SE, lo que resulta en una probabilidad de supervivencia diferente. La cepa de rata también parece ser un factor importante en la supervivencia, ya que las tasas más bajas de mortalidad se han observado en ratas Sprague-Dawley. ^aCepa Wistar y ^bCepa Sprague-Dawley.

Tenascina-C

La familia de las tenascinas son un grupo de proteínas de matriz extracelular muy conservadas evolutivamente, cuya presencia se encuentra desde los cordados hasta los mamíferos. La Tenascina-C (TN-C) es miembro de esta familia de glicoproteínas la cual incluye otros miembros como la Tenascina X, R, W y Y (Joester & Faissner, 2001). Asimismo, la expresión de la TN-C y la TN-W se encuentran reguladas durante el desarrollo embrionario y ambas se vuelven a expresar durante distintos procesos patológicos (i.e., cáncer de estroma y la angiogénesis en tumores). Además de su sobreexpresión durante estos procesos, la síntesis de TN-C se induce por infecciones o durante procesos pro-inflamatorios.

Se ha descrito que la TN-C es una proteína multimodular con una región central y seis brazos, conformada por cuatro dominios distintos (Figura 1):

1. Dominio de ensamblaje.
2. Repeticiones de tipo Factor de Crecimiento Epidermal (EGFL, por sus siglas en inglés).
3. Varios dominios del tipo de Fibronectina III (FN-III).
4. Dominios carboxilo terminales globulares de tipo Fibrinógeno (FBG).

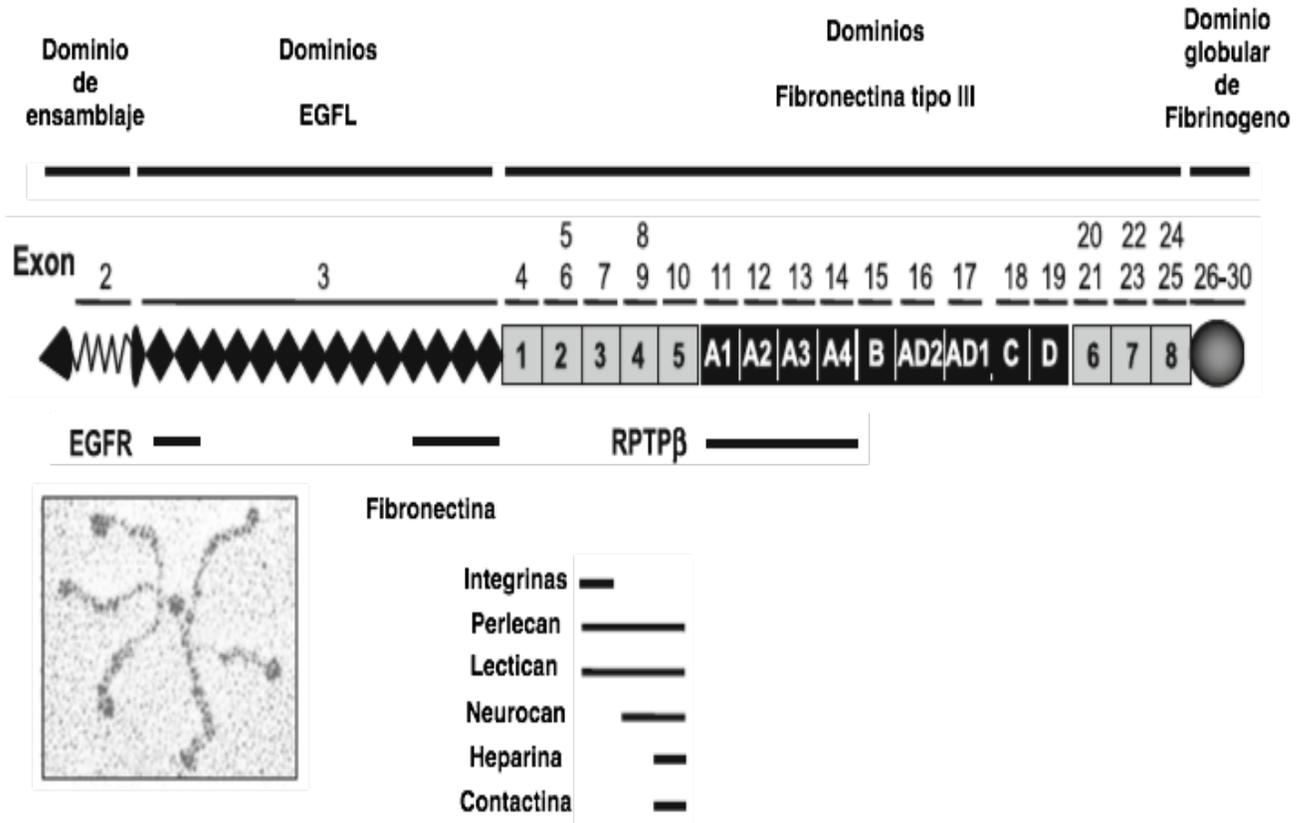


Figura 1. Estructura de la proteína de matriz extracelular TN-C. Esquema representativo de la proteína TN-C en donde se muestran sus distintos dominios (dominios de ensamblaje, tipo EGFL, globulares de fibrinógeno y de tipo fibronectina III) así como la localización de las posibles interacciones de otras proteínas con esta (Modificado de Chiquet & Chiquet 2003).

Estos dominios pueden interactuar con distintos tipos de proteínas, entre las que se encuentran receptores celulares y varios componentes de la matriz extracelular (Figura 1). Debido a su estructura, la TN-C es una molécula extraordinariamente pleiotrópica y puede regular una amplia gama de procesos celulares durante distintas condiciones, ya sean fisiológicas o patológicas (Midwood et al., 2012). Entre estos procesos se encuentran la migración celular, la interacción célula-célula y la regulación de la constitución de la matriz

extracelular durante la remodelación de tejidos (Chiquet-Ehrismann & Tucker, 2011). Por otro lado, en condiciones patológicas como el cáncer, se encuentra involucrada en procesos como la angiogénesis durante la hiperplasia de varios tejidos, (i.e. pulmón, próstata, colon, riñón, cerebro). Asimismo, regula la remodelación de la matriz extracelular en condiciones como el infarto al miocardio, las lesiones pulmonares y las lesiones de tendones. Como componente de la matriz extracelular, presenta funciones distintas en la inhibición y la promoción de la adhesión celular, dependiendo de la etapa del desarrollo embrionario y el microambiente molecular (Masatoshi et al., 2004). En este sentido, estudios *in vitro* sugieren que la TN-C controla el balance entre la adhesión y la no adhesión celular; además de la movilidad, proliferación y diferenciación celular (Chiquet-Ehrismann & Chiquet, 2003). De manera general, la TN-C se expresa transitoriamente durante el desarrollo embrionario y se encuentra ausente o en muy pocas cantidades en el tejido adulto (Dandanchi et al., 2001; Masatoshi et al., 2004), pero en distintas condiciones patológicas como las mencionadas anteriormente, se encuentra en grandes cantidades (Frangogiannis et al., 2002; El-Karef et al., 2007; Nishioka et al., 2010).

En su conjunto, estos datos sugieren que la TN-C es importante en la regulación de la proliferación celular y la migración. En ambos casos, el mecanismo de las funciones de señalización, así como las interacciones moleculares exactas que subyacen a estos procesos celulares, aún no han sido determinados con claridad.

En relación al sistema nervioso central, esta glicoproteína se expresa principalmente tanto en neuronas como en astrocitos, por lo cual se sugiere que podría tener un papel regulando distintas interacciones celulares dependiendo de su microambiente (Masatoshi et al., 2004).

Aunque no se sabe mucho sobre el papel de la TN-C en patologías del sistema nervioso central, en este trabajo se describirán algunas evidencias sobre la interacción entre las células nerviosas que podrían ser reguladas por esta proteína en neuropatologías como la epilepsia del lóbulo temporal.

De manera reciente, se ha demostrado que las crisis epilépticas incrementan la expresión de numerosas moléculas de la matriz extracelular (Dityatev & Fellin, 2008). En este sentido, se reportó que existe una sobreexpresión de proteínas de matriz extracelular en la capa de células granulares del giro dentado del hipocampo de modelos epilépticos, particularmente la proteína TN-C, el Fosfocano y el Neurocano. Sin embargo, los mecanismos involucrados en el incremento de la expresión de la TN-C durante la epileptogénesis no han sido estudiados y permanecen por ser descritos (Heck et al., 2004).

Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)

Muchos estudios han identificado varias moléculas como inductores de la expresión de TN-C en distintos sistemas biológicos y condiciones patológicas, entre ellos se encuentran varias citocinas pro y anti inflamatorias, además de distintos factores de crecimiento (Rettig et al., 1994; Midwood & Orend, 2009, Tabla 2).

Entre estos factores de crecimiento, se encuentra el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) el cual juega un papel fundamental en una amplia variedad de procesos biológicos entre los que se encuentran la proliferación, diferenciación, apoptosis, y la producción de elementos de matriz extracelular (Taylor & Khachigian, 2000).

Tabla 2. Vías de señalización y factores de transcripción que regulan la expresión de TN-C.

Vía de señalización	Referencia	Factor de transcripción	Referencia
ROS/NFκB	Yamamoto et al. 1999	Brn2	Copertino et al. 1997
ERK1/2	Jones et al. 1999	c-Jun, NFκB	Mettouchi et al. 1997
Ras/MAPK	Maschler et al. 2004	Prx1	Jones et al. 2001
Rho/ROCK	Chiquet et al. 2004; Sarasa-Renedo et al. 2006	Smad3/4, Sp1, Ets1, 2 CBP/p300	Jinnin et al. 2004; Jinnin et al. 2006
β-catenin/Wnt	Beiter et al. 2005; Cohen et al. 2008	Sox4	Scharer et al. 2009
Notch	Sivasankaran et al. 2009	RBPJk	Sivasankaran et al. 2009
AKT/PI3K	Goh et al. 2010	MEF2c	della Gaspera et al. 2009

Este factor de crecimiento ejerce sus efectos pleiotrópicos uniéndose a sus receptores (Tipo I y Tipo II), los cuales son proteínas homodiméricas y similares estructuralmente, los cuales se encuentran en la membrana plasmática y poseen un solo dominio transmembrana. Además, contienen un dominio citoplásmico con función de cinasa de serina-treonina y la unión entre el ligando y el receptor promueve un cambio conformacional que provoca la fosforilación de miembros de la familia de proteínas citoplásmicas llamadas Smads (Heldin et al., 1997). Éstas proteínas forman un complejo que es traslocado al núcleo, donde funcionan como factores de transcripción de genes específicos que regulan distintos procesos celulares (Figura 2) (Czuwara-Ladykowska et al. 2002; Jinnin et al. 2004).

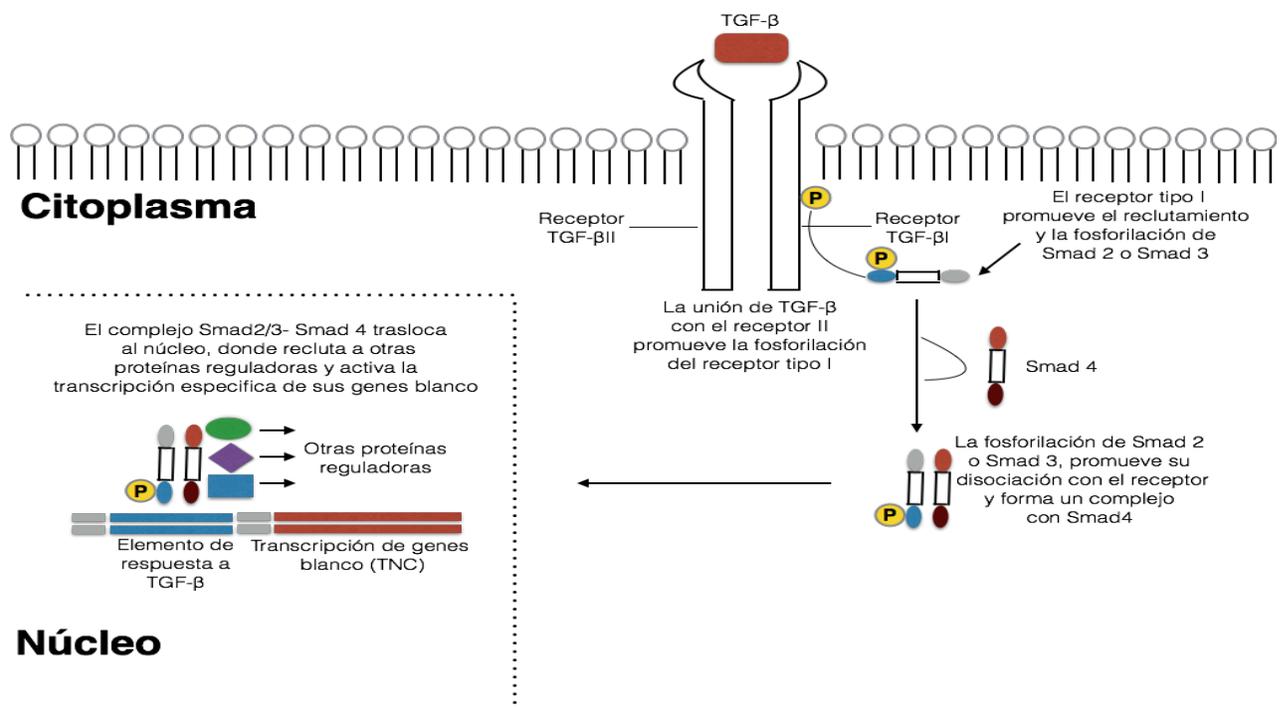


Figura 2. Esquema representativo de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta. En este se muestra la vía por la cual podría estar regulando la transcripción de TN-C.

En este sentido y de manera reciente, se demostró por medio de un análisis de microarreglos de DNA en fibroblastos humanos, que el gen que codifica para la TN-C es uno de los genes blanco en la vía de señalización del TGF- β (Verecchia et al., 2001). Esta información podría sugerir que la vía de señalización utilizada por este factor de crecimiento, podría estar involucrada en la sobreexpresión de TN-C durante el proceso epileptogénico, mecanismo que permanece por ser descrito.

Planteamiento del problema

La epilepsia es un desorden neurológico crónico que afecta a 50 millones de personas aproximadamente (1 % de la población mundial) por lo que puede ser considerada como una neuropatología de alto impacto en la población mundial. Si consideramos que la ocurrencia va en aumento, conocer los mecanismos involucrados tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de la neurodegeneración característica de esta afección es un reto central a ser resuelto por la comunidad científica. Aunque se han identificado algunas moléculas de matriz extracelular que aumentan su expresión durante la epileptogénesis como el Neurocano, Fosfacano y la TN-C, la(s) vía(s) de señalización que están implicadas en la sobreproducción de estas proteínas permanece siendo una pregunta a resolver. Por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar la participación de la vía de señalización de TGF- β sobre la expresión de la proteína de matriz extracelular TN-C en un modelo farmacológico de epilepsia del lóbulo temporal a lo largo de un curso temporal.

Hipótesis

La expresión de la proteína de matriz extracelular TN-C aumentará en el hipocampo de ratas con *status epilepticus* inducido por la pilocarpina a lo largo de un curso temporal, ésta sobreexpresión será debida, en parte, por la activación de la vía de señalización del TGF- β .

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la participación de la vía de señalización del TGF- β en la expresión de TN-C en el hipocampo de ratas con estado epiléptico inducido por la inyección de pilocarpina a través de un curso temporal.

Objetivos particulares

- Estandarizar la dosis única necesaria de pilocarpina en el modelo farmacológico de epilepsia del lóbulo temporal para disminuir la mortalidad de los animales y aumentar la tasa de animales que desarrollen estado epiléptico.
- Analizar el contenido proteico de la TN-C en el hipocampo de la rata de un modelo farmacológico de epilepsia del lóbulo temporal a lo largo del curso temporal.
- Determinar la distribución de la TN-C en distintas regiones del hipocampo posterior al estado epiléptico a través de un curso temporal.

- Analizar el contenido proteico de la proteína TGF- β 1 y de elementos cascada abajo de la vía de señalización como SMAD2/3 en homogenados de hipocampo de la rata posterior al estado epiléptico.
- Estudiar el efecto de la inhibición de la vía de señalización de TGF- β en la sobreproducción de la proteína de matriz extracelular TN-C

Material y métodos

Animales e inducción del estado epiléptico por inyección de pilocarpina.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 250-300 grs., siguiendo el protocolo aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se mantuvieron en un bioterio con acceso libre a comida y agua *ad libitum*, con temperatura y humedad junto con un ciclo de luz/obscuridad (ciclos de 12 h de luz por 12 h de obscuridad) controlados. Para el modelo de estado epiléptico inducido por pilocarpina, los animales fueron inyectados 30 minutos antes con nitrato de escopolamina (1 mg/kg, Sigma-Aldrich) con el fin de minimizar los daños colinérgicos periféricos producidos por la pilocarpina. La pilocarpina hidroclicorada (Sigma-Aldrich) se disolvió en solución salina y fue inyectada intraperitonealmente (200-300 mg/kg) para inducir el SE. Una vez llegado a las crisis repetidas, se esperó durante 1 h y posterior a ese tiempo, se inyectó inmediatamente una solución de benzodiazepinas (Valium, 5mg/kg) para parar las convulsiones causadas por la inyección de pilocarpina. Una versión modificada por Racine (1972) fue utilizada para evaluar las distintas etapas conductuales la cual comprende cinco estadios. El primero caracterizado por acinesia, seguido de una postura rígida del animal, el tercer estadio consta

de movimientos masticatorios y movimientos de la cabeza en forma de “cabeceo”, el cuarto estadio es caracterizado por movimientos mioclónicos unilaterales y finalmente convulsiones límbicas severas y posición de canguro con o sin pérdida de postura. Sólo los animales que presentaron los dos últimos estadios fueron utilizados para los procedimientos experimentales mientras que los demás fueron sacrificados. Para el caso de los animales control, en éstos se realizaron los mismos procedimientos reemplazando la inyección intraperitoneal de pilocarpina por una inyección de solución salina. Para poder investigar los efectos de las convulsiones en la sobre-expresión de TN-C, TGF- β y SMAD 2/3 fosforilado, los animales fueron sacrificados a lo largo de un curso temporal (1, 3 y 7 días) posterior a la inyección de pilocarpina. En experimentos adicionales, se inyectó intraperitonealmente a un grupo de animales (n=4) con el inhibidor del receptor de TGF- β tipo I, el SB-431542 (10 mg/kg peso, Sigma-Aldrich) disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO) 30 minutos antes de la inyección de pilocarpina (Waghabi et al., 2009). Se utilizó el vehículo (DMSO) para el grupo de los animales control y ambos grupos de animales se sacrificaron 24 hrs posteriores a las inyecciones.

Electroforésis desnaturalizante de proteínas e inmunotransferencia.

Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos (1, 3 y 7 días) con una sobredosis de pentobarbital sódico y los cerebros fueron disecados lo más rápido posible y puestos en buffer de fosfatos salina frío durante 2 minutos. Posteriormente se disecaron los hipocampos y se homogenizaron en 300 μ L de buffer de lisis (20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glicerol, y una pastilla completa de un coctel de inhibidores de proteasas (Complete-Roche), pH 7.5). Los homogenados se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 30 minutos y se colectaron los sobrenadantes para su análisis

posterior. Las proteínas de las muestras fueron cuantificadas por el método de Bradford (Biorad) y se cargaron 60µg en en buffer Laemli y se sometieron a electroforésis en gels de gradiente de 4-20% (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, Biorad). Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia semi-húmedo (Biorad) durante una hora y posterior a ese tiempo, se realizó la tinción reversible de Ponceau para confirmar la de calidad de la transferencia. Después las membranas fueron lavadas tres veces durante cinco minutos con buffer de Tris-Salina (TBS) pH 7.5, e inmediatamente se bloquearon con una solución que contenía leche en polvo al 5% diluida en TBS-Tween 20 al 0.1% (TBST)) durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos: anti-Tenascina C (1:1000, Millipore, Temecula CA AB19011), anti-Factor de Crecimiento beta uno (1:1000 Sigma-Aldrich T0438) y anti-Smad2/3 fosforilada (pS423/425) (1:2000, Santa Cruz Biotechnology sc-11769) diluidos en la solución de bloqueo e incubados durante toda la noche a 4°C. Para el control de carga, se utilizó un anticuerpo monoclonal contra GAPDH (1:2000, Sigma-Aldrich G8795). Después de tres lavados con TBST durante 10 minutos, las membranas se incubaron un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano durante dos horas a temperatura ambiente, después de eso se lavaron las membranas tres veces más con TBST. La señal de las bandas de interés fue detectada mediante un kit de quimioluminiscencia (Millipore, Temecula CA) y éstas fueron captadas en placas de revelado (Amersham). Para la densitometría se tomaron imágenes de las bandas detectadas mediante una cámara CCD (DNR Bio-Imaging Systems) y el análisis densitométrico se llevó a cabo mediante un software de análisis de imágenes MCID (InterFocus Imaging Ltd., Cambridge UK). Los valores de densidad óptica relativa se reportaron en unidades arbitrarias. Para poder investigar los efectos de las convulsiones en la sobre-expresión de

TN-C y TGF- β , se utilizaron homogenados de hipocampo de animales que fueron sacrificados a lo largo de un curso temporal crónico (i.e. 1, 3 y 7 días) después de haber sido inyectados con la pilocarpina.

Inmunohistoquímica

Los animales se sacrificaron a distintos tiempos (1, 3 y 7 días) mediante la inyección de una sobredosis de pentobarbital sódico, y posteriormente se perfundieron transcardialmente con 250 ml de solución salina fría, seguido de 200 ml de solución de fijación de paraformaldehído al 4% diluido en un buffer de fosfatos (pH 7.4). Los cerebros se disecaron y sumergieron en la solución para fijar durante toda una noche. Después de eso, se deshidrataron con soluciones ascendentes de alcohol (70 al 100%) y xileno, y se incluyeron en bloques de parafina. El tejido se cortó en secciones coronales de un espesor de 10 μ m con un micrótopo y se adhirieron en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina. La parafina de las muestras fue removida con xileno y después se hidrató el tejido con soluciones descendentes de alcohol (100 al 70%). Posteriormente, a las laminillas fueron colocadas en vasos Koplín y se les agregó una solución buffer de citratos, pH 6 para ser calentadas a 120 °C durante 2 minutos (método de recuperación de antígenos). Las secciones se lavaron con agua destilada e hidratadas con PBS dos veces durante cinco minutos e inmediatamente después, se usó una solución de permeabilización y bloqueo de endoperoxidasas durante 30 minutos (PBS, TritonX-100 0.3% y H₂O₂ 3%), para después bloquearlas con una solución de bloqueo durante una hora (Background Sniper, Biocare Medical). Posteriormente, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo policlonal anti-Tenascina C, (1:1000, Millipore) durante toda la noche a 4°C y seguido de esta incubación, se procedió a hacer tres lavados de cinco minutos con PBS. Inmediatamente después las

muestras fueron incubadas con la solución Trekkie Universal Link durante una hora a temperatura ambiente, después se lavaron de nuevo con PBS tres veces durante cinco minutos, seguido de la solución Trekavidin-HRP (Starr Trek Universal HRP Detection, Biocare Medical) durante una hora. Finalmente se agregó 3-3 diaminobenzidina como cromógeno (Starr Trek Universal HRP Detection, Biocare Medical) para revelar las muestras. Éstas fueron observadas en un microscopio de campo claro (Leica Microsystem, Germany). Los controles negativos del experimento consistieron en repetir el procedimiento mencionando anteriormente solo reemplazando el paso de la incubación con el anticuerpo primario con la solución utilizada para diluir los anticuerpos.

Estadística

Los valores de las unidades de densidad óptica relativa fueron examinados mediante la prueba Shapiro-Wilk para verificar si los datos se comportaban bajo las características de una distribución normal. Después de eso se utilizó el software de estadística Prism GraphPad (GraphPad Software San Diego) para analizar los datos mediante una prueba t-student de dos colas no pareada, prueba de Mann-Whitney o prueba de Kruskal-Wallis with post hoc de Dunn's. Se utilizó un valor $p < 0.05$ para ser considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

La dosis de Pilocarpina está involucrada en la mortalidad de los animales.

Para investigar si las dosis de pilocarpina tenían efecto en la sobrevivencia de los animales, se probó una dosis respuesta en los animales y se evaluó la mortalidad. En este sentido, se

encontró que de acuerdo a lo reportado, a medida que la dosis de pilocarpina aumenta, el porcentaje de sobrevivencia de los animales disminuye (Figura 3); sin embargo, se observó que la inducción de los animales a *SE* aumenta en las dosis más altas. (Figura 4).

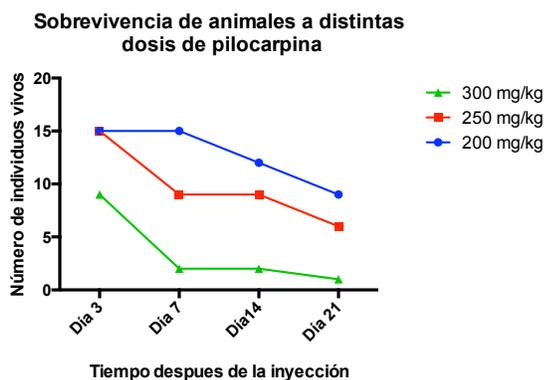


Figura 3. La sobrevivencia de los animales es inversamente proporcional a la dosis. Como se observa en la figura, la sobrevivencia en animales disminuye a medida que se le aumento la dosis de pilocarpina a lo largo de un curso temporal de 21 días ($n=30$ por cada dosis).

Para la realización del estudio era necesario que sobrevivencia de los animales por un largo período de tiempo, por lo cual, se encontró que la dosis más adecuada fue la de 250 mg/kg de peso. Dicha dosis permitió obtener un número similar de animales con *SE* (comparada con la dosis de 300 mg/kg de peso) y a su vez también permitió disminuir la tasa de mortalidad de los animales sometidos al modelo (Figura 3 y 4).

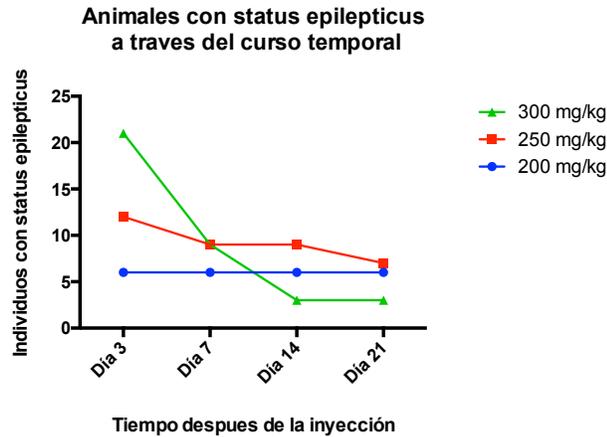


Figura 4. Porcentaje de animales con SE usando distintas dosis de pilocarpina a lo largo de un curso temporal. Como se observa en la gráfica, el número de animales fue mucho mayor con la dosis de 250 mg/kg peso en comparación con las otras dosis. (n=30 por cada dosis),

Sobreexpresión de la proteína de matriz extracelular Tenascina-C a lo largo del curso temporal agudo.

Aunque en distintos modelos de epilepsia del lóbulo temporal se ha reportado una sobreexpresión de la proteína TN-C mediante la inyección de ácido domoico o kaínico (Nakic et al., 1996), aún no se había descrito si la inyección de altas dosis de pilocarpina provoca el mismo efecto.

Para examinar si con dicho modelo se producía un aumento en la expresión de TN-C, se inyectaron animales con dosis altas del alcaloide (250mg/kg) y se analizó el contenido de la proteína en homogenados del hipocampo a lo largo de un curso temporal (1, 3 y 7 días).

Después de 24 horas de haberse inducido el SE, se observó un aumento estadísticamente significativo de la proteína TN-C en comparación con las muestras control (Figura 5).

De manera interesante, el aumento en la cantidad de la proteína TN-C se presentó a los 3 y 7 días posteriores a la inyección de pilocarpina (Figura 5).

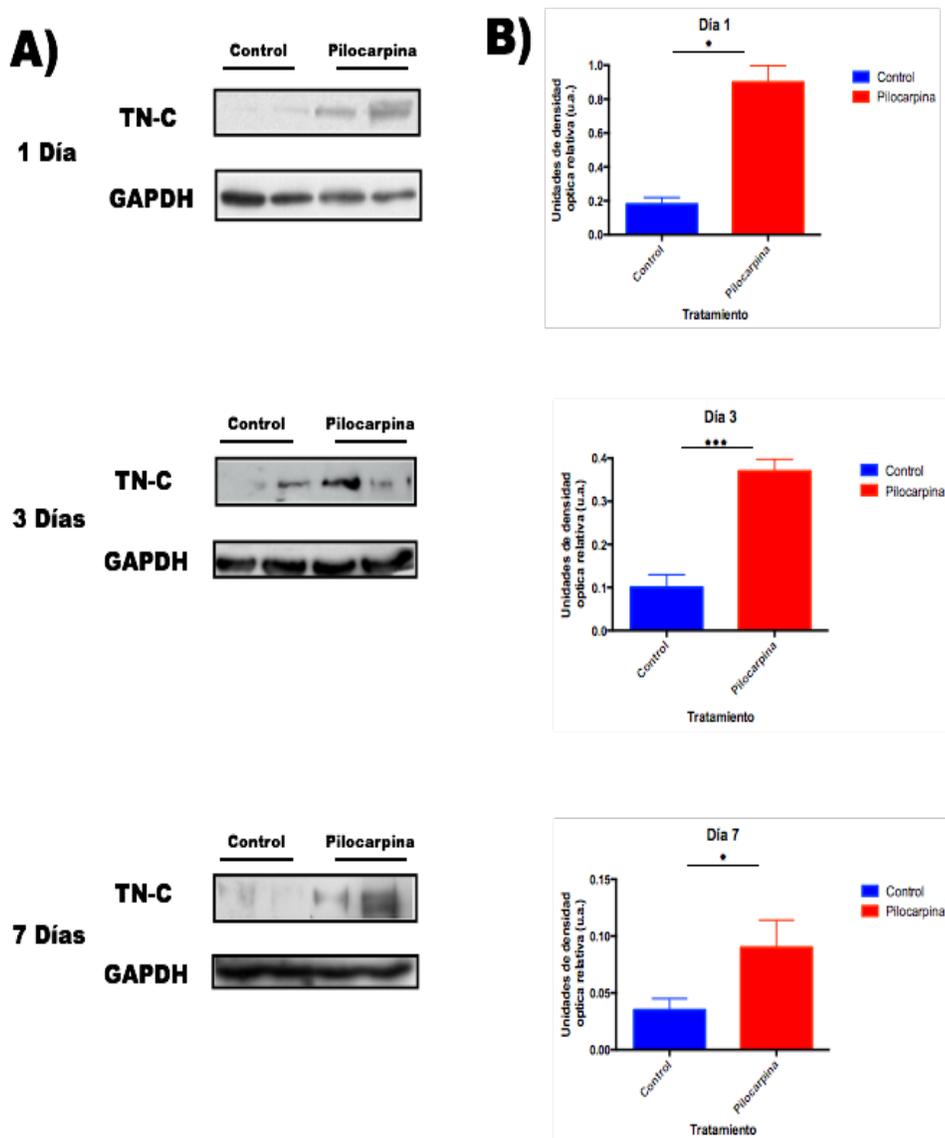


Figura 5 . Sobre-expresión de TN-C en homogenados hipocampales de animales con SE a través de un curso temporal. A) Inmunotransferencia representativa para la proteína TN-C. El carril 1 y 2 representa la inmunoreactividad de la TN-C en homogenados de hipocampos de animales control mientras que el carril 3 y 4 corresponde la

*inmunoreactividad de homogenados provenientes de animales con SE. Como se puede observar, el contenido de TN-C se incrementó significativamente a lo largo del curso temporal en la muestra de los animales con SE, mientras que la expresión de la proteína en los animales control fue baja o nula. B) Gráficas que muestran el análisis de la inmunotransferencia medido por unidades arbitrarias de densidad óptica relativa. Se utilizó una n=8 para cada muestra. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.*

Posteriormente, para poder identificar la distribución la TN-C en las distintas regiones del hipocampo, se realizó un análisis inmunohistoquímica. En secciones coronales del hipocampo de ratas controles, se encontró una ligera inmunoreactividad en regiones como el *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum-moleculare* y en el giro dentado del hipocampo. Por otro lado, en secciones de hipocampo de ratas tratadas con pilocarpina, se observó una fuerte inmunoreactividad en todas las regiones, siendo el giro dentado la región en donde se observaron los cambios más notables (Figura 6).

Además, en las secciones coronales de los hipocampos de todos los animales en los que se indujo *SE* mediante la inyección de altas dosis de pilocarpina, se observaron estructuras fibrosas alrededor de somas de las células granulares de esta región (Figura 6 B, D y F) comparado con sus respectivos controles (Figura 6 A, C, y F). Por otro lado, también se observó un aumento en la inmunoreactividad de TN-C a lo largo del curso temporal en la zona subgranular.

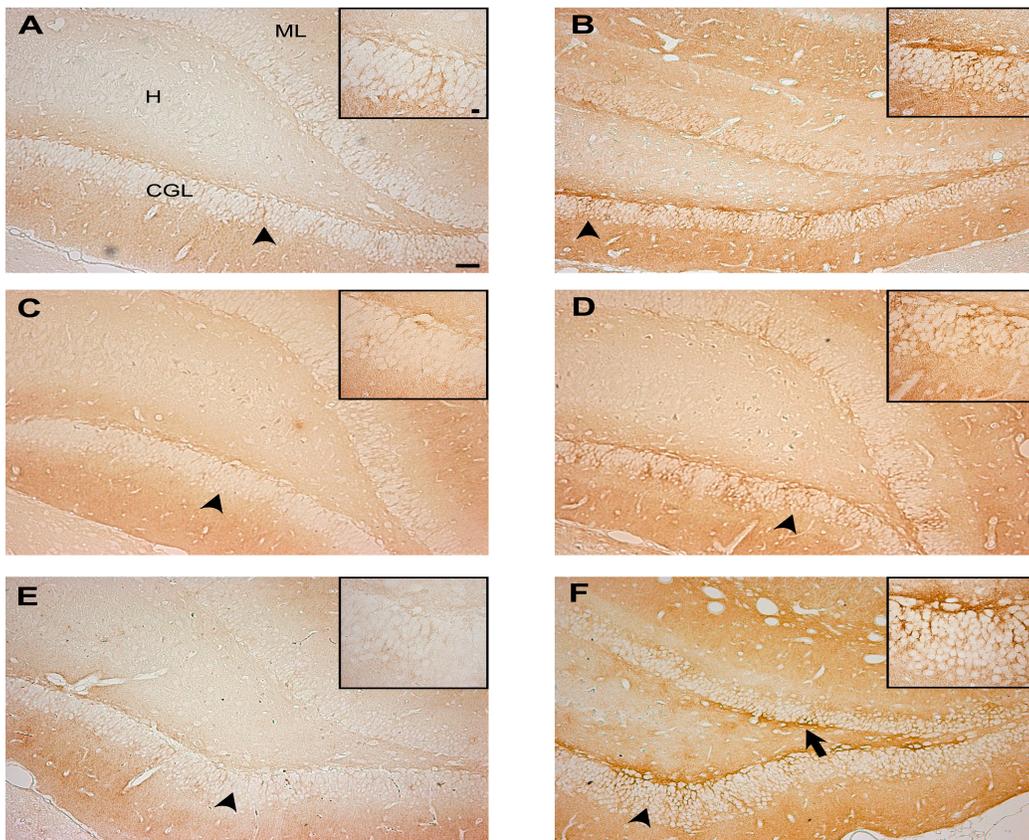


Figura 6. Distribución de la Tenascina C en cortes coronales de hipocampos. Fotomicrografía de hipocampos de animales control y de animales con posterior al SE a través del curso temporal (1,3 y 7 días). Nótese que el giro dentado de los animales con SE (B, D y F) muestran un incremento en la inmunoreactividad de la TN-C en comparación con el de los animales control (A, C y E). La inmunoreactividad se localiza principalmente en la periferia de las células del giro dentado (cabeza de flecha), en la zona subgranular (flecha) y en la capa molecular. H, hilus; ML, capa molecular; CGL, capa celular granular. Barras de escala = 50 μ m, 10X, 10 μ m 40X, respectivamente.

La activación de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta se encuentra involucrado en la sobreexpresión de Tenascina-C.

En previos estudios se había descrito una regulación en la expresión de niveles génico y proteico de la TN-C por parte de la de la vía de señalización del TGF- β , en distintas condiciones patológicas como la fibrosis pulmonar y el infarto al miocardio (Sakai et al., 1994; Jinnin et al., 2004; Liu et al., 2006; Dobaczewski et al., 2010).

Para identificar si esta vía de señalización podría estar involucrada en la sobreexpresión de TN-C en nuestro modelo, se realizó una inmunotransferencia en homogenados de hipocampo para observar el contenido TGF- β 1. Al realizarse el análisis densitométrico de los resultados obtenidos, se observó un incremento estadísticamente significativo en la banda de 25 kD que corresponde al TGF- β 1, (Liao et al., 2008) en los homogenados de hipocampos de los animales que recibieron la inyección de pilocarpina, en comparación con los controles (Figura 7). De manera interesante, el incremento en el contenido de TGF- β 1 se mantuvo a través del curso temporal (3 y 7 días) en comparación a sus respectivos controles.

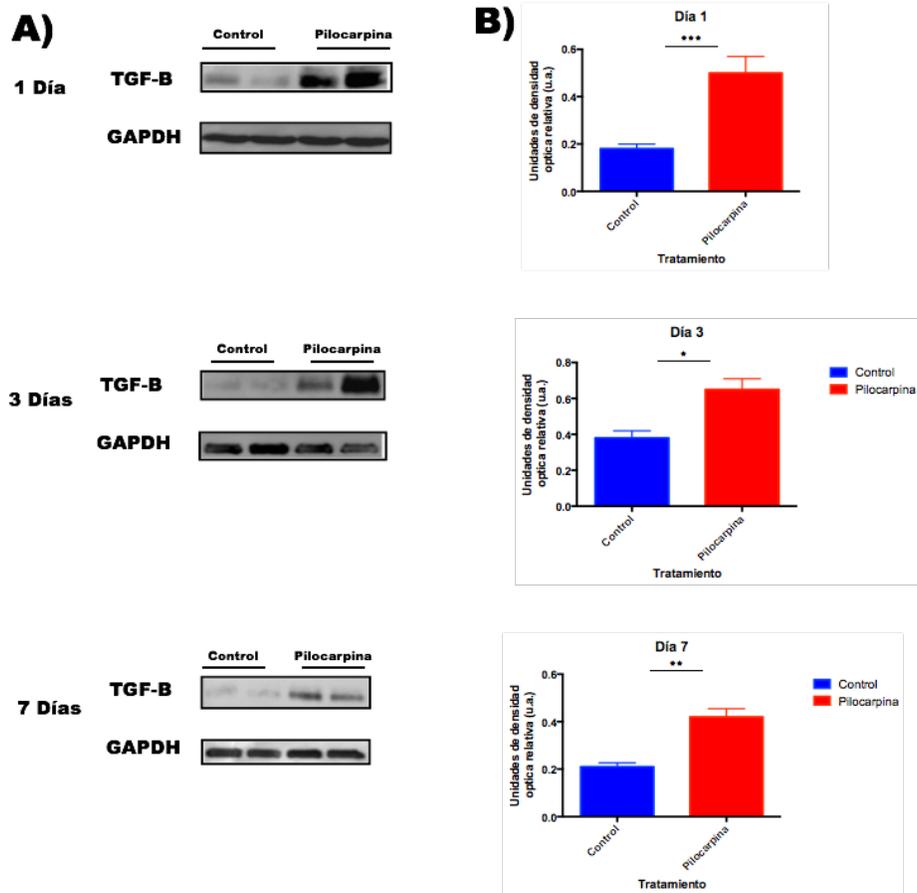


Figura 7. Aumento en el contenido de TGF- β 1 en homogenados hipocampales de animales con SE a lo largo del curso temporal. El carril 1 y 2 representa la inmunoreactividad de la TGF- β 1 en homogenados de hipocampos de animales control mientras que el carril 3 y 4 corresponde la inmunoreactividad de homogenados provenientes de animales con SE. Como se observa, el contenido de TGF- β 1 se incrementó significativamente a lo largo del curso temporal en la muestra de los animales con SE en comparación a sus respectivos controles. B) Gráficas que muestran el análisis de la inmunotransferencia medido por unidades arbitrarias de densidad óptica relativa. Se utilizó una $n=8$ para cada muestra. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Para poder examinar si el incremento en TGF- β se encontraba acompañado de la activación de los factores transcripcionales asociados a esta vía de señalización la familia de las proteínas Smad, se realizó un análisis de electrotransferencia utilizando un anticuerpo que

reconociera la fosforilación de las serinas 423 y 425 (pS423-425) del complejo Smad2/3, el cual junto con la proteína Smad 4, forman a su vez, un complejo oligomérico que se trasloca al núcleo, donde regula la expresión de sus genes blanco (Penn et al., 2012). Como se observa en la figura 8, el análisis mostró un aumento estadísticamente significativo de del contenido de pS423-425 (p-Smad2/3) en animales que fueron inducidos con estado epiléptico en todo el curso temporal en comparación con sus respectivos controles.

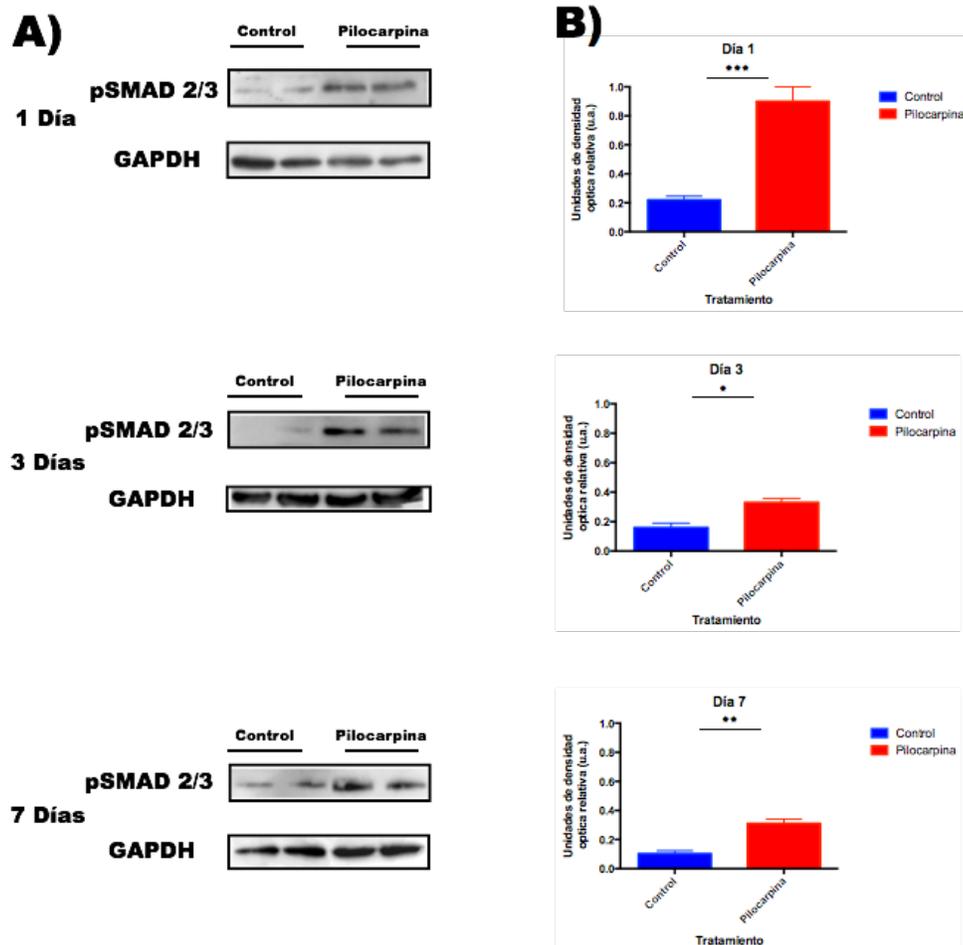


Figura 8. El estado epiléptico aumenta el contenido de del efector cascada abajo pSmad2/3 en homogenados hipocampales. A) Inmunotrasnferencia representativa para Smad2/3 fosoforilada. El carril 1 y 2 representa la inmunoreactividad de pSmad2/3 en

homogenados de hipocampos de animales control mientras que el carril 3 y 4 es corresponde la inmunoreactividad de homogenados provenientes de animales con SE. Como podemos ver en la figura, existe un mayor incremento del contenido de pSmad2/3 en todo el curso temporal, mientras que la expresión proteica de la muestra de los animales control fue mucho menor. B) Gráficas que muestran el análisis de la inmunotransferencia medido por unidades arbitrarias de densidad óptica relativa. Se utilizó una $n=8$ para cada muestra. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

El inhibidor específico del receptor de TGF- β tipo 1(SB-431542) revirtió parcialmente el incremento de TN-C y previene la traslocación del complejo pSmad2/3 al núcleo.

Para poder determinar efectivamente si la vía de señalización de TGF- β es la responsable del aumento de los niveles de proteína de TN-C, se realizó un experimento adicional, en el cual se utilizó el compuesto SB-431542, un inhibidor farmacológica que específico del receptor TGF- β tipo 1 (Halder et al., 2005).

En este sentido, se observó un incremento en el contenido de TN-C en homogenados de hipocampo de animales 24 horas posterior a la inducción del estado epiléptico como previamente se había demostrado (Figura. 1), sin embargo, en el grupo que fue tratado treinta minutos antes de la inducción del SE con el inhibidor SB-431542, solo se observó una reducción del contenido de TN-C no significativa en la fracción citoplásmica de los homogenados de hipocampo (Figura. 9).

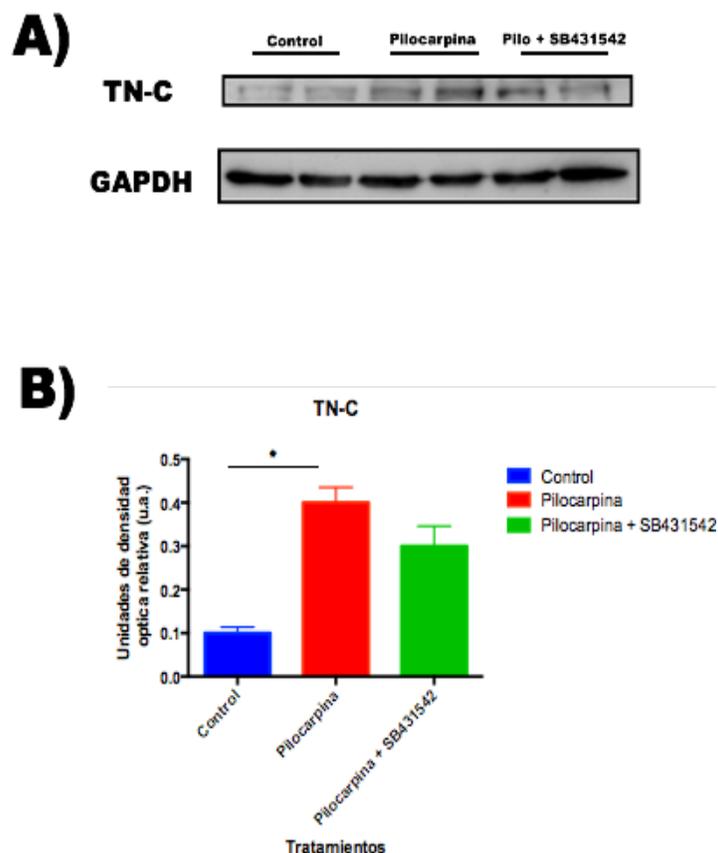


Figura 9. La inhibición de la vía de señalización del TGF- β revierte parcialmente las sobre-expresión de TN-C en tejido hipocampal de animales con SE. A) Inmunotransferencia representativa para TN-C. El carril 1 y 2 representa la inmunoreactividad de TN-C en homogenados de hipocampos de animales control mientras que el carril 3 y 4 corresponden la inmunoreactividad de TN-C en homogenados provenientes de animales con SE inyectados con vehículo y los carriles 5 y 6 corresponden la inmunoreactividad de TN-C en homogenados provenientes de animales con SE e inyectados con el inhibidor del receptor de TGF- β tipo I(SB-431542). B) Gráfica que muestran el análisis de la inmunotransferencia medido por unidades arbitrarias de densidad óptica relativa. Se utilizó una n=4 para cada muestra. * p<0.05.

En cuanto al efecto del SB-431542 en las proteínas efectoras de la señalización de TGF- β , se observó una reducción estadísticamente significativa en la traslocación al núcleo del complejo p-Smad2/3 en el grupo que fue tratado con el inhibidor en comparación con el grupo al cual únicamente se provocó el SE e inyectados con el vehículo, visto por el cociente del contenido de la fracción nuclear entre el valor de la fracción citoplasmática de p-Smad2/3 (Figura. 10).

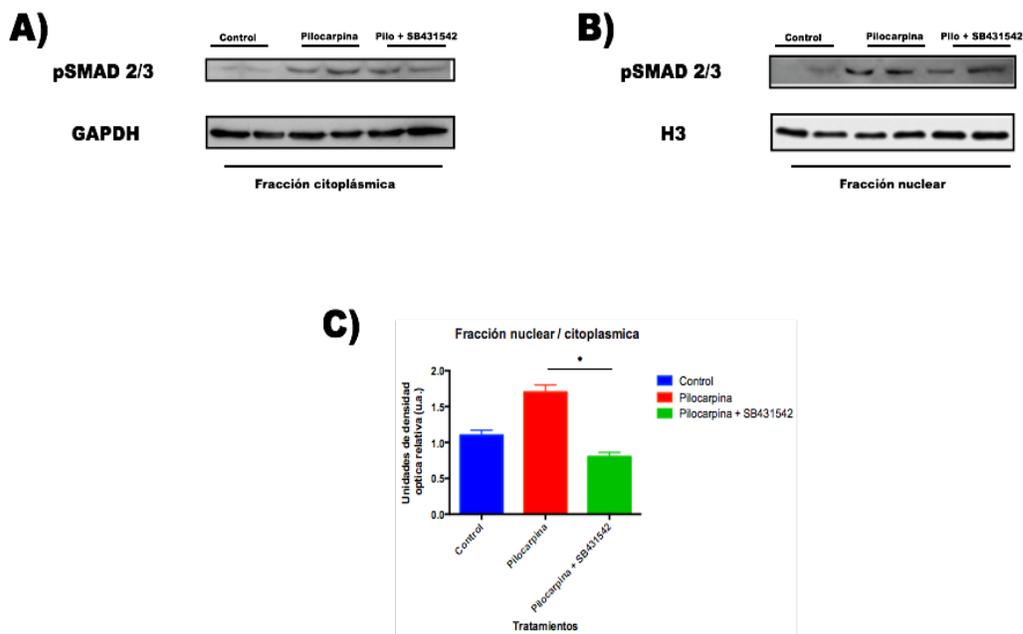


Figura 10. La inhibición de la vía de señalización del TGF- β promueve un cambio en la localización subcelular del complejo Smad2/3. A) Inmunotransferencia representativa de la fracción citoplásmica para pSmad2/3. El carril 1 y 2 representa la inmunoreactividad de pSmad2/3 en homogenados de hipocampos de animales control mientras que el carril 3 y 4 corresponden la inmunomarcaje de pSmad2/3 de homogenados provenientes de animales con SE e inyectados con vehículo y los carriles 5 y 6 corresponden la inmunoreactividad de

*pSmad2/3 en homogenados provenientes de animales con SE e inyectados con el inhibidor SB-431542. B) Inmunotransferencia representativa de la fracción nuclear para pSmad2/3. El carril 1 y 2 representa la inmunoreactividad de pSmad2/3 en homogenados de hipocampos de animales control mientras que el carril 3 y 4 corresponden la inmunomarcaje de pSmad2/3 de homogenados provenientes de animales con SE inyectados con vehículo y los carriles 5 y 6 corresponden la inmunoreactividad de homogenados pSmad2/3 provenientes de animales con SE e inyectados con el inhibidor SB-431542. C) Gráfica que muestran el análisis de las inmunotransferencias medidos por unidades arbitrarias de la densidad óptica relativa. Este análisis se obtuvo mediante el cociente de los valores de densidad óptica relativa de la fracción nuclear entre los valores de densidad óptica relativa de la fracción citoplásmica. Se utilizó una $n=4$ para cada muestra. $*p<0.05$.*

De manera consistente, no se observaron cambios en la localización de este complejo cuando se comparó al grupo tratado con el inhibidor en comparación con el grupo al cual no se le indujo estado epiléptico (grupo control) (Figura 10).

Discusión

El papel de la TN-C se ha descrito en varias funciones fisiológicas, tales como la migración celular y la interacción de célula a célula en el desarrollo de órganos, donde regula el comportamiento celular y la organización de la matriz extracelular durante la remodelación de los tejidos (Chiquet-Ehrismann y Tucker, 2011). También, se ha reportado que juega un papel importante en distintos procesos patológicos, tales como la

tumorigénesis, las heridas o la inflamación (Chiquet-Ehrismann y Chiquet, 2003; Midwood y Orend, 2009).

Con respecto a enfermedades neurológicas como la epilepsia, se ha demostrado que el mRNA de la TN-C aumenta en modelos farmacológicos de ELT provocados por inyecciones de ácido kaínico en ratas (Ferhat et al., 1996; Nakic et al., 1996). Además, análisis de microarreglos de cDNA procedentes de resecciones quirúrgicas de pacientes con ELT, realizados en laboratorio de Análisis Sensorial de la facultad de medicina de la UNAM a cargo de la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, se mostró una sobreexpresión en el gen de TN-C en el tejido hipocampal (Datos no publicados).

Los datos presentes en este trabajo de tesis, muestran que la proteína TN-C se sobreexpresa a lo largo del curso temporal en el modelo epileptogénico inducido por la pilocarpina y estas observaciones coinciden con lo encontrado en otros modelos farmacológicos (Figuras 5 y 9, Nakic et al., 1996). En este sentido, se observó un aumento en la proteína de matriz extracelular TN-C 24 horas posterior a la inyección de pilocarpina y permaneció a lo largo de los 3 y 7 días que duró el curso temporal. Estos datos son consistentes con los reportes científicos que han mostrado un aumento en el contenido de TN-C posterior al *SE* en otros modelos de epilepsia en ratas (Nakic et al., 1996), lo que sugiere un desequilibrio en la expresión de componentes de la matriz extracelular después de las convulsiones. Asimismo, en nuestros análisis inmunohistoquímicos del hipocampo también se detectó un aumento de la inmunoreactividad de TN-C a lo largo del curso temporal, en distintas regiones del hipocampo como el *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum-moleculare* de ratas con inducción al *SE*, mientras que en los controles sólo se detectó una ligera reactividad (Figura 6). Más importante aún, se observó un cambio más

evidente en algunas regiones del giro dentado, ya que no sólo se notó un aumento en la reactividad de TN-C sino también la presencia de inmunomarcaje semejante a fibras alrededor de los somas celulares de esta región (Aumento de Figura 6). Cabe mencionar, que en el giro dentado de los animales control no se detectó esta acumulación (Figura 6). Además, posterior a los siete días de la inducción del estado epiléptico por pilocarpina, se notó la aparición de la dispersión de las células granulares del giro dentado (Figura 6). Este cambio morfológico es una característica histopatológica importante observada en pacientes con ELT, haciendo notar que existen características morfológicas que comparten el modelo animal epileptogénico con las alteraciones presentes en la ELT (Houser, 1990). De esta manera la presencia de TN-C en el cambio histopatológico indicado, podría sugerir que la TN-C juega un papel importante en la no adhesión de las células granulares del giro dentado en esta condición.

Así mismo, estudios previos han mostrado que normalmente la expresión de TN-C se regula a la baja en el sistema nervioso central adulto, con la excepción de las zonas y regiones neurogénicas (Theodosis et al., 1997). Sin embargo, en condiciones patológicas como en la isquemia o traumatismos, un subconjunto de astrocitos que expresan la proteína acídica fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en ingles), responden a la lesión regulando a la alta la expresión de TN-C (Dobbertin et al., 2010). En este sentido, se ha descrito gliosis reactiva en el giro dentado de hipocampos de ratones, 12 horas después de haber inducido el SE mediante la inyección de pilocarpina (do Nascimento et al, 2012). Por lo tanto, es posible que el aumento de la producción de la proteína TN-C en el presente trabajo este mediada por este tipo de células gliales.

Por otra parte, el giro dentado especialmente la zona subgranular, se ha descrito un nicho involucrado en la aparición de células progenitoras neurales, ya sea en condiciones normales o en condiciones patológicas como la epilepsia (Curtis et al., 2011; de Araujo Furtado et al., 2012). También se ha reportado que la TN-C actúa como un marcador de células progenitoras neurales con un compromiso a diferenciarse hacia células gliales (Yagi et al., 2010). Si bien no se realizó el trabajo experimental para describir la neurogénesis, se observó un aumento en la reactividad de TN-C en toda la zona subgranular en todo momento sugiriendo que la TN-C podría estar jugando un papel en este evento (Figura 6).

Aunque existen varios mecanismos y vías de señalización que controlan los procesos de auto-renovación de las células neurales como por ejemplo las vías de señalización Wnt- β -catenina, Sonic-hedgehog y Notch; estos resultados podrían sugerir que la TN-C desempeña un papel importante en la proliferación de células neurales, y que éstas podrían estar generando no sólo neuronas sino que también astrocitos, fenómeno que no ha sido descrito en procesos epileptogénicos.

Por otra parte, la vía de señalización de TGF- β juega un papel importante debido a su implicación en una amplia variedad de procesos biológicos (Taylor y Khachigian, 2000). En este trabajo, se demostró un aumento en la expresión relativa de TGF- β 1 a las 24 horas, el cual se mantiene durante 3 días y para en el día 7, el aumento de TGF- β 1 es menor en comparación al de otros puntos durante el curso temporal. Estos resultados podrían sugerir dos posibilidades; la primera es que la vía de señalización de TGF- β se hace menos eficiente a lo largo del tiempo, o bien, que el mantenimiento de TN-C durante un curso temporal crónico (30 días, Nakic et al, 1996), es debido al desbalance en la regulación de proteínas que degradan a la TN-C. En este sentido, se conoce que las metaloproteinasas

(MMPs, por sus siglas en inglés) regulan la expresión de TN-C (Jones et al, 1997) y que la inhibición de estas atenúa la producción TN-C (Vyavahare et al, 2000), no obstante, se necesitan más experimentos para dilucidar estos supuestos en nuestro modelo.

Asimismo, se detectó un incremento en el contenido del complejo Smad2/3 en su forma activa (fosforilada), dándonos una medida directa de la activación de la vía de señalización de TGF- β durante todo el curso temporal (el efector inicial de esta vía de señalización), lo que sugiere que la activación de la vía de señalización del TGF- β podría ser la responsable de la sobreexpresión de TN-C (Figuras 9 y 10).

Ademas, de manera interesante la inhibición farmacológica de TGF- β mediante el uso del SB-431542, en nuestro modelo murino epiléptico revirtió solo parcialmente la producción de TN-C, aún cuando se encontró que esta inhibición si tiene un efecto en la activación y en la localización del complejo p-Smad 2/3, sugiriendo que otras vías de señalización o eventos pro-inflamatorios podrían estar regulando la expresión de TN-C en este modelo (Rettig et al., 1994).

De acuerdo con los presentes resultados, en este trabajo se ha descrito por primera vez la participación de la vía de señalización de TGF- β en la regulación de la proteína de matriz extracelular TN-C en el hipocampo de rata posterior al *SE* inducido por pilocarpina durante un curso temporal. Varios reportes científicos han demostrado la participación del TGF- β en la regulación de la expresión de la TN-C en cultivo celular y modelos de lesión (Jinnin et al, 2004; Mukaratirwa et al, 2005; Liu et al 2006; Carey et al, 2010); corroborando en parte, que la vía de señalización TGF- β está implicada en la producción de proteínas de matriz extracelular en modelos farmacológicos de ELT.

En resumen, estos resultados demuestran que la expresión de TN-C en condiciones patológicas como la epilepsia experimental podría estar mediada, en parte, por la activación de la vía de señalización del TGF- β .

Conclusiones

Actualmente, la epilepsia es el tercer desorden neurológico más común en el mundo, además de ser una de las enfermedades más prevalente en países del tercer mundo como México. A pesar de esto, la información que se tiene acerca de los mecanismos moleculares específicos encargados del desarrollo de la neurodegeneración de esta enfermedad es escasa. En este trabajo se logró analizar los niveles de expresión de la proteína matricelular TN-C, demostrando el incremento en su expresión de manera significativa a través de un curso temporal; además, se identificaron zonas específicas del hipocampo (giro dentado, zona subgranular y capa molecular) en donde se incrementó la expresión de esta proteína, permitiéndonos sugerir que la TN-C podría estar modulando un papel de no adhesión en la y estar involucrada en la dispersión de las células granulares del giro dentado, una característica prevalente en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal y en modelos animales epileptogénicos. Estos cambios morfológicos podrían estar contribuyendo a su vez, al desarrollo de circuitos epileptogénicos y a la neurodegeneración característica de esta enfermedad (Blumcke et al., 1999). Asimismo, se demostró que existe un aumento significativo en los niveles de expresión del TGF- β 1 y la forma fosforilada del factor de transcripción Smad 3, uno de los principales efectores de la vía de señalización, a lo largo del curso temporal, por lo que se sugiere que la activación de la vía de señalización del TGF- β produce un incremento en los niveles de expresión de TN-C y debido a esto se

contribuye a procesos de remodelación de la matriz extracelular en el hipocampo que contribuyen a la neurodegeneración y al desarrollo de circuitos epileptogénicos.

Agradecimientos

Se hace un especial agradecimiento al Dr. y amigo Octavio Fabián Mercado Gómez que no solo propuso el proyecto, si no que fue asesor de todo el trabajo experimental y me guió no solo en el desarrollo de este trabajo, sino también en mi formación académica como biólogo.

La QFB. Virginia Arriaga Avila, amiga y gran persona quien dio asesoría técnica en los experimentos de inmunohistoquímicas, sigue haciendo mejores los días en el laboratorio.

Además, agradezco a la Dra. Rosalinda Guevara Guzman quien supervisó todo este proyecto y proporcionó todos los recursos para poder realizar esta tesis de licenciatura.

A los demás miembros del laboratorio sensorial del departamento de Fisiología en la Facultad de Medicina los cuales siempre me guiaron en los experimentos.

Este trabajo pudo realizarse gracias al apoyo de los siguientes proyectos PAPIIT-DGAPA (N211913) y CONACyT (152613).

Publicaciones

Mercado-Gómez O, Landgrave-Gómez J, Arriaga-Avila V, Nebreda-Corona A, (2014) Role of TGF- β signaling pathway on Tenascin-C protein upregulation in a pilocarpine seizure model. *Epilepsy Res* (in press)

Referencias

Aroniadou-Anderjaska V, Fritsch B, Qashu F, Braga MF (2008) Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Res* 78:102-116.

de Araujo Furtado M, Rossetti F, Chanda S, Yourick D (2012) Exposure to nerve agents: from status epilepticus to neuroinflammation, brain damage, neurogenesis and epilepsy. *Neurotoxicology* 33:1476-1490.

Blümcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD (1999) Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 36:205-223.

Cacheaux LP, Ivens S, David Y, Lakhter AJ, Bar-Klein G, Shapira M, Heinemann U, Friedman A, Kaufer D (2009) Transcriptome profiling reveals TGF-beta signaling involvement in epileptogenesis. *J Neurosci* 29:8927-8935.

Carey WA, Taylor GD, Dean WB, Bristow JD (2010) Tenascin-C deficiency attenuates TGF- β -mediated fibrosis following murine lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299:L785-793.

Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K, Chiquet M (1988) Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 53:383-390.

Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M (2003) Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 200:488-499. Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP (2011) Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:1-19.

Curtis MA, Low VF, Faull RL (2012) Neurogenesis and progenitor cells in the adult human brain: a comparison between hippocampal and subventricular progenitor proliferation. *Dev Neurobiol* 72:990-1005.

Czuwara-Ladykowska J, Sementchenko VI, Watson DK, Trojanowska M (2002) Ets1 is an effector of the transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF-beta. *J Biol Chem* 277:20399-20408.

Dandachi N, Hauser-Kronberger C, Moré E, Wiesener B, Hacker GW, Dietze O, Wirl G (2001) Co-expression of tenascin-C and vimentin in human breast cells indicates

phenotypic transdifferentiation during tumour progression: correlation with histopathological parameters, hormone receptors, and oncoproteins. *J Pathol* 193:181-189.

Das A, Wallace GC 4th, Holmes C, McDowell ML, Smith JA, Marshall JD, Bonilha L, Edwards JC, Glazier SS, Ray SK, Banik NL (2012) Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. *Neuroscience* 220:237-246.

Dityatev A, Fellin T (2008) Extracellular matrix in plasticity and epileptogenesis. *Neuron Glia Biol* 4:235-247

Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG (2010) The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 48:504-511.

Dobbertin, A., Czvitkovich, S., Theocharidis, U., Garwood, J., Andrews, M.R., Properzi, F., Lin, R., Fawcett, J.W., Faissner, A., 2010. Analysis of combinatorial variability reveals selective accumulation of the fibronectin type III domains B and D of tenascin-C in injured brain. *Exp. Neurol.* 225, 60-73.

do Nascimento, A.L., Dos Santos, N.F., Campos Pelági, F., Aparecida Teixeira, S., de Moraes Ferrari, E.A., Langone F., 2012. Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 1470, 98-110.

El-Karef A, Kaito M, Tanaka H, Ikeda K, Nishioka T, Fujita N, Inada H, Adachi Y, Kawada N, Nakajima Y, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T (2007) Expression of large tenascin-C splice variants by hepatic stellate cells/myofibroblasts in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 46:664-673.

Engel J Jr (1998) Classifications of the International League Against Epilepsy: time for reappraisal. *Epilepsia* 39:1014-1017.

Ferhat L, Chevassus au Louis N, Jorquera I, Niquet J, Khrestchatisky M, Ben-Ari Y, Represa A (1996) Transient increase of tenascin-C in immature hippocampus: astroglial and neuronal expression. *J Neurocytol* 25:53-66.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League of Epilepsy (ILAE) and the International Bureau of Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46: 270-276

Flanders KC, Ren RF, Lippa CF (1998) Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol* 54:71-85.

Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, Shan K, Aggeli C, Reardon M, Letsou GV, Espada R, Ramchandani M, Entman ML, Zoghbi WA (2002) Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 39:1468-1474.

Halder, S.K., Beauchamp, R.D., Datta, P.K., 2005. A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. *Neoplasia* 7, 509-521.

Haas CA, Dudeck O, Kirsch M, Huszka C, Kann G, Pollak S, Zentner J, Frotscher M (2002) Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 22:5797-5802.

Heck N, Garwood J, Loeffler JP, Larmet Y, Faissner A (2004) Differential upregulation of extracellular matrix molecules associated with the appearance of granule cell dispersion and mossy fiber sprouting during epileptogenesis in a murine model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 129:309-324.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.

Houser CR (1990) Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 535:195-204.

Jinnin M, Ihn H, Asano Y, Yamane K, Trojanowska M, Tamaki K (2004) Tenascin-C upregulation by transforming growth factor-beta in human dermal fibroblasts involves Smad3, Sp1, and Ets1. *Oncogene* 23:1656-1667.

Joester A, Faissner A (2001) The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol* 20:13-22.

Jones, P.L., Crack, J., Rabinovitch, M., 1997. Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J. Cell Biol.* 139, 279-293.

Kawabata M, Inoue H, Hanyu A, Imamura T, Miyazono K (1998) Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO J* 17:4056-4065.

Liao CW, Fan CK, Kao TC, Ji DD, Su KE, Lin YH, Cho WL (2008) Brain injury-associated biomarkers of TGF-beta1, S100B, GFAP, NF-L, tTG, AbetaPP, and tau were concomitantly enhanced and the UPS was impaired during acute brain injury caused by *Toxocara canis* in mice. *BMC Infect Dis* 8:84.

Liu Z, Lu X, Wang H, Gao Q, Cui Y (2006) The up-regulated expression of tenascin C in human nasal polyp tissues is related to eosinophil-derived transforming growth factor beta1. *Am J Rhinol* 20:629-633.

Lotz MM, Burdsal CA, Erickson HP, McClay DR (1989) Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J Cell Biol* 109:1795-805.

Lu Y, Xue T, Yuan J, Li Y, Wu Y, Xi Z, Xiao Z, Chen Y, Wang X (2009) Increased expression of TGFbeta type I receptor in brain tissues of patients with temporal lobe epilepsy. *Clin Sci (Lond)* 117:17-22.

Mares P. (2012) Models of epileptic seizures in immature rats. *Physiological Research* 1:S103-8

Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, Iyer AM, Rossetti C, Molteni M, Casalgrandi M, Manfredi AA, Bianchi ME, Vezzani (2010) A Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med* 16:413-419.

Midwood KS, Orend G (2009) The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 3:287-310.

Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebault A, Chan E, Drexler S, Sofat N, Kashiwagi M, Orend G, Brennan F, Foxwell B (2009) Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med* 15:774-780.

Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH (1991) A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J* 10:1091-1101.

Mukaratirwa S, Koninkx JF, Gruys E, Nederbragt H (2005) Mutual paracrine effects of colorectal tumour cells and stromal cells: modulation of tumour and stromal cell differentiation and extracellular matrix component production in culture. *Int J Exp Pathol* 86:219-229.

Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997) TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 16:5353-5362.

Nakic M, Mitrovic N, Sperk G, Schachner M (1996) Kainic acid activates transient expression of tenascin-C in the adult rat hippocampus. *J Neurosci Res* 44:355-362.

Niquet J, Jorquera I, Faissner A, Ben-Ari Y, Represa A (1995) Gliosis and axonal sprouting in the hippocampus of epileptic rats are associated with an increase of tenascin-C immunoreactivity. *J Neurocytol* 24:611-624.

Nishioka T, Onishi K, Shimojo N, Nagano Y, Matsusaka H, Ikeuchi M, Ide T, Tsutsui H, Hiroe M, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K (2010) Tenascin-C may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1072-1078.

Okamoto OK, Janjoppi L, Bonone FM, Pansani AP, da Silva AV, Scorza FA, Cavaleiro EA (2010) Whole transcriptome analysis of the hippocampus: toward a molecular portrait of epileptogenesis. *BMC Genomics* 11:230.

Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ (2012) The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma* 2:18-28.

Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation II Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281-294.

Rettig WJ, Erickson HP, Albino AP, Garin-Chesa P (1994) Induction of human tenascin (neuronectin) by growth factors and cytokines: cell type-specific signals and signalling pathways. *J Cell Sci* 107 :487-497.

Sakai T, Kawakatsu H, Ohta M, Saito M (1994) Tenascin induction in tenascin nonproducing carcinoma cell lines in vivo and by TGF-beta 1 in vitro. *J Cell Physiol* 159:561-572.

Scheffler B, Faissner A, Beck H, Behle K, Wolf HK, Wiestler OD, Blümcke I (1997) Hippocampal loss of tenascin boundaries in Ammon's horn sclerosis. *Glia* 19:35-46.

Scorza Fulvio A., Arida Ricardo M., Naffah-Mazzacoratti Maria da Graça, Scerni Débora A., Calderazzo Lineu, Cavalheiro Esper A. (2009) The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned?. *An. Acad. Bras. Ciênc.*

Taylor LM, Khachigian LM (2000) Induction of platelet-derived growth factor B-chain expression by transforming growth factor-beta involves transactivation by Smads. *J Biol Chem* 275:16709-16716.

Theodosis, D.T., Pierre, K., Cadoret, M.A., Allard, M., Faissner, A., Poulain, D.A., 1997. Expression of high levels of the extracellular matrix glycoprotein, tenascin-C, in the normal adult hypothalamoneurohypophysial system. *J. Comp. Neurol.* 379, 386-398.

Vyavahare, N., Jones, P.L., Tallapragada, S., Levy, R.J., 2000. Inhibition of matrix metalloproteinase activity attenuates tenascin-C production and calcification of implanted purified elastin in rats. *Am. J. Pathol.* 157, 885-893.