



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN
MITOCONDRIAL EN EL DAÑO HIPOCAMPAL EN UN MODELO MURINO DE
STATUS EPILEPTICUS INDUCIDO CON LITIO-PILOCARPINA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Jael Solís Navarrete



México, D.F. Octubre 2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre.**

VOCAL: **Profesora: Mireya Rodríguez Penagos.**

SECRETARIO: **Profesora: Rosalinda Guevara Guzmán.**

1er. SUPLENTE: **Profesor: José Ignacio Paramo Ramírez.**

2° SUPLENTE: **Profesora: Vanessa Rebeca Maya Ampudia.**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA; LABORATORIO SENSORIAL 1 Y 2, FACULTAD DE
MEDICINA, CIUDAD UNIVERSITARIA**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Laura Elena Córdova Dávalos

SUSTENTANTE:

Jael Solís Navarrete

Agradecimientos

A mis padres, por ser mis pilares, mi ejemplo e inspiración.

A mis hermanos quienes me dieron su paciencia y apoyo en todo momento.

A mi compañero de viaje, quien hizo esto posible.

Al Dr. Octavio Mercado, Q.F.B Virginia Arriaga Ávila y al Biólogo Alfredo Miranda Martínez por su apoyo técnico brindado.

A mi asesora técnica, Laura Córdova por aconsejarme y enseñarme tantas cosas.

A mi compañera y amiga Dulce Carrera, quien fue mi guía en este proyecto.

A mis amigos y compañeros que siguieron insistiendo en no desistir en la tarea.

A los sinodales quienes dedicaron horas de su valioso tiempo en esta tesis.

Al proyecto de CONACyT No. 152613. Análisis del perfil de expresión génica y proteínica de vías de señalización olfatorio en un modelo animal y en hipocampo de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal.

Al proyecto DGAPA-PAPIIT No. IN211913. Análisis de la participación de las proteínas de fisión y fusión mitocondrial en el daño hipocampal y del bulbo olfatorio en un modelo murino de *status epilepticus* inducido con litio-pilocarpina.

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| ANOVA | Análisis de varianza |
| APS | Persulfato de amonio |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| °C | Grados Celsius |
| Ca ²⁺ | Calcio |
| c.b.p. | Cuanto baste para |
| cDNA | DNA complementario |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNAmit | DNA mitocondrial |
| Drp1 | Proteína relacionada a la familia de las dinaminas tipo-1 |
| DTT | Ditiotreitol |
| EA | Enfermedad de Alzheimer. |
| EEG | Electroencefalograma |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EGTA | Ácido etilenglicol tetraacético |
| ELT | Epilepsia de lóbulo temporal |
| EP | Enfermedad de Parkinson |
| Fis1 | Proteína de la fisión mitocondrial en mamíferos |
| g | Aceleración de la gravedad |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| ILAE | International League Against Epilepsy |

| | |
|---------------------------|---|
| i.m. | Vía de administración intramuscular |
| i.p. | Vía de administración intraperitoneal |
| KCl | Cloruro de potasio |
| kDa | Kilo dalton |
| KH_2PO_4 | Fosfato de potasio monobásico |
| kg | Kilogramo |
| L | Litro |
| M | Concentración Molar |
| mM | Mili molar |
| MitoPLD | Mitofosfolipasa D |
| Mfn1 | Proteína Mitofusina 1 |
| mg | miligramo |
| mL | Mililitro |
| MME | Membrana mitocondrial externa |
| MMI | Membrana mitocondrial interna |
| m/v | Porcentaje masa-volumen |
| NaCl | Cloruro de Sodio |
| Na_2HPO_4 | Bifosfato de sodio |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPA1 | Proteína de la atrofia óptica tipo-1 |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PPSE | Potenciales Postsinápticos Excitatorios |

| | |
|-------------|--|
| PPSI | Potenciales Postsinápticos Inhibidores |
| PTZ | Pentilentetrazol |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNAm | RNA mensajero |
| ROS | Reactive Oxygen Species, Especies reactivas de oxígeno |
| rpm | revoluciones por minuto |
| s.c. | Vía de administración subcutánea |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SDS-PAGE | Gel de poliacrilamida desnaturalizante |
| SE | Status Epilepticus |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| TBS-Tween | Buffer salino con tween |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina |
| Tris | Tris-(hidroximetil)-aminoetano |
| V | Volt |
| VDAC | Canales de aniones dependiente de voltaje |
| VIH | Virus de Inmunodeficiencia Humana |
| v/v | Porcentaje volumen-volumen |
| µg | Microgramo |
| µL | Microlitro |

ÍNDICE

| | |
|--------------------------|----|
| RESUMEN..... | 9 |
| INTRODUCCIÓN..... | 11 |
| JUSTIFICACIÓN | 27 |
| OBJETIVO | 28 |
| HIPÓTESIS | 29 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 30 |
| RESULTADOS | 35 |
| DISCUSIÓN | 43 |
| CONCLUSIONES | 47 |
| PERSPECTIVAS | 48 |
| APÉNDICE | 49 |
| REFERENCIAS | 53 |

RESUMEN

La epilepsia es un trastorno neurológico caracterizado por descargas cerebrales espontáneas, recurrentes y paroxísticas; clínicamente conduce a alteraciones persistentes en la función y la morfología de las neuronas.

Debido a la alta prevalencia de la enfermedad así como la presencia de un alto porcentaje de pacientes fármacoresistentes, es necesario realizar nuevos estudios que nos permitan comprender los mecanismos básicos fisiopatológicos.

En diversos trastornos neurológicos, se han observado alteraciones en la morfología y función mitocondrial tales como la presencia de mitocondrias alargadas o fragmentadas y la disminución en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria. Las mitocondrias realizan una gran variedad de funciones en la célula, incluyendo la producción de energía, y la regulación de la apoptosis. Aún no es claro como estas diversas funciones se coordinan entre todas las mitocondrias en una célula, pero probablemente depende de la naturaleza dinámica de la mitocondria. Se sabe que las mitofusinas (Mfn1 y Mfn2) y OPA1 (proteína de atrofia óptica, Optical Atrophy Protein 1) son importantes para la fusión mitocondrial.

Utilizando un modelo de litio-pilocarpina para inducir *status epilepticus*, se estudiaron los cambios en la expresión de las proteínas de fusión mitocondrial Mfn1 y OPA1. En el estudio se observó un aumento significativo en la expresión proteica a los tres días posteriores al daño hipocampal iniciado en el SE. Sin embargo, los niveles de transcrito se mantienen sin cambio alguno.

Estos resultados nos sugieren que, como respuesta al daño, aumenta la actividad de fusión mitocondrial permitiendo que estas se concentren en

un espacio más delimitado y puedan intercambiar moléculas para reparar el daño mitocondrial.

INTRODUCCIÓN

1.-Epilepsia

La epilepsia, de acuerdo con la Liga internacional contra la epilepsia, ILAE por sus siglas en inglés (International League Against Epilepsy), es un trastorno neurológico caracterizado por una predisposición duradera para generar ataques epilépticos y que puede tener consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales.¹² La OMS en su sitio web (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>) menciona que es una condición que afecta a alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo. En México, la prevalencia de pacientes con epilepsia es del 1 al 2%²², lo cual sugiere que en nuestro país existen por lo menos un millón de personas con alguna forma de epilepsia.¹⁷ Aproximadamente un 30% de los pacientes epilépticos no se controlan con medicación, por lo que es necesario valorar otras opciones terapéuticas. La alta prevalencia de la enfermedad, así como la ausencia de un tratamiento antiepiléptico, hace necesario realizar nuevos estudios y crear modelos experimentales en animales que nos permitan comprender los **mecanismos básicos fisiopatológicos**¹³.

Las causas de la epilepsia son varias, por ejemplo: hipoxia-isquemia, infecciones, traumatismos, malformaciones congénitas, alteraciones innatas del metabolismo, neoplasias e intoxicaciones, entre otras.²⁴ Existen cuatro grupos en que se dividen las diversas causas de la epilepsia: ²⁵

- Causas de origen genético o presumiblemente genético donde no hay anomalías anatómicas. Aquí se incluyen a la epilepsia

autosómica dominante de lóbulo frontal, el síndrome de Dravet y la epilepsia mioclónica severa de la infancia.

- Causas congénitas o adquiridas asociadas con anomalías anatómicas o patológicas y/o características clínicas. Se incluyen causas como el síndrome de West, el síndrome de falla renal mioclónica, esclerosis tuberculosa, neurofibromatosis, síndrome de Angelman, desórdenes en el ciclo de la urea, desórdenes en el metabolismo de los folatos y la cobalamina, microcefalia, quistes aracnoides y el síndrome de Rett. Además de la esclerosis hipocámpica, traumatismos craneales, parálisis cerebral, gliomas, meningitis viral y bacteriana, encefalitis, malaria, neurocisticercosis, tuberculosis, VIH, hemorragia cerebral, hidrocefalia y porencefalia.
- Casos donde existe un factor sistémico o ambiental que es predominantemente la causa y no se observan cambios anatómicos. Entre dichas causas se hallan el alcoholismo, la drogadicción, fiebre y los desórdenes en el ciclo sueño-vigilia.
- Epilepsia idiopática: epilepsia sintomática cuya causa se desconoce. Aun en nuestros días este grupo sigue siendo una categoría importante, lo que representa alrededor de un 40% de los casos existentes.

Los síntomas varían de persona a persona. Algunas experimentan simples episodios de ausencia mientras que otras presentan convulsiones violentas y pérdida del estado de alerta.¹¹

Los factores de riesgo más comunes para la epilepsia son las enfermedades cerebrovasculares, los tumores cerebrales, el alcohol, las lesiones traumáticas cerebrales, malformaciones del desarrollo cortical,

herencia genética y las infecciones del sistema nervioso central. En los países de escasos recursos las infecciones endémicas como el paludismo y la neurocisticercosis parecen ser los principales factores de riesgo.²⁴

Existen **tres tipos de convulsiones: las crisis de ausencia o “pequeño mal”, las convulsiones generalizadas o “gran mal”¹¹** y las convulsiones focales. **La crisis de ausencia se caracteriza por episodios de “desconexión”,** donde el paciente queda inmóvil, con la vista fija, inconsciente y no reactivo a estímulos. Su duración es de 5 a 20 segundos, son de ocurrencia diaria, muchas veces al día y de inicio y término abrupto.¹

Las crisis generalizadas, como lo indica su nombre, involucran a ambos hemisferios cerebrales, éstas pueden ser de tipo clónicas, tónicas o clónico-tónicas. La crisis clónica se refiere a una crisis convulsiva con movimientos repetitivos. Las crisis tónicas consisten en la rigidez de todo el cuerpo donde inclusive se pueden adoptar posturas atípicas. Por último, las crisis tónico-clónicas presentan los elementos antes mencionados; generalmente, inician con una rigidez corporal seguida de un periodo de convulsiones.¹

La mayoría de todas las formas de epilepsia se desarrollan en un determinado período de tiempo. Es decir, en algún momento de la vida, el cerebro funciona normalmente, pero después de cierta secuencia de desarrollo o en respuesta a algún tipo de daño, se genera un estado nuevo en el cual los circuitos neuronales llegan a ser hiperexcitables, originando crisis recurrentes y espontáneas.¹⁷ Los estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que los pacientes con epilepsia crónica sufren degeneración cerebral progresiva que se acompaña de cambios en el comportamiento a largo plazo y la disminución cognitiva a pesar de contar con un tratamiento antiepiléptico óptimo.⁹

2.-Fisiopatología de la epilepsia.

Las señales eléctricas de las neuronas se producen de dos formas: el potencial de acción, que se propaga a lo largo del axón de la neurona desde el soma y la transmisión sináptica que permite la transmisión de la señal entre neuronas y se realiza mediante impulsos químicos que se convierten en señales eléctricas.

La propagación de los potenciales de acción a lo largo de los axones transmite información en el sistema nervioso central. Cuando la terminal presináptica del axón es estimulada por un potencial de acción se produce la entrada de Ca^{2+} en la célula, y ésta desencadena la liberación de neurotransmisores. Los neurotransmisores se acoplan a los receptores de membrana postsinápticos. Este proceso da lugar a potenciales postsinápticos excitadores (PPSE) e inhibidores (PPSI). La suma de los PPSE y PPSI sincronizados da lugar a la actividad eléctrica que se registra en el cerebro y se conoce con el nombre electro-encefalograma (EEG). Glutamato y aspartato son los principales neurotransmisores excitadores del sistema nervioso central (SNC), mientras que el ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio.¹⁴

En cuanto a la corteza cerebral, se distinguen tres tipos de corteza cerebral: paleocórtex, arquicórtex y neocórtex. El paleocórtex lo constituye la corteza olfatoria y piriforme, el arquicórtex incluye el hipocampo y el giro dentado, y el neocórtex el resto de la corteza cerebral.¹⁸ Las epilepsias afectan a estas estructuras de la corteza cerebral y sus conexiones con las estructuras diencefálicas y el tronco cerebral.

La epileptogénesis es el proceso dinámico por el cual el cerebro se convierte en epiléptico y comienza a generar crisis epilépticas

espontáneas y recurrentes.¹⁷ El desarrollo de la epilepsia se debe a una despolarización excesiva de la membrana de las neuronas epileptógenas que origina, por un lado, una descarga neuronal unitaria de alta frecuencia y, por el otro, cambios hiperpolarizantes compensatorios que tratan de regular esta descarga. La epileptogénesis está causada por alteraciones en poblaciones neuronales que dan lugar a la disminución de sus propiedades inhibitorias o al aumento de las excitadoras. Las alteraciones electrolíticas, los fármacos y los tóxicos pueden dar lugar a crisis epilépticas por alterar el equilibrio entre la excitabilidad y la inhibición neuronal.²⁷

Además, la epilepsia se debe a un reclutamiento anormal de las neuronas formando un foco epiléptico y de las neuronas vecinas o distantes, lo que origina una hipersincronía de las descargas neuronales individuales. De este modo, los fenómenos despolarización-hiperpolarización junto con descargas neurales excesivas e hipersincrónicas son la esencia de la actividad convulsiva, y estos fenómenos son comunes a todos los tejidos cerebrales epilépticos independientemente de la causa que los produce y de la región cerebral.²²

No se conoce claramente el mecanismo por el cual las lesiones cerebrales producen crisis epilépticas, pero se ha considerado que el tejido cortical aledaño a la zona de lesión más que la lesión epiléptica en sí misma, es el responsable de las convulsiones.²⁷

Durante la etapa convulsiva, la corteza cerebral adyacente a la lesión epiléptica muestra una reducción significativa en su espesor y en el número de células en todas las capas corticales y durante la etapa de remisión se observa una reducción significativamente mayor en el espesor y en la composición de las células corticales que en la etapa convulsiva.⁵

Las diferentes formas de las crisis epilépticas dependen de la región y las proyecciones anatómicas involucradas. La evidencia experimental indica que el cerebro anterior, principalmente en regiones relacionadas con el sistema límbico, participa en la inducción de las convulsiones caracterizadas por crisis clónicas faciales y de los miembros anteriores, pero no para otros componentes de las crisis clónicas y tónicas.¹⁷

En estudios de microscopía electrónica, las células piramidales del neocórtex mostraron evidencia de una degeneración lenta y progresiva: aumento de la densidad de la matriz citoplásmica y deformación de la mitocondria.²⁷

El estado epiléptico, *status epilepticus* (SE), o la condición de las crisis epilépticas prolongadas se asocia con una significativa morbilidad y mortalidad.⁹ La presencia de una crisis continua mayor a cinco minutos o varias crisis sin recuperación del estado de conciencia entre ellas, caracteriza al SE, mientras que la mayoría de las crisis convulsivas tienen una duración de 1-2 minutos. Sin embargo, la somnolencia o estupor y el estado de confusión que sufren los pacientes una vez que han sufrido una crisis pueden hacer difícil el determinar si el paciente ha presentado o no recuperación del estado de conciencia entre las crisis, por lo que su distinción del *status epilepticus* puede constituir un reto diagnóstico para el clínico. En humanos y modelos animales resulta en daño cerebral significativo y aumenta el riesgo de convulsiones posteriores, junto con un patrón característico de pérdida de células neuronales especialmente en el hipocampo.⁹

3.-Modelos animales utilizados en el estudio de la epilepsia.

Existen diversos modelos experimentales de epilepsia; éstos se dividen principalmente en agudos y crónicos. Los de epilepsia aguda se inducen por la administración de fármacos convulsivos o por estimulación eléctrica. Los de epilepsia crónica requieren de mayor cuidado, trabajo y coste económico, pero se ha comprobado que reproducen mejor la fisiopatología de la epilepsia en humanos.¹³

Entre los más utilizados están los modelos de epilepsia temporal media, los cuales se emplean para estudiar la esclerosis temporal medial; de éstos, el *kindling* y el modelo del estado epiléptico son los más usados. Ambos tienen en común la capacidad de inducir un estado epiléptico crónico pero difieren en el proceso de epileptogénesis.

El kindling consiste en la estimulación repetida, eléctrica o química, sobre diversas estructuras del sistema límbico (habitualmente amígdala, corteza e hipocampo) de modo que, con el paso del tiempo hay un aumento de la excitabilidad y las neuronas se transforman en "neuronas patológicas" capaces de generar crisis epilépticas; primero, cuando se les estimula y, posteriormente, en algunos modelos de animales, también de forma espontánea.

Por otra parte se encuentra el modelo de SE: en este caso se aplican mediante una inyección sistémica o intracerebral diferentes agentes convulsivos, como el ácido kaínico y la pilocarpina. Esto da lugar a un estado epiléptico agudo con crisis tónico-clónicas generalizadas que constituye el evento inicial. Tras este episodio, aparece una fase libre de crisis o latente, que puede durar semanas, tras lo que se inician las crisis de forma espontánea y recurrente (fase crónica).

El ácido kaínico fue uno de los primeros compuestos utilizados para modelar la Epilepsia de Lóbulo Temporal (ELT) en roedores. Es un análogo del L-glutamato, su administración sistémica o intracerebral causa la despolarización neuronal y convulsiones; se ha observado que afecta preferentemente al hipocampo. Al administrar a roedores con el compuesto muestran convulsiones recurrentes, regularmente generalizadas y de frecuencia variable, con correlación histopatológica notable con la esclerosis hipocampal. Tiene la ventaja de causar lesiones habitualmente restringidas del hipocampo, a diferencia de la pilocarpina, que también puede producir lesiones en áreas neocorticales. No obstante, estas zonas también están significativamente comprometidas en la ELT humana, lo cual hace a la pilocarpina una buena elección como quimioconvulsivante.

La pilocarpina es un agonista de los receptores muscarínicos de acetilcolina. La inyección sistémica o intracerebral de pilocarpina provoca convulsiones que desembocan en un SE límbico. Posteriormente se presentan daños estructurales y el desarrollo de convulsiones recurrentes y espontáneas similares a las de las crisis parciales complejas en humanos. Además, hay varias similitudes neuroquímicas entre la ELT y el modelo de pilocarpina. Por ejemplo, el déficit cognitivo y de memoria comúnmente hallados en pacientes con ELT está presente en ratas tratadas con pilocarpina.¹⁵

Los estudios anatómicos del hipocampo de las ratas sometidas a este método muestran alteraciones muy similares a las de la esclerosis temporal medial del humano con muerte neuronal y astrogliosis en el hipocampo y amígdala. El uso de estos modelos experimentales nos permite no sólo ver si los cambios anatómico-patológicos son similares en

la fase tardía, sino también analizar las modificaciones que ocurren en fases iniciales y durante la epileptogénesis.

Otros compuestos como el pentilentetrazol (PTZ), la estriquina, N-metil-D, L-aspartato, la toxina tetánica, y la penicilina son ampliamente utilizados como modelos de convulsiones agudas, y no como modelos animales de epilepsia. La diferencia es que el modelo de convulsiones puede servir para la detección rápida de la acción de fármacos antiepilépticos, pero no necesariamente resulta en epilepsia crónica.¹⁵

4.-Estudio de las mitocondrias en enfermedades neurodegenerativas.

Las neuronas son células metabólicamente activas con altas demandas de energía en lugares distantes del cuerpo celular. Como resultado, estas células son particularmente dependientes de la función mitocondrial, como se ha observado en investigaciones que muestran que las enfermedades de la disfunción mitocondrial a menudo tienen un componente neurodegenerativo.⁷

La mitocondria es un organelo presente en células eucariontes y cumple con funciones esenciales dentro de la misma.²⁶ Su principal función es la producción de energía en forma de ATP (Adenosin trifosfato) mediante la fosforilación oxidativa. La mayoría del ATP cerebral consumido es usado para la actividad eléctrica de las neuronas. Además de la producción de energía, las mitocondrias también juegan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis del calcio intracelular, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los mecanismos de muerte celular.⁵ Aún no es claro como estas diversas funciones se coordinan entre las

mitocondrias en una célula, pero probablemente depende de la naturaleza dinámica de la mitocondria.

La morfología mitocondrial es mucho más dinámica de lo que inicialmente se pensó. En muchos tipos de células las mitocondrias forman túbulos alargados que continuamente se dividen y fusionan para formar una red de interconexión dinámica.²⁶ La maquinaria molecular que regula los procesos de fisión y fusión es necesaria para entremezclar los lípidos y el contenido soluble de una población de mitocondrias. Además, las mitocondrias se reclutan activamente a los sitios subcelulares, tales como los procesos axonales y dendríticos de las neuronas.⁷

Reciente evidencia acentúa la importancia de las proteínas de fisión y fusión mitocondrial en la supervivencia celular y vías anti-apoptóticas. La perturbación en la fusión mitocondrial resulta en defectos en el potencial de membrana mitocondrial, en la respiración, pobre crecimiento celular y el incremento de la susceptibilidad a la muerte celular; esto contribuye, directa o indirectamente, en la etiopatogénesis de diversas enfermedades.

Anteriormente, la disfunción mitocondrial se asociaba con desórdenes como Charcot-Marie-Tooth 2A, una neuropatía periférica, y con la atrofia óptica dominante, una neuropatía óptica hereditaria; ambas son el resultado de una deficiencia primaria de la fusión mitocondrial.¹⁷ Por otra parte, varias enfermedades neurodegenerativas, tales como Parkinson, Alzheimer y la enfermedad de Huntington involucran la disrupción de la dinámica mitocondrial.⁷

Fisiológicamente, las funciones mitocondriales se deterioran con el paso del tiempo debido a la acumulación de alteraciones patogénicas en el DNAmít, el lento declive de la actividad de la cadena respiratoria y el desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y los

mecanismos antioxidantes. Mitocondrias senescentes presentan alteraciones morfológicas y funcionales similares a las observadas en enfermedades neurodegenerativas.

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una demencia degenerativa con deterioro de la memoria inicial que progresa a una pérdida de las facultades mentales y físicas³⁰. La evidencia sugiere que la falta de memoria en la enfermedad de Alzheimer es un resultado de la pérdida sináptica. Una gran cantidad de estudios se han centrado en el papel central del péptido **β -amiloide en la patogénesis y progresión de la EA. Oligómeros de β -amiloide** pueden unirse a las espinas dendríticas, causando la disfunción sináptica.

Estudios realizados en tejidos y células de pacientes con Alzheimer revelaron un desbalance fusión-fisión lo que resulta en un incremento en la fragmentación mitocondrial. En particular, se observaron niveles bajos de Mfn1, Mfn2 y OPA1 y niveles incrementados de Fis1 y Drp1. Notablemente, Fis1 y Drp1 muestran interacciones aberrantes con proteínas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer: **β -amiloide y tau fosforilada.**

Enfermedad de Parkinson

La pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra conduce a la enfermedad de Parkinson (EP), la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en los seres humanos. Los síntomas de la enfermedad de Parkinson pueden incluir:

- Temblor en las manos, los brazos, las piernas, la mandíbula y la cara
- Rigidez en los brazos, las piernas y el tronco
- Lentitud de los movimientos
- Problemas de equilibrio y coordinación

Se han identificado dos genes en la EP hereditaria: Pink1 y Parkin, en ambos casos se ha demostrado su importancia para mantener la integridad mitocondrial. Los **knockouts** para ambos genes presentan leves defectos en la respiración y sensibilidad al estrés oxidativo.⁸

En otro orden de ideas, el papel causal de la dinámica mitocondrial alterada en la EP parece ser una hipótesis robusta. En las formas juveniles familiares de la EP, debido a mutaciones recesivas en los genes relacionados con la mitofagia como Parkin y PINK1, varias líneas de evidencia apuntan hacia el deterioro directo de las vías de la fisión-fusión mitocondrial. El eje Parkin-PINK1 juega un papel regulador en el control de calidad mitocondrial, participando en la ubiquitinación y degradación de Mfn1 y Mfn2.²¹

Enfermedad de Huntington

Para el caso de Huntington, que es causada por la expansión anormal del triplete CAG en el exón 1 del gen de la huntingtina, resultando en la proteína conocida como mutante Htt. Aún no se sabe con exactitud como la mutante Htt ejerce sus efectos tóxicos, pero varios mecanismos se han postulado incluyendo la desregulación transcripcional, anormalidades en el metabolismo energético, agregación de proteínas y el daño oxidativo.

Varios de estos mecanismos sugieren la participación de una disfunción mitocondrial.

Epilepsia

En el caso de la epilepsia, hay muy poca información sobre las alteraciones en la dinámica mitocondrial, de ahí la importancia de este trabajo.

Estudios clínicos, genéticos y metabólicos han implicado a la mitocondria en el proceso de epileptogénesis. Las alteraciones en el transporte de electrones, la generación de especies reactivas del oxígeno, del metabolismo del calcio y la apoptosis se han descrito en el tejido nervioso humano y animal y reflejan los cambios en la fisiología mitocondrial.²³

Se sabe que las convulsiones sufridas durante la epilepsia desencadenan eventos de muerte celular. Estudios en animales y humanos han podido respaldar la idea de que la muerte celular por apoptosis juega un rol importante en el daño provocado por las crisis epilépticas. Chen et al. (2010) demostraron que el mantenimiento del metabolismo energético durante las crisis epilépticas se relaciona con la muerte celular apoptótica en células del hipocampo. La evidencia experimental sugiere que el citocromo c es liberado en el hipocampo dañado posteriormente a la convulsión donde activa a las caspasas 9 y 3 y subsecuentemente genera la fragmentación del ADN.¹² Todo esto sugiere que la vía intrínseca de la apoptosis puede contribuir a la neuropatología de la epilepsia humana, principalmente en el hipocampo.⁵

Además, existe evidencia que asocia la disfunción mitocondrial con la epilepsia y el *status epilepticus*. Chuang *et al.* (2004) nos muestran una depresión significativa de la actividad de los complejos I y III en el

hipocampo después de 180 minutos de SE producido por la administración de ácido kaínico. Estos cambios fueron acompañados por la hinchazón de espacios mitocondriales y cambios en la membrana mitocondrial.

Una mejor comprensión de los detalles moleculares subyacentes han comenzado a proporcionar enfoques racionales para el diseño de nuevas estrategias de tratamiento.²³

5.-Mecanismos de fusión mitocondrial.

Las mitocondrias cuentan con doble membrana. Por lo tanto, a diferencia del proceso de fisión que posiblemente se puede lograr mediante la escisión de la superficie externa de las mitocondrias, la finalización de la fusión mitocondrial se produce de forma secuencial: fusión de la membrana externa seguida por la de la membrana interna.³¹ En mamíferos, las principales proteínas implicadas en la fusión son Mfn1 y OPA1, ambas pertenecen a la familia de las GTPasas.²⁶

La fusión mitocondrial se inicia con la unión de dos mitocondrias opuestas mediadas por la proteína Mfn1 ³¹, la cual se encuentra localizada en la membrana mitocondrial externa (MME). La proteína Mfn1 tiene un dominio de GTPasa, cuya actividad es esencial para la fusión mitocondrial; además, presenta una región en el extremo carboxilo terminal que permite la unión entre mitocondrias a través de la unión con otra Mfn1 o con Mfn2, formando así complejos homo o heterotípicos.²⁶ Las células de mamíferos tienen dos isoformas: Mfn1 y Mfn2, siendo Mfn1 la principal involucrada en el proceso de fusión mitocondrial.¹⁸ Ambas isoformas comparten una estructura conservada que contiene el dominio GTPasa N-terminal, dos regiones heptarepetidas (HR1 y HR2), y dos dominios transmembrana cerca del extremo C-terminal (Figura 1A). HR1 y HR2 se

encuentran en lados opuestos de la región transmembranal que abarca la membrana externa dos veces, exponiendo los dominios GTPasa, HR1, HR2 y al citosol. Los estudios con Mfn1 mostraron que la región C-terminal HR2 interactúa con el HR2 de otra molécula Mfn en la mitocondria adyacente a través de una interacción antiparalela, que permite la inmovilización de las dos membranas (Figura 1B).³¹

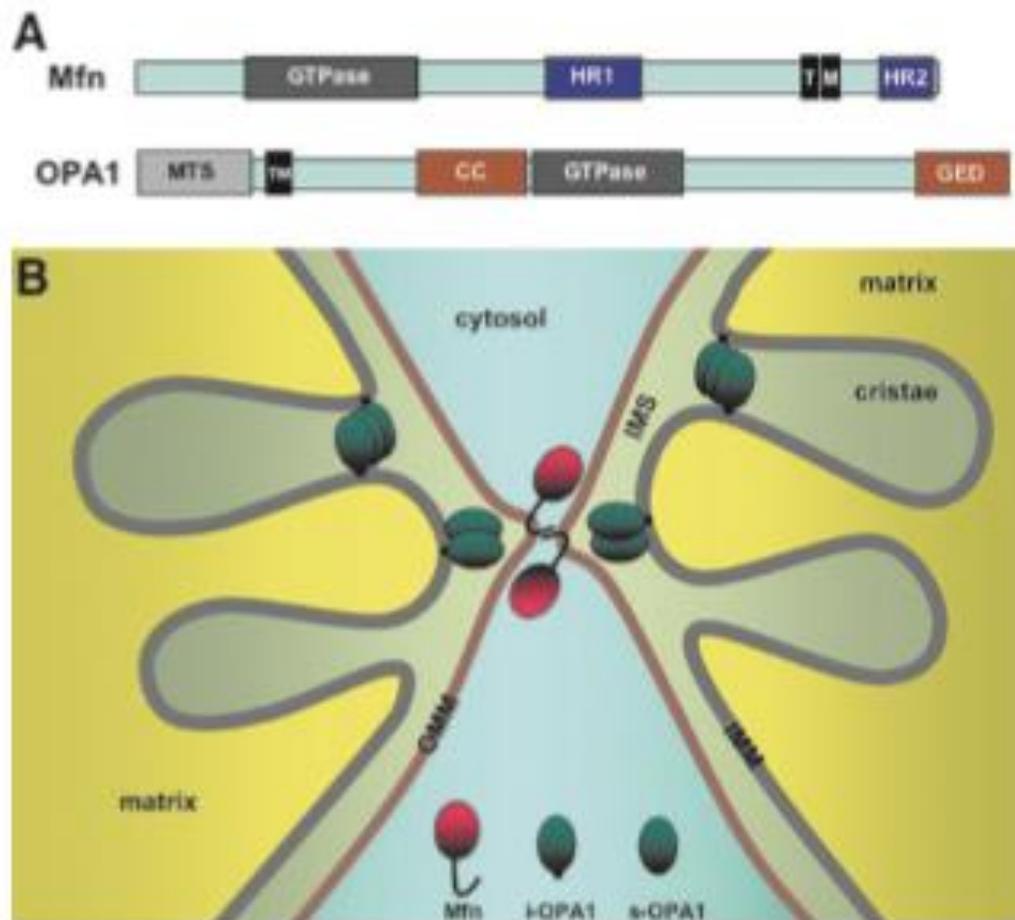


Figura 1. Esquema sobre fusión mitocondrial. (A) Estructura de las proteínas de fusión mitocondrial. (B) Representación gráfica del proceso de fusión.

Posteriormente, se lleva a cabo la fusión de la membrana mitocondrial interna (MMI) mediada por OPA1.³¹ OPA1 se encuentra en la MMI y es codificada por un solo gen con ocho variantes de transcrito resultantes de

splicing alternativo. Las diversas variantes de OPA1 son proteolizadas diferencialmente en formas largas y cortas, produciendo una serie de diferentes isoformas OPA1 en las mitocondrias.²⁶ Las formas largas están integradas en la membrana mitocondrial interna a través del dominio transmembrana N-terminal.³¹

Existen otras proteínas implicadas, como la fosfolipasa D mitocondrial (mitoPLD) dependiente de la hidrólisis de cardiolipina.²¹ MitoPLD es una enzima dimérica unida a la MME a través de un anclaje transmembrana C-terminal con un dominio catalítico N-terminal orientado hacia el citosol. Basado en la topología de mitoPLD, el dominio catalítico puede insertarse en la MME adyacente y modificar los lípidos de las membranas unidas por Mfn1. Se cree que puede funcionar para inducir la curvatura de la membrana o reclutar otras proteínas a la mitocondria a través de modificar el entorno de lípidos de membrana.²⁶

En el caso de la epilepsia, no se tiene información respecto a lo que sucede con la dinámica de fusión mitocondrial, ya sea durante la epileptogénesis o en las fases de desarrollo temprano. Es por esto que este proyecto se enfoca en el estudio de la fusión mitocondrial. Para esto, se analizaron las dos principales proteínas involucradas: Mfn1 y OPA1.

JUSTIFICACIÓN

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico que afecta a personas de todas las edades. Afecta alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo. En México, la prevalencia de pacientes con epilepsia es de 10 a 20 por cada 1000, lo cual sugiere que en nuestro país existen por lo menos un millón de personas con alguna forma de epilepsia. Se sabe que existe un gran porcentaje de pacientes farmacorresistentes, para quienes existen más dudas que certezas respecto a la efectividad del tratamiento. Si bien la epilepsia es de origen multifactorial, los mecanismos neurales que la originan aún no se conocen con detalle, y todavía hay varios aspectos por estudiar y descubrir respecto a su fisiopatología.

Estudios recientes han dejado ver que la mitocondria desempeña un papel importante en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas ya que diversas formas de daño convergen en la homeostasis mitocondrial. En lo que a epilepsia respecta, la información hasta el momento es reducida. Es importante comprender los mecanismos que acompañan al desarrollo de esta enfermedad para poder buscar terapias más efectivas.

OBJETIVO GENERAL

Analizar cambios en la expresión de las proteínas de fusión mitocondrial mitofusina (Mfn1) y OPA1 en región hipocampal posterior a la inducción del *status epilepticus* inducido con litio-pilocarpina en un modelo murino a tiempos cortos y largos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.-Inducir el *status epilepticus* en la mitad de las ratas macho 200-250 gramos formando dos grupos: control y *status epilepticus*, las cuales se sacrificarán a diferentes tiempos.

2.-Realizar la disección de hipocampos de las ratas de cada grupo y posterior fraccionamiento celular para obtener la fracción mitocondrial.

3.-Analizar cambios en la expresión de las proteínas que codifican para Mfn1 y OPA1 utilizando las técnicas de electroforesis y Western Blot.

4.-Analizar cambios en la expresión de los genes que codifican para Mfn1 y OPA1 a través de qRT-PCR en tiempo real.

HIPÓTESIS

El daño neural debido al *status epilepticus* ocasionará un desbalance en los procesos de fusión mitocondrial de células hipocampales, el cual se verá reflejado en cambios en los niveles de expresión de Mfn1 y OPA1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción del estado epiléptico.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (200-250 gramos), las cuales fueron distribuidas de manera aleatoria en dos grupos: control y pilocarpina con n=6 en cada grupo. Ambos grupos fueron administrados con cloruro de litio (127 mg/kg, i.p.) y posteriormente (20 a 24 horas más tarde) con escopolamina (1 mg/kg, s.c.). Transcurridos 30 minutos, se administró pilocarpina (30 mg/kg, s.c.) al grupo de estudio (pilocarpina) mientras que el grupo control fue inyectado con el vehículo (solución salina isotónica).

Los animales que presentaron el estado epiléptico recibieron diazepam (5 mg/kg, i.m.) una hora después del comienzo del status. Posteriormente, se colocaron en un baño de hielo por un periodo de una hora. Por último, fueron trasladadas a una habitación con temperatura constante de 18 °C donde se mantuvieron por dos días y se alimentaron con suplemento alimenticio. Los tiempos largos se mantuvieron en bioterio con alimentación y agua *ad libitum*.

Diseción del hipocampo y separación de las fracciones.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación a las 3 h, 24 h, 72 h, 1 semana, 2 semanas y 4 semanas posteriores a la inducción del estado epiléptico. Se extrajeron ambos hipocampos los cuales fueron colocados en 500 µL de amortiguador de sacarosa (0.25 M) y homogeneizados para después llevar a un volumen de 1.5 mL con la misma solución amortiguadora. Dicho homogeneizado fue centrifugado por 15 minutos a

2000 g, se tomaron 200 μ L y se etiquetó como fracción TOTAL, el resto del sobrenadante se transfirió a un tubo *eppendorf* de 2 mL para centrifugarse ahora a 15,000 g por 20 minutos; el sobrenadante se etiquetó como fracción CITOSÓLICA. El sedimento se resuspendió en 500 μ L de amortiguador de sacarosa + albúmina al 0.1% m/v y se centrifugó nuevamente a 15,000 g por 20 minutos; se desechó el sobrenadante y el sedimento se re-suspendió en amortiguador con inhibidores de proteasas para formar la fracción MITOCONDRIAL. Cada una de las fracciones fue conservada a -70 °C para su posterior cuantificación.

Cuantificación de proteínas

Se cuantificó la cantidad de proteína en cada fracción mediante el método de Bradford. Se utilizó el kit perteneciente a Bio Rad y se siguieron las instrucciones incluidas.

Western blot

Las fracciones obtenidas con anterioridad fueron separadas mediante geles de SDS poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, posteriormente se hizo una transferencia a membranas de nitrocelulosa por 2 horas a 20 V. Se corroboró la transferencia colocando rojo de Ponceau en la membrana y se observó la presencia de bandas correspondientes a diversas proteínas. Hecho esto, se bloquearon las membranas con una solución de leche descremada al 5% m/v durante dos horas con agitación constante. Posteriormente se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-Mfn1 (Santa Cruz *Biotechnology*) dilución 1:500, anti-OPA1 (*Abcam*) dilución 1:1000 o anti-VDAC (*Cell signaling*) 1:2000 en agitación constante a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se lavaron con TBS-Tween

(tres veces durante 5 minutos) y se incubaron con su anticuerpo secundario correspondiente durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente, se realizaron lavados con solución TBS-Tween, uno de 15 minutos seguido de dos de 5 minutos. Las bandas fueron reveladas mediante un kit de quimioluminiscencia (*Millipore*). El experimento fue repetido hasta obtener los resultados de seis ratas diferentes.

Extracción de RNA

Se colocó el tejido en 500 μ L de TRIzol (*Sigma-Aldrich*), se homogenizó mediante un agitador eléctrico OMNI y se llevó a un volumen de 1 mL utilizando TRIzol nuevamente. Después se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo se añadieron 0.2 mL de cloroformo y se agitaron durante 15 segundos. Se procedió a una segunda incubación a temperatura ambiente por 3 minutos. A continuación se centrifugaron por 15 minutos a 10,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 mL y lavado con 500 μ l de alcohol isopropílico. A continuación se agitó vigorosamente e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 1mL de etanol al 75% v/v. Se centrifugó nuevamente ahora a 6,000 rpm por 5 minutos a 4 °C, se dejó secar a temperatura ambiente y re-suspendió utilizando la menor cantidad posible de agua tratada con RNAsas.

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2% m/v para verificar la integridad de la muestra y la presencia o ausencia de DNA genómico.

Tratamiento con DNAsa.

Partiendo de la muestra obtenida en la extracción de RNA se agregó amortiguador de Reacción del kit de *Ambion* en la siguiente proporción: 1 μ L de amortiguador por cada 10 μ L de muestra además de 1 μ L de rDNAsa y se agitó. En seguida se incubó por 30 minutos a 37 °C. Se agregó la enzima inactivadora de rDNAsa en la misma proporción que el amortiguador de reacción, se agitó e incubó 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a 10,000 g por 2 minutos. El sobrenadante se trasladó a un tubo eppendorf de 500 μ L.

Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación se realizó utilizando el espectrofotómetro (*Biotek*). Se realizaron dos lecturas a una longitud de onda de 260 y 280 para determinar la cantidad y pureza de la muestra.

Síntesis de cDNA

Una vez cuantificada la cantidad de RNA presente, se realizaron los cálculos necesarios para tener aproximadamente 5 μ g de RNA total. La síntesis de cDNA se realizó con base en las indicaciones del kit y protocolo de Thermo scientific. La reacción de síntesis se realizó en el termociclador *Techne* TC-512.

qRT-PCR

Se realizó la estandarización del método determinando T_m y cantidad de RNA.

Las veces de expresión se determinaron mediante el método ΔC_p usando como control endógeno el gen de actina. Se realizó utilizando el kit de PCR *SYBR Green de Thermo* según las instrucciones del mismo. Los oligos utilizados, de *Sigma-Aldrich*, se observan en la siguiente tabla.

| Oligo | Secuencia | T _m (de acuerdo a proveedor) |
|------------|---------------------------|--|
| FR1 Mfn1 | 5´-GAGAAGAGGGTTTATTCAATGG | 60.4 °C |
| RR1 Mfn1 | 5´-TCATCAACCAAAACAGACAG | 58.7 °C |
| FR1 OPA1 | 5´-AGGATGACAAAGGCATCCAC | 63.9 °C |
| RR1 OPA1 | 5´-CTCGTGGGAATATTCGTGCT | 63.9 °C |
| FR1 Actina | 5´-AAGACCTCTATGCCAACAC | 56.6 °C |
| RR1 Actina | 5´-TGATCTTCATGGTGCTAGG | 58.8 °C |

Tabla 1. Oligos utilizados para qRT-PCR

Recolección y análisis de datos

Las bandas obtenidas fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. Las lecturas obtenidas para Mfn1 y OPA1 fueron normalizadas con los valores correspondientes de VDAC. Se realizó la prueba de ANOVA a una vía seguida de una prueba post hoc: Tukey. Para el RNA, el equipo realiza los cálculos automáticamente.

RESULTADOS

Estandarización del fraccionamiento celular.

Para demostrar que se obtuvo la fracción mitocondrial de ambos hipocampos, se realizó un gel de poliacrilamida y se utilizó como marcador la proteína mitocondrial VDAC (por sus siglas en inglés, canal aniónico dependiente de voltaje). Tal como se observa en la Figura 2, no se detecta la presencia de VDAC en la fracción citosólica. Este resultado nos indica que la obtención de la fracción mitocondrial se realizó correctamente ya que la proteína VDAC se encuentra exclusivamente en la membrana externa de la mitocondria y no en el citoplasma.

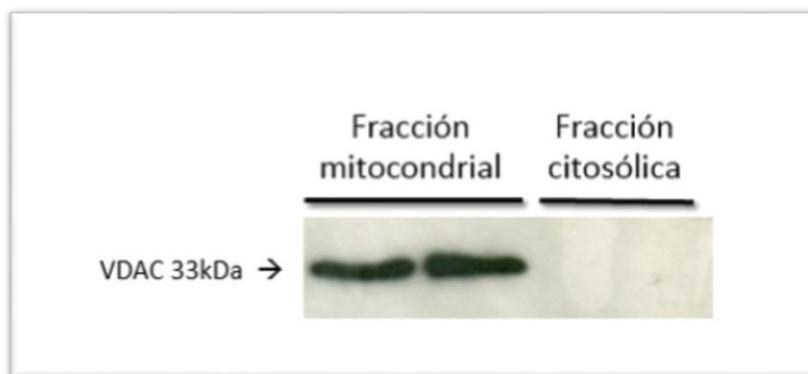


Figura 2. Estandarización del fraccionamiento celular.

Extracción y análisis de proteínas.

Una vez estandarizadas las condiciones, se llevó a cabo el modelo de litio-pilocarpina para inducir el *status epilepticus* en grupos de seis ratas con sus respectivos controles; se obtuvieron ambos hipocampos y se realizó el fraccionamiento celular para obtener la fracción mitocondrial. Esto se hizo a los distintos tiempos establecidos: 3, 24 y 72 horas, una, dos y

cuatro semanas posteriores al ***status epilepticus*** con sus respectivos controles.

Después se realizó la inmunodetección de las proteínas mitocondriales OPA1 y Mfn1, las cuales son las principales proteínas involucradas en la fusión mitocondrial. Cada una cumple una función específica: Mfn1 fusiona la membrana externa y OPA1 la interna. Posterior a la inmunodetección, se obtuvieron los datos de la densidad óptica utilizando el programa ***ImageJ*** y se calculó la relación proteína OPA1 o Mfn1 / control de carga VDAC. Los resultados obtenidos se graficaron como promedio y error estándar y se reportan en la figura 3.

En los gráficos (figura 3A y 3B) se observa un incremento significativo en la cantidad de ambas proteínas Mfn1 y OPA1 a las 72h posteriores al inicio del ***status epilepticus***. Además, en el caso de Mfn1 (figura 3B) se observa que el incremento en su contenido en la fracción mitocondrial se mantiene hasta una semana después del inicio del ***status epilepticus***. El incremento en el contenido de Mfn1 y OPA1 observado en la fracción mitocondrial sugiere que debido al daño producido en el ***status epilepticus*** se incrementa la fusión mitocondrial.

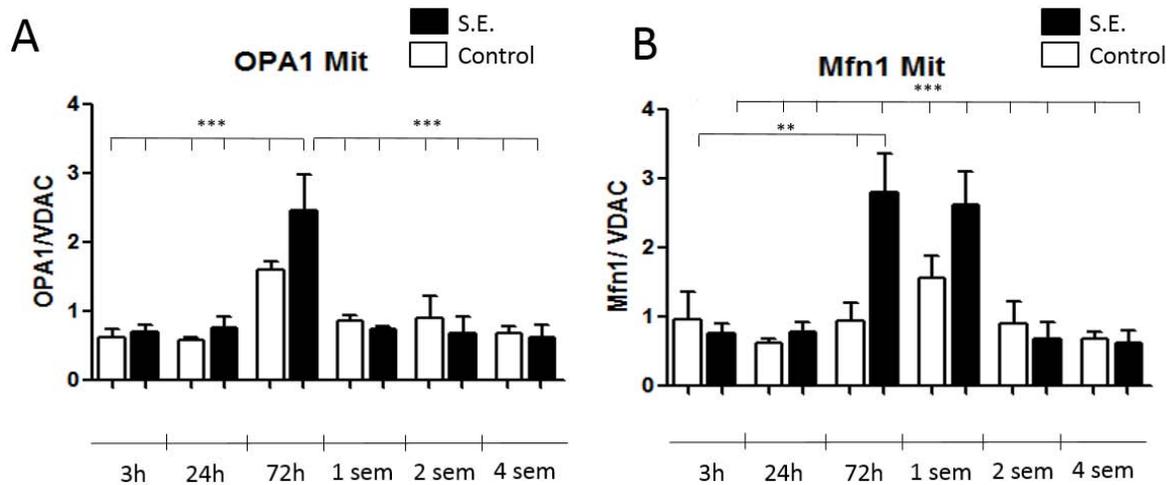


Figura 3. Efecto del *status epilepticus* en el contenido de Mfn1 y OPA1 en fracción mitocondrial. Se graficó la densidad óptica relativa a los diferentes tiempos. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc Tukey, n=6 en cada grupo **P<0.01, *** P<0.001.

qRT-PCR

Al observar cambios en el contenido de las proteínas mitocondriales a los tiempos de 72h, nos preguntamos si el cambio ocurre debido a la sobre expresión de los genes que codifican para las proteínas OPA1 y Mfn1. Para contestar esa pregunta, se realizó el análisis de la expresión del RNA mensajero de ambas proteínas.

Para comenzar, se realizaron las curvas de eficiencia de amplificación de los mRNA que codifican para Mfn1 y OPA1 y actina como gen constitutivo, hasta llegar a una eficiencia entre el 90 y 110%. En las figuras 4, 5 y 6 se muestran las gráficas obtenidas.

Standard Curve

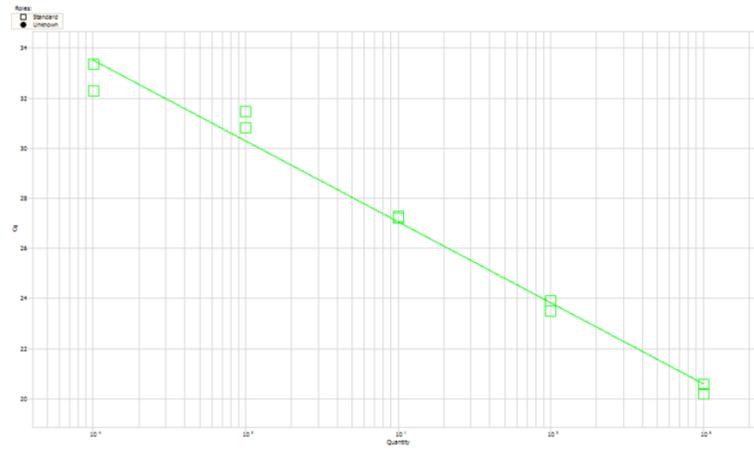


Figura 4. Curva de eficiencia para Mfn1 .

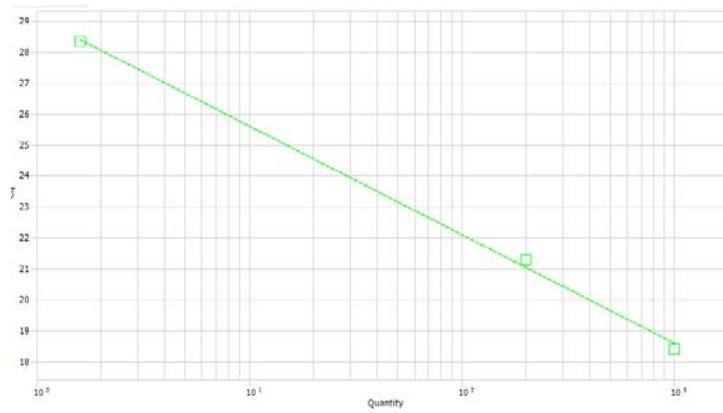


Figura 5. Curva de eficiencia para OPA1 .

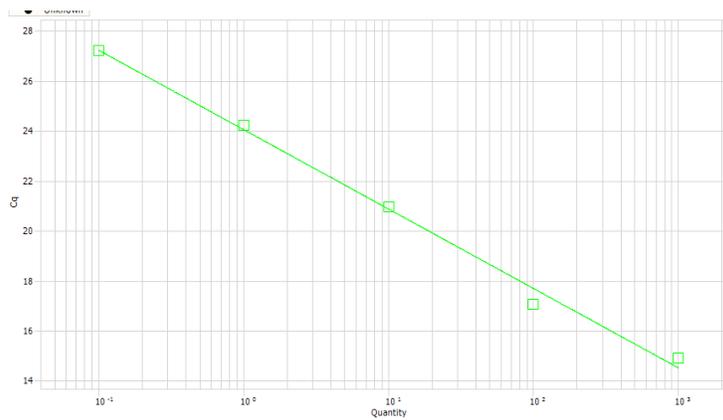


Figura 6. Curva de eficiencia para actina.

De este modo, se establecieron las condiciones necesarias para lograr que la reacción cumpla con la eficiencia óptima y evitar la interpretación de cambios falsos en la expresión del mRNA.

| Curva | Eficiencia | R ² | Tm |
|--------|------------|----------------|------|
| Actina | 106.25% | 0.994 | 57 ° |
| Mfn1 | 103.94% | 0.983 | 60 ° |
| OPA1 | 93.02% | 0.998 | 60 ° |

Tabla 2. Resultados de las curvas de eficiencia de las reacciones para amplificar el mRNA de Actina, Mfn1 y OPA1. Dichas condiciones son las óptimas para las reacciones de PCR en tiempo real.

Una vez estandarizadas las condiciones óptimas, se realizó un qRT-PCR y posteriormente se analizaron los datos utilizando el programa REST® de QIAGEN. Los resultados se muestran en las tablas 3 y 4 y sus gráficas correspondientes (figuras 7 y 8).

| Gene | Type | Reaction Efficiency | Expression | Std. Error | 95% C.I. | P(H1) | Result |
|----------|------|---------------------|------------|----------------|-----------------|--------|--------|
| Actina | REF | 1.0 | 1.381 | 1.015 2.017 | -0.918 2.216 | -0.065 | |
| Mfn1 3H | TRG | 1.0 | 0.544 | 0.368 0.748 | -0.329 1.241 | -0.030 | |
| Mfn1 24H | TRG | 1.0 | 0.637 | 0.473 0.932 | -0.416 1.109 | -0.060 | |
| Mfn1 72H | TRG | 1.0 | 0.703 | 0.486 1.001 | -0.381 1.320 | -0.166 | |

Tabla 3. Análisis de la expresión de mRNA de Mfn1 a las 3, 24 y 72 horas posteriores a la inducción del *status epilepticus*. Los niveles de expresión fueron normalizados con el mRNA de actina.

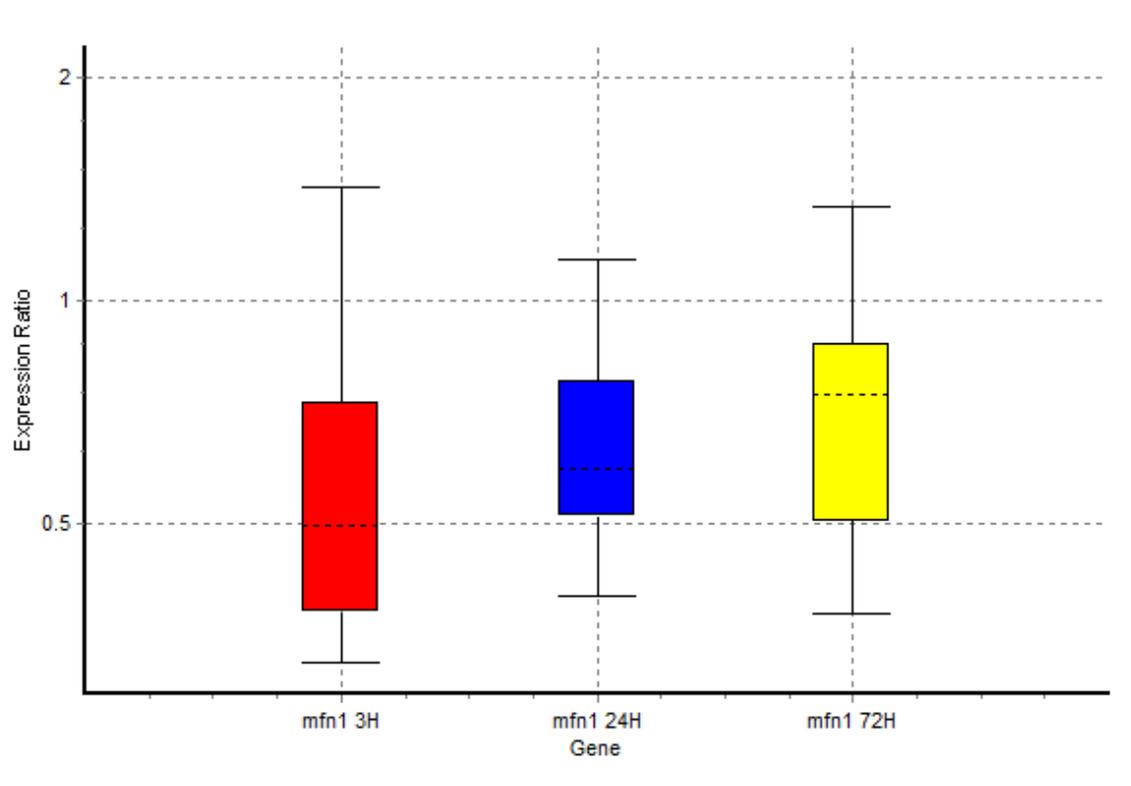


Figura 7. Gráfica representativa de los niveles de expresión del mRNA de Mfn1 a 3, 24 y 72 horas posteriores al *status epilepticus*.

Como se observa en la figura 7, 3h, 24 y 72 horas posteriores al *status epilepticus* no se observan cambios significativos en la expresión de Mfn1.

| Gene | Type | Reaction Efficiency | Expression | Std. Error | 95% C.I. | P(H1) | Result |
|-----------|------|---------------------|------------|---------------|---------------|-------|--------|
| Actina | REF | 1.0 | 1.381 | 1.015 - 2.017 | 0.918 - 2.216 | 0.065 | |
| OPA1 3H | TRG | 0.9 | 1.014 | 0.665 - 1.636 | 0.598 - 2.150 | 0.929 | |
| OPA1 24 H | TRG | 0.9 | 0.974 | 0.721 - 1.319 | 0.605 - 1.634 | 0.897 | |
| OPA1 72 H | TRG | 0.9 | 0.972 | 0.716 - 1.242 | 0.636 - 1.600 | 0.853 | |

Tabla 4. Análisis de la expresión de mRNA de OPA1 a las 3, 24 y 72 horas posteriores a la inducción del *status epilepticus*. Los niveles de expresión fueron normalizados con el mRNA de actina.

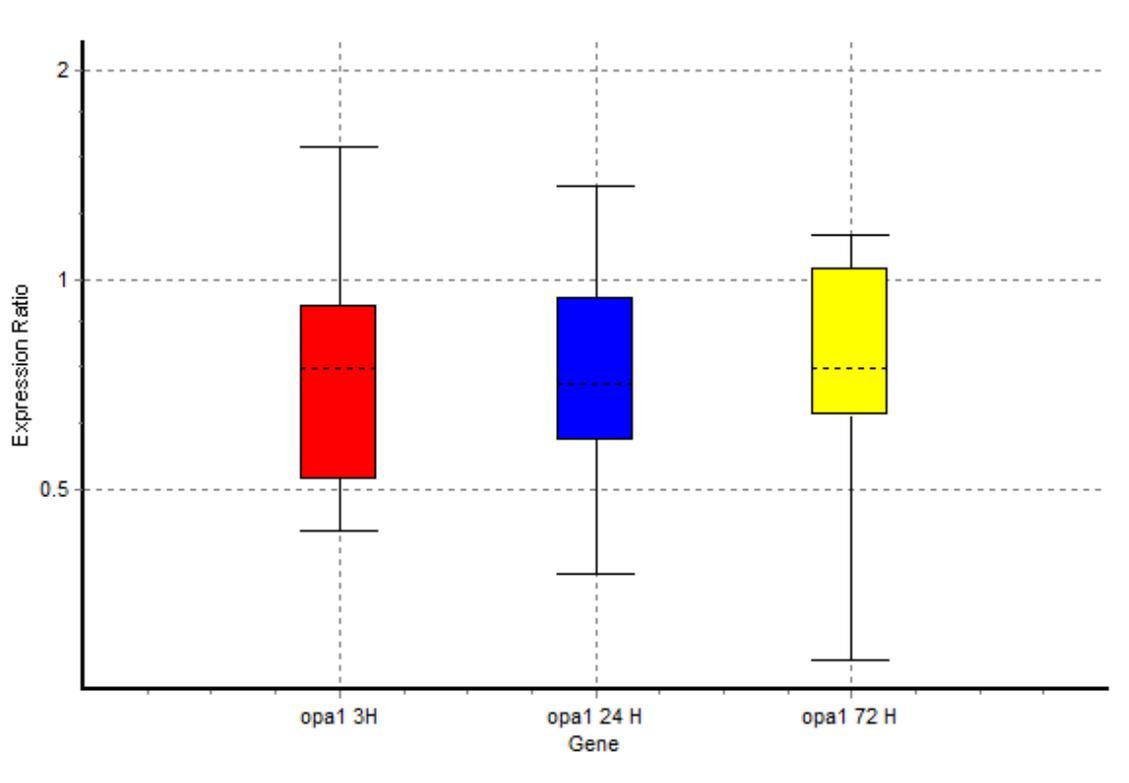


Figura 8. Gráfica representativa de los niveles de expresión del mRNA de OPA1 a 3, 24 y 72 horas posteriores al *status epilepticus*.

En la figura 8 no se observan cambios significativos en la expresión del mRNA de OPA1 en ninguno de los tiempos analizados.

Los resultados del análisis de la expresión del mRNA de Mfn1 y OPA1 a las 3, 24 y 72 horas posteriores al *status epilepticus* demuestran que no hay cambios en la expresión del mRNA.

DISCUSIÓN

A la fecha, poco se sabe acerca de la dinámica mitocondrial y el balance fusión-fisión en tejido cerebral, tanto en condiciones fisiológicas normales como en un mecanismo patológico de crisis convulsivas. El modelo de daño agudo por Litio-Pilocarpina sirvió para estudiar la expresión y el contenido de las proteínas Mfn1 y OPA1 relacionadas con la fusión mitocondrial.

Como respuesta al *status epilepticus* generado, se observó un aumento significativo en la cantidad de la proteína Mfn1 y OPA1 a las 72 horas en comparación con el grupo control. Además, en el caso de Mfn1 dicho incremento se mantiene hasta 1 semana. Esto sugiere que la fusión predomina sobre la fisión, como un mecanismo de respuesta al daño inducido. El deterioro mitocondrial generado durante el *status epilepticus* dispara señales que activan la fusión, para que en conjunto, varias mitocondrias funcionen como una misma unidad y se puedan subsanar posibles daños, incluyendo alteraciones del DNA mitocondrial (DNAMit)⁴.

En lo que respecta a los resultados del qRT-PCR no se observó un cambio significativo en la expresión del mRNA que codifica para las proteínas Mfn1 y OPA1. Esto nos indica que la cantidad de proteína no está directamente relacionada con la cantidad de transcrito. Duvezin-Caubet et al., (2006) sugieren que es necesaria la presencia de las isoformas largas de OPA1 para que la fusión mitocondrial ocurra, se ha visto que durante la fusión las isoformas cortas prácticamente desaparecen para polimerizarse y dar paso a las isoformas largas. Del mismo modo, Duvezin-Caubet et al., (2006) demostraron mediante el uso de un modelo *in vitro*, que la polimerización de OPA1 es independiente de la síntesis de proteínas, ya que al inhibir la síntesis de éstas mediante el uso de cicloheximida, se

sigue haciendo presente el aumento en la cantidad de OPA1 después de un daño celular.

Así mismo, las mitofusinas se regulan mediante otros mecanismos. Las mitofusinas son degradadas por la proteína PINK1 y la ubiquitinación mediada por Parkin mediante mitofagia. Después de la ubiquitinación, estas proteínas se extraen por la proteína p97 AAA y luego degradados por el proteosoma²⁸. Teniendo en cuenta esta información, sería importante continuar este trabajo analizando la cantidad de proteína presente en la fracción citosólica para esclarecer lo que sucede con Mfn1 posterior a la inducción del *status epilepticus*.

Los resultados de PCR de las proteínas Mfn1 y OPA1 presentados en este trabajo solo reflejan lo que ocurre a las 3, 24 y 72 horas posteriores al SE, obtener la información de los niveles de expresión 1, 2 y 4 semanas después del daño permitirá analizar el fenómeno en un lapso mayor de tiempo después de la inducción del *status epilepticus*.

La actividad de ambas mitofusinas es importante para llevar a cabo la fusión por lo que se hace necesario estudiar ambas isoformas para puntualizar la participación de cada una de ellas en el mecanismo de fusión.

Se sabe que en mamíferos, la morfología y función de la mitocondria depende en gran medida de los mecanismos de fusión y fisión que ocurren en ésta; estos mismos mecanismos también participan de forma importante en la fisiología de diferentes tejidos con una alta demanda de energía, como es el cerebro o células cardiacas⁶. Dentro del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, las especies reactivas de oxígeno que se producen son la causa de la peroxidación de proteínas celulares, lípidos

de membrana y el DNA nuclear, lo que conduce a la pérdida de la estructura y función mitocondrial⁴. Además se deteriora la fosforilación oxidativa mitocondrial, resultando en la generación excesiva de radicales libres y un sistema antioxidante deficiente, iniciando así un círculo vicioso²⁰.

En la epilepsia la disfunción mitocondrial altera la homeostasis del Ca^{2+} intracelular que conlleva a la despolarización de la membrana mitocondrial interna generando una severa pérdida neuronal. Tanto la generación excesiva de radicales libres como un sistema antioxidante deficiente se asocian con un aumento del riesgo de recurrencia de las crisis⁴.

OPA1 y Mfn1 se han estudiado en diferentes modelos y estirpes celulares. Por ejemplo, en un modelo murino de daño en medula espinal donde se aplica una fuerza de 50 gramos por cinco minutos sobre la vértebra T12 se observa un aumento significativo en las proteínas de fusión Mfn1 y Mfn2 a las 3 y 6 horas posteriores al daño, mientras que a las 12 y 24 horas dichas proteínas disminuyen³.

En un modelo celular de Alzheimer se analizaron los cambios en el contenido de proteínas de fusión y fisión mitocondrial (Wang et al., 2009). En dicho trabajo, se observó que las células que sobreexpresan el **precursor de la proteína β -amiloide** presentan un aumento en las proteínas de fusión mitocondrial alrededor de 48 hrs posteriores a la **transfección, esto, como respuesta al daño producido por el β -amiloide**³⁰.

Otro trabajo donde se intenta develar su participación durante el desarrollo del corazón en ratas recién nacidas nos muestra que durante esta etapa la cantidad de Mfn1 y Mfn2 esta considerablemente aumentada en comparación con las condiciones normales.¹⁹

Estos datos nos permiten explicar lo que ocurre puntualmente después de una crisis aguda, es necesario la generación de modelos crónicos de convulsiones recurrentes y espontaneas que nos permitan representar con mayor aproximación a los fenómenos mitocondriales que ocurren en pacientes con epilepsia.

CONCLUSIONES

1. Las proteínas de fusión Mfn1 y OPA1 están aumentadas en la fracción mitocondrial a los tres días posteriores al *status epilepticus*.
2. Los niveles de expresión para el transcrito de Mfn1 y OPA1 no presentan cambios significativos en los tiempos analizados.

PERSPECTIVAS

- Observar la morfología de las mitocondrias mediante microscopía electrónica a los diferentes tiempos empleados en el proyecto.
- Analizar la cantidad de transcrito para los tiempos largos: una, dos y cuatro semanas.
- Analizar la cantidad de Mfn1 en la fracción citosólica.

APÉNDICE

Soluciones

- Gel separador al 10%, dos geles de 1mm c/u

| | |
|-------------|-------------|
| Agua | 4.25 mL |
| Acrilamida | 5 mL |
| Tris pH 8.8 | 3.25 mL |
| SDS 10% m/v | 125 μ L |
| TEMED | 15 μ L |
| APS | 125 μ L |

- Gel concentrador, dos geles de 1mm c/u

| | |
|-------------|------------|
| | 10% |
| Agua | 1.36 mL |
| Acrilamida | 0.34 mL |
| Tris pH 6.8 | 0.26 mL |
| SDS 10% m/v | 20 μ L |
| TEMED | 2 μ L |
| APS | 20 μ L |

➤ Amortiguador de *stripping*

| | |
|-------------|-------|
| Glicina | 15 g |
| SDS | 1 g |
| Tween 20 | 10 mL |
| Agua c.b.p. | 1 L |
| pH | 2.2 |

➤ Amortiguador de corrida 10x

| | |
|-------------|-------|
| Tris base | 29 g |
| Glicina | 144 g |
| Tween 20 | 10 mL |
| Agua c.b.p. | 1 L |
| pH | 8.3 |

➤ Amortiguador de lisis

| | |
|--------------|---------|
| Tris-HCl | 20 mM |
| EDTA | 2 mM |
| NaCl | 20 mM |
| Tritón x-100 | 1% v/v |
| Glicerol | 10% v/v |
| pH | 7.5 |

➤ PBS-A

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 10 g |
| KCl | 0.25 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.41 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.25 g |
| Agua c.b.p. | 1 L |
| pH | 7.5 |

➤ Amortiguador de sacarosa

| | |
|-------------|----------|
| Sacarosa | 42.78 g |
| Tris-HCl | 1.182 g |
| KCl | 596 mg |
| NaCl | 438 mg |
| EDTA | 731.1 mg |
| EGTA | 190.2 mg |
| DTT | 77.1 mg |
| Agua c.b.p. | 500 mL |

➤ TBS-T 0.05% 10x

| | |
|-------------|--------|
| Tris base | 60.5 g |
| NaCl | 87.6 g |
| Tween 20 | 5 mL |
| Agua c.b.p. | 1 L |
| pH | 7.5 |

➤ Amortiguador para lavado final 10x

| | |
|-------------|---------|
| Tris base | 60.55 g |
| NaCl | 292.2 g |
| Agua c.b.p. | 1 L |
| pH | 7.5 |

REFERENCIAS

1. Acevedo, C. 2007. Epilepsias: *Todo lo que usted desea saber*. Editorial Bureau International. 2ª edición. Santiago de Chile. 52 (6): 1052–1057.
2. Beck, Heinz and Elger, Christian E, 2008. *Epilepsy research: a window onto function and dysfunction of the human brain*. Dialogues in Clinical Neuroscience. 10(1).
3. Cao Yang, Lu G., Wang Y., Fan Z., Bi Y., Zhao L., Guo Z. 2013. *Mitochondrial fusión and fission after spinal sacord injury in rats*. Brain research no. 1522, may, p 59-66
4. Chang, Sue-Joan & Yu, Bu-Chin. 2010 *Mitochondrial matters of the brain: mitochondrial dysfunction and oxidative status in epilepsy*. J Bioenerg Biomembr. 42(6): 457-9.
5. Chaturvedi, Rajnish K. and Beal, M. Flint. 2013. *Mitochondrial Diseases of the Brain*. Free Radical Biology and Medicine 63, 1–29.
6. Chen, Hsiuchen and Chan, David C. 2005. *Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission*. Human Molecular Genetics. 14(2).
7. Chen, Hsiuchen and Chan, David C. 2009. *Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases*. Human Molecular Genetics. 18 (2).

8. Chen, Shang-Der; Chang, Alice YW y Chuang, Yao-Chung. 2010. *The potential role of mitochondrial dysfunction in seizure-associated cell death in the hippocampus and epileptogenesis*. 2010. J Bioenerg Biomembrane.42: 461–465
9. Chuang, Y.. 2010. *Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Seizure-Induced Neuronal Cell Death*. Acta Neurol Taiwan; 19: 3-15.
10. Duvezin-Caubet, S. Jagasia R., Wagener J., Hofmann S., Trifunovic A., Hansson A., Chomyn A., Bauer M.F., Attardi G., Larsson N.G., Neupert W., Reichert A.S.2006. *Proteolytic Processing of OPA1 Links Mitochondrial Dysfunction to Alterations in Mitochondrial Morphology*. J. Biol. Chem281:37972-37979.
11. La Enciclopedia Médica A.D.A.M.2014. Epilepsy-overview. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0001714/>
12. Fischer, R., 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 Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*.Epilepsia 46:470–472.
13. García García, M.E. *Modelos experimentales en epilepsia*. 2010. Neurología. 2010; 25(3): 181-188.
14. Gil-Nagel R. y García Morales. 2007.*Etiopatogenia y fisiopatología de la epilepsia*.. Medicine;9(75): 4806-4813

15. Kandrataviciu, L., Balista P.A., Lopes-Aguiar C., Ruggiero R.N., Umeoka E.H., Garcia-Cairasco N., Bueno-Junior L.S., Leite J.P. 2014. *Animal models of epilepsy: use and limitations*. Neuropsychiatric Disease and Treatment. 10.
16. Kroemer, G. Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G.; . *Classification of cell death*. 2009. Cell Death Differ, 16(1): 3–11.
17. López-Meraz M.L., Rocha L., Miquel M., Hernández Aguilar M. E., Toledo Cárdenas R., Coria Ávila G., García Hernández L. I.. 2009. *Conceptos básicos de la epilepsia* .Rev Med UV. Julio – Diciembre.
18. Medina C. *Epilepsia, aspectos clínicos y psicosociales*. 2004. Editorial medica panamericana.
19. Papanicolaou, K.N., Kikuchi R, Ngoh-Gladys A., Coughlan-Kimberly A., Dominguez-Isabel , Stanley-William C and Walsh-Kenneth 2012. *Mitofusins 1 and 2 are Essential for Postnatal Metabolic Remodeling in Heart*. Circ Res. 2012 September 28; 111(8): 1012–1026
20. Peternel,S., Pilipović,K. and Župan, G. 2009. *Seizure susceptibility and the brain regional sensitivity to oxidative stress in male and female rats in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe*

epilepsy. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 33 456–462.

21. Ranieri, M. 2013. ***Mitochondrial Fusion Proteins and Human Diseases***. Neurology Research International. 293893: 11.
22. Rubio Donnadieu, F. 2007. ***Epilepsia***. Programa prioritario de la epilepsia, sector salud.
23. Sack Jr., George H. 2010. ***Introduction to the mini-review series on mitochondrial matters in epilepsy***. J Bioenerg Biomembr 42:441–442.
24. Scorza, F.A., Arida R.M., Naffah-Mazzacoratti M. G., Scerni D.A., Calderazzo L., Cavalheiro E.A.. . 2009. ***The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned?*** Annals of the Brazilian Academy of Sciences. 81(3): 345-365.
25. Shorvon, Simon D. ***The etiologic classification of epilepsy***. 2011. Epilepsia. 52(6), 1052–1057.
26. Suen D.F., Norris K.L., Youle R.J. 2008. ***Mitochondrial dynamics and apoptosis***. Genes & development 22:1577–1590.
27. Trejo M., Barajas G., Ramírez E., Barbosa O., Sánchez S. ***Anatomía de la epilepsia y fármacos utilizados en su tratamiento***. 2005. Archivos de medicina. 1 (002).

28. Van der Blik, A.M.; Shen, Q. and Kawajiri, S. 2013. ***Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion***. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5:a011072.
29. Wang X., Su B., Siedlak S.L., Moreira P.I., Fujioka H., Wang Y., Casadesus G., Zhu X. 2008. ***Amyloid- β overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins***. PNAS, december vol.105 no. 49.
30. Wang X., Su B., Lee H.G., Li X., Perry G., Smith M.A., Zhu X. 2009. ***Impaired Balance of Mitochondria Fission and Fusion in Alzheimer Disease***. J Neurosci. July 15; 29(28): 9090–9103.
31. Yoon Y., Galloway C.A., Jhun B.S., Yu T. 2011. ***Mitochondrial Dynamics in Diabetes. Antioxidants & redox signaling***.14 (3): 439-457.