



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN ALIMENTARIA EN LA EXPRESIÓN
GÉNICA DE REST/NRSF Y COREST EN UN MODELO DE CRISIS
AGUDAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA,

P R E S E N T A :

EDIT MICHELLE DELGADO GALÁN

DIRECTORA DE TESIS
Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

Los Reyes Iztacala, Edo de México, 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología sensorial I y II (Laboratorio 412-414) de la Facultad de Medicina, UNAM. El cual fue financiado con el proyecto de CONACYT 239594 y con el apoyo de una beca de tesis del proyecto PAPIIT IN221819.

Sinodales:

- Dra. Verónica Anaya Martínez
- Dra. María Rosa de Lourdes Avila Costa
- Dra. Bertha Segura Alegría
- Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray
- Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la alegría de vivir y manifestarse en mi vida a través de las personas. A mi madre, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su amor y apoyo incondicional. A mi padre, por sus consejos y siempre enseñarme a seguir los deseos de mi corazón. A mis hermanos por compartir momentos significativos conmigo y por siempre estar dispuestos a apoyarme en cualquier momento. A mi compañero de vida por alentarme a continuar y nunca rendirme. A mis profesores y compañeros que me han servido como guía en mi carrera profesional.

Quiero darle también las gracias mi tutora la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán por su gran apoyo, por haber confiado en mí y haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo. Asimismo quiero agradecer de todo corazón al Dr. Octavio Fabián Mercado Gómez por inculcarme la pasión por la ciencia, por supervisar mi labor como estudiante y siempre tener la paciencia para enseñarme las técnicas de los experimentos. A la QFB Virginia Selene Arriaga Ávila por invertir su tiempo y contribuir en la elaboración del trabajo. A mis sinodales la Dra. María Rosa de Lourdes, la Dra. Bertha Segura Alegría, la Dra. Verónica Anaya Martínez y la Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray que siempre estuvieron dispuestas a contribuir en las revisiones del trabajo.

A la UNAM y a la FESI por todo el aprendizaje adquirido y de esta manera poder alcanzar mis sueños y anhelos.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN.....	10
Epilepsia	10
Definición	10
Clasificación.....	10
Tipos de crisis	11
Epilepsia del Lóbulo Temporal	13
Modelos experimentales.....	15
Tratamientos farmacológicos.....	17
Tratamientos quirúrgicos	18
Tratamientos alternativos (Terapias metabólicas)	18
Efectos mediados por las terapias metabólicas.....	20
Rutas e Intermediarios metabólicos	21
Regulación epigenética	22
Factor de Silenciamiento Restrictivo Neuronal (NRSF/REST).....	25
Estructura y función de NRSF/REST.	26
Papel de NRSF/REST en la epilepsia	27
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVO.....	31
Objetivos particulares	31
MATERIALES Y MÉTODO	32
Tratamiento de restricción alimentaria.	32
Inducción del estado epiléptico.	32
Aislamiento del RNA.....	33
Cuantificación de la expresión de los genes mediante PCR.....	34
Análisis estadístico.	35
RESULTADOS	36

Medición del peso corporal y tiempo de latencia a la primera crisis.	36
Efecto de la restricción alimentaria en la expresión génica de NR5F/REST, CoREST (1, 2 y 3) y HDACs (1 y 2).....	38
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIÓN.....	53
APÉNDICE.....	54
Procedimiento para extracción de ARN.....	54
Purificación de ARN (Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus w/ Zymo-Spin™ IICG Columns).....	55
Remoción de ADN de la muestra de ARN (DNA-free™ Kit).....	56
Retrotranscripción (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit).....	56
Gel de agarosa.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	59

ABREVIATURAS

2DG	2-desoxi-D-glucosa
AL	<i>Ad libitum</i>
ALSE	Ad libitum con status epilepticus
AMPK	Cinasa dependiente de AMP cíclico
CAT	Ácidos tricarboxílicos
DC	Dieta cetogénica
DH	Células piramidales del hilus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	Metiltransferasas del ADN
ELT	Epilepsia del lóbulo temporal
FAE	Fármacos antiepilépticos
HAT	Acetilinasas de histonas
HDAC	Desacetilasas de histonas
HMT	Metiltransferasas de histonas
ILAE	Comisión de clasificación y terminología de la liga internacional contra la epilepsia
LCT	Lesión cerebral traumática
MAT	Metionina adenosiltransferasa
mTOR	Diana mecanística de rapamicina
NRSF/REST	Factor de silenciamiento restrictivo neuronal

PTZ	Pentilenotetrazol
RA	Restricción alimentaria
RASE	Restricción alimentaria con status epilepticus
RC	Restricción calórica
RE-1/NRSE	Factor de transcripción silenciador RE-1
SAM	S-Adenosil metionina
SE	Status epilepticus
β -OHB	B-Hidroxibutirato

RESUMEN

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es un padecimiento neurológico que afecta aproximadamente a 50 millones de personas en el mundo, el 30% de los afectados experimentan ausencia de control de las convulsiones. La opción de tratamiento incluye terapias dietéticas, como la dieta cetogénica (DC), la restricción calórica (RC) y la restricción alimentaria (RA); estas terapias han surgido como alternativa, ya que se ha descrito efecto anticonvulsivante en modelos de crisis agudas. También, el factor de silenciamiento restrictivo neuronal (REST/NRSF) junto con su correpressor (CoREST), regula la expresión de un subconjunto de genes asociados a los sitios RE1, se observó este gen en células granulares después del estado epiléptico inducido por kainato o pilocarpina. Por lo que el objetivo del presente trabajo es analizar el efecto de la restricción alimentaria en la expresión génica del factor de represión REST/NRSF y las variantes del correpressor así como de HDAC's en un modelo de crisis agudas a través de un curso temporal (3 h, 24 h y 48 h). Las ratas se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de estudio. El tratamiento de RA consistió en permitir a los animales el libre acceso de alimento durante 2 horas al día por 20 días, al día 21 se realizó el modelo de crisis agudas con litio pilocarpina. De acuerdo con el tiempo de estudio se extrajeron los hipocampos para realizar la extracción del RNA y después sintetizarlo al DNA complementario. El tratamiento de restricción alimentaria condujo cambio en los niveles de expresión de REST/NRSF CoREST y HDAC's. En el modelo de crisis agudas hay una desregulación de los genes estudiados y la dieta de restricción alimentaria disminuyó la expresión génica de REST y CoREST1 sin un impacto significativo en los genes CoREST 2, CoREST3 y HDAC's. La restricción alimentaria puede ser un tratamiento para la epilepsia mediante la regulación metabólica de REST/NRSF y su correpressor. Sin embargo, es necesario realizar pruebas experimentales de expresión proteica y comprobar si las proteínas de los genes estudiados son funcionales y así conocer su impacto en el desarrollo y progresión de la epilepsia.

INTRODUCCIÓN

Epilepsia

Definición

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico donde se presentan dos o más convulsiones no provocadas. Una convulsión epiléptica se define como la aparición transitoria de signos y/o síntomas causados por anormalidades en la actividad eléctrica del cerebro. Este trastorno afecta aproximadamente a 50 millones de personas en el mundo (Curia *et al.*, 2008) y en México existen por lo menos un millón de personas con alguna forma de epilepsia (López-Meraz *et al.*, 2009). La alta prevalencia de la enfermedad, así como la ausencia de un tratamiento específico, hace necesario realizar nuevos estudios que nos permitan comprender los mecanismos fisiopatológicos básicos (García-García, 2010).

La epilepsia se desarrolla a partir de cambios celulares y moleculares como la degeneración neuronal selectiva, procesos inflamatorios, neurogénesis aberrante y cambios en la eficiencia sináptica en el hipocampo (Roopra *et al.*, 2012). Los cambios en la expresión de genes blanco son eventos críticos que rigen el desarrollo posterior de la enfermedad; sin embargo, los mecanismos implicados todavía están siendo investigados (Baldelli y Meldolesi, 2015).

Clasificación

La Comisión de Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) en el 2010 clasificó las epilepsias de acuerdo con su etiología en tres categorías (Berg *et al.*, 2010):

1. Epilepsias genéticas: Es el resultado directo de un defecto genético, donde las convulsiones son el síntoma principal de la enfermedad. Algunos estudios genéticos muestran alteraciones del gen SCN1A. Dentro de la clasificación, no excluye la posibilidad de que los factores ambientales puedan contribuir a la expresión de la enfermedad.

2. Epilepsias de causa estructural-metabólica: Se consideran cuando existe un trastorno estructural o metabólico definido, aumentando el riesgo de desarrollar la enfermedad. Las etiologías estructurales pueden ser congénitas, como ocurre en la esclerosis tuberosa y en muchas malformaciones del desarrollo cortical.

3. Epilepsias de causa desconocida: Se considera de causa desconocida cuando se ignora su sustrato etiológico. En esta clasificación se encuentran la epilepsia de lactancia con crisis focales migratorias, la epilepsia rolándica benigna, la epilepsia occipital benigna de Gastaut y el síndrome de Panayiotopoulos.

Tipos de crisis

Las crisis epilépticas se producen por la descarga hipersincrónica o paroxística de un grupo de neuronas, hiperexcitables, localizadas en el córtex cerebral. En la tabla 1 se muestra la clasificación de las crisis epilépticas de acuerdo con la ILAE. Generalmente se dividen en crisis generalizadas (comienzan en los dos hemisferios simultáneamente), crisis parciales (comienzan en un área hemisférica específica) y crisis inclasificables (Yusta, 2005).

Las crisis generalizadas se dividen en convulsivas y no convulsivas. Las convulsivas a su vez se clasifican en tónicas, clónicas y tónico-clónicas (Yusta, 2005). En las crisis convulsivas intervienen estructuras corticales y subcorticales, pero no necesariamente involucra toda la corteza. Las crisis generalizadas no convulsivas incluyen las crisis de ausencia (lapsos de pérdida de conciencia de menos de 10 segundos, con parpadeos o muecas faciales), crisis mioclónicas (sacudidas musculares bilaterales y simétricas, sin alteraciones de la conciencia), crisis tónicas (contracciones musculares más prolongadas) y crisis atónicas (pérdida de tono bilateral y súbito, con o sin empeoramiento del nivel de conciencia) (Berg *et al.*, 2010).

Tabla 1. Clasificación internacional de las crisis epilépticas. (Tomado de Yusta, 2005).

1. Crisis generalizadas (convulsivas y no convulsivas)
1.1 Crisis de ausencia
1.1.a. Ausencias típicas
1.1.b. Ausencias atípicas
1.2. Crisis mioclónicas
1.3. Crisis clónicas
1.4. Crisis tónicas
1.5. Crisis tónico-clónicas
1.6. Crisis atónicas (crisis astáticas)
2. Crisis parciales o focales
2.1. Crisis parciales simples:
2.1.a. Con signos motores
2.1.b. Con síntomas somatomotores o sensoriales especiales
2.1.c. Con signos o síntomas autonómicos
2.1.d. Con síntomas psíquicos
2.2. Crisis parciales complejas
2.2.a. Crisis parciales simples seguidas de alteración de la conciencia
2.2.b. Con empeoramiento de la conciencia desde el inicio
2.3. Crisis parciales con evolución secundaria hacia crisis generalizadas
2.3.a. Crisis parciales simples que evolucionan a crisis generalizadas
2.3.b. Crisis parciales complejas que evolucionan a crisis generalizadas
2.3.c. Crisis parciales simples que evolucionan a crisis parciales complejas y después a crisis generalizadas
3. Crisis epilépticas inclasificables

Las crisis parciales simples no producen alteración en la conciencia y se dividen en: motoras, sensitivas, autonómicas y psíquicas. Si no se presentan síntomas motores son denominadas auras en cambio, si la conciencia está alterada, se denominan crisis parciales complejas. Las descargas neuronales anormales focales pueden dar lugar a que una crisis parcial simple evolucione a una crisis parcial compleja o generalizada, llamada crisis parcial secundariamente generalizada (Yusta, 2005).

Las convulsiones focales se limitan a un solo hemisferio, pero pueden originarse en estructuras subcorticales. El inicio ictal de cada convulsión es consistente de una a otra, los patrones de propagaciones pueden implicar el hemisferio contralateral. Sin embargo, en algunos casos hay más de una red y más de un tipo de crisis, pero cada tipo de ataque individual tiene un sitio consistente de inicio (Berg *et al.*, 2010).

Epilepsia del Lóbulo Temporal

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es la forma más común de epilepsia, aproximadamente un tercio de los pacientes que la padecen presentan farmacorresistencia (Huang *et al.*, 2015). En la ELT existe aumento en la frecuencia de las convulsiones y se puede observar deterioro cognitivo (Pitkänen y Sutula, 2002). En la figura 1 se observan cortes histológicos de hipocampo de rata con ELT en donde se presentan profundas modificaciones morfológicas tales como; muerte de neuronas en la capa de células piramidales del hilus (DH) y CA1, pérdida moderada de neuronas de la capa de células piramidales CA3 y dispersión de las células granulares del giro dentado. De manera interesante, los cambios neuropatológicos en el giro dentado parecen estar implicados en la epileptogénesis crónica (Heck *et al.*, 2004).

El término epileptogénesis está relacionado con el desarrollo de la epilepsia sintomática (adquirida) que se presenta por el daño estructural identificable en el cerebro. Frecuentemente los términos de epileptogénesis o período de latencia son utilizados como sinónimos en términos operacionales para referirse al período que se inicia después de que ocurre una lesión (lesión cerebral traumática [LCT] o un ataque) e incluso durante la lesión (convulsión febril prolongada, *status epilepticus* [SE], encefalitis) y termina en el momento en que aparece la primera convulsión espontánea (Pitkänen y Lukasiuk, 2011).

La epileptogénesis es un proceso dinámico que altera progresivamente la excitabilidad neuronal, establece interconexiones críticas y ocurren cambios estructurales complejos antes de que aparezca la primera convulsión espontánea. Estos cambios se resumen en la figura 2, donde existe generalmente neurogénesis, gliosis reactiva, rebrote axonal (sprouting), lesión axonal, plasticidad dendrítica, angiogénesis, reacomodo de la matriz extracelular y canalopatías adquiridas (Pitkänen y Lukasiuk, 2009).

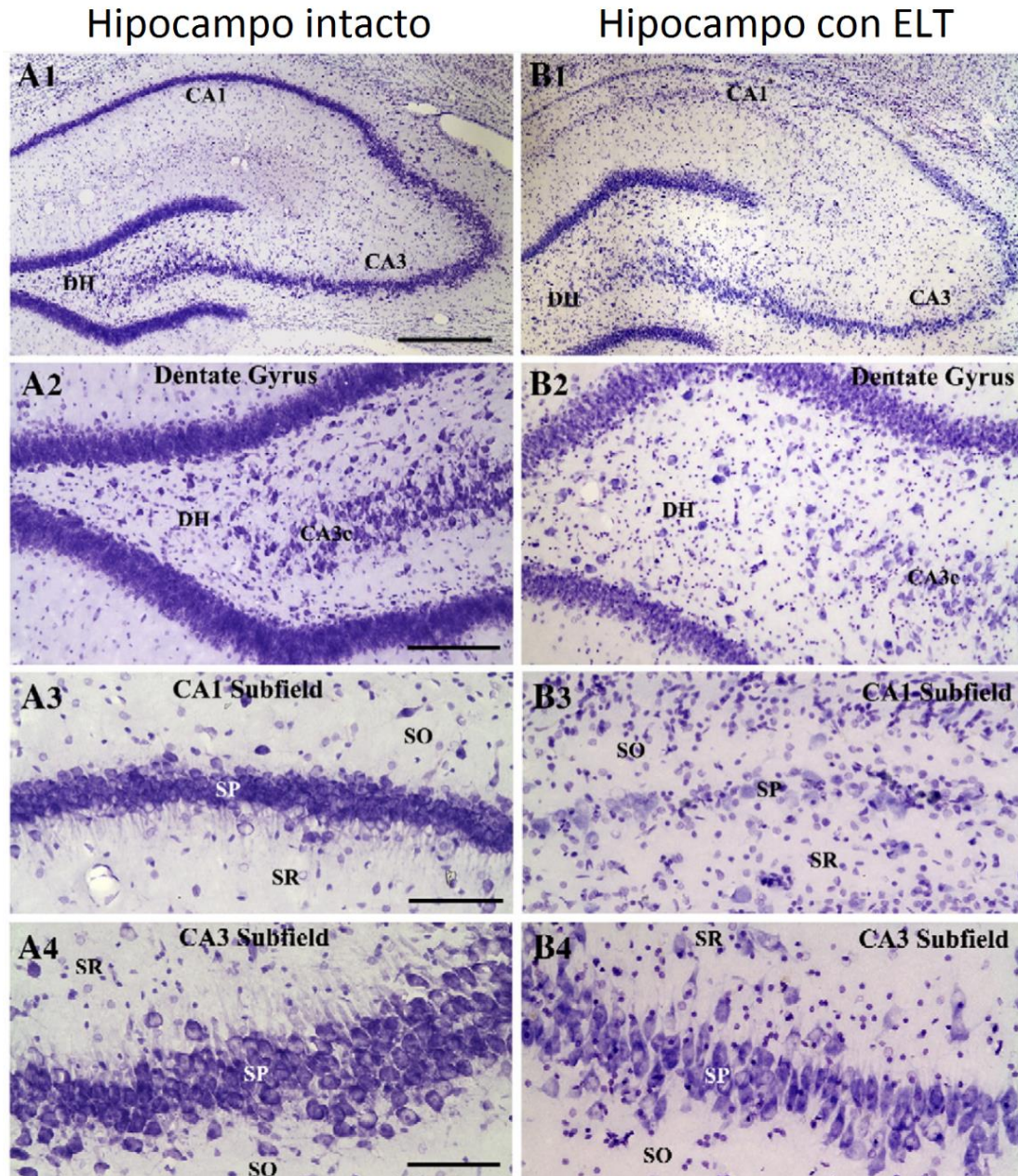


Figura 1. Citoarquitectura del hipocampo de en una rata control (A1) y una con ELT a los 6 meses post- estado epiléptico (B1). Vista general de un hipocampo de una rata control (A1) y una rata con ELT (B1). A2-B ilustra regiones ampliadas del hipocampo tales como el giro dentado (A2-B2), subcampo CA1 (A3, B3) y subcampo CA3 (A4 y B4). DG, giro dentado; DH hilus; SO, estrato oriens; SP, estrato piramidal; SR, estrato radiatum. Barra de escala, A1 y B1=500 μ m; A2 y B2=100 μ m; A3, B3, A4, B4 μ m (Tomado de Rao et al., 2007).

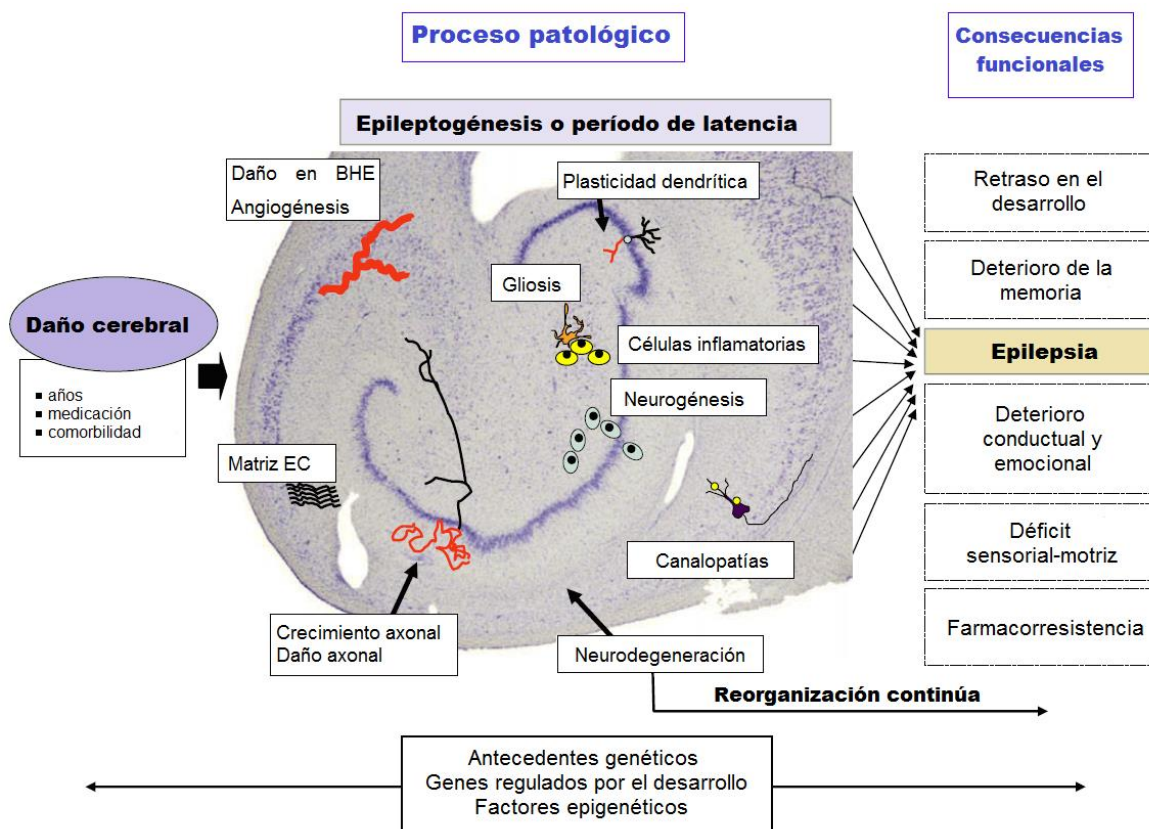


Figura 2. Alteraciones celulares que ocurren durante la epileptogénesis. Varios tipos de daños cerebrales tales como la lesión cerebral traumática (LCT), el estatus epileptico (SE) o accidentes cerebrovasculares pueden desencadenar el proceso epiléptico. Las alteraciones celulares y su distribución temporal son mejor caracterizados en el hipocampo, en particular, en los modelos SE. Estos incluyen neurodegeneración, neurogénesis, gliosis reactiva, invasión de células inflamatorias, crecimiento axonal aberrante (sprouting), lesión axonal, plasticidad dendrítica, angiogénesis, cambios en la matriz extracelular y alteración en los canales iónicos de voltaje. Como consecuencia se desencadenan alteraciones funcionales, además de la epilepsia, retraso en el desarrollo, trastornos de la memoria, deterioro conductual y emocional, déficit sensorial-motriz y refractariedad de drogas. Durante el proceso epileptógeno, estas alteraciones están sujetas a modulación por antecedentes genéticos, genes regulados por el desarrollo o factores epigenéticos (Tomado y modificado de Pitkänen y Lukasiuk, 2009).

Modelos experimentales

Los estudios en modelos animales han proporcionado mayor comprensión de los mecanismos subyacentes de la ELT (Heck *et al.*, 2004). En la tabla 2 se presentan las tres categorías de modelos para la ELT de acuerdo con la causa de la actividad epiléptica (sustancias químicas, estímulos físicos o mutaciones genéticas) (Zavala-Tecuapetla y López-Meraz, 2011).

Tabla 2. Modelos experimentales de epilepsia en ratas (Modificado de Zavala-Tecuapetla y López-Meraz, 2011).

Tipo de agente Pro-Epiléptico	Agente causante	Tipo de actividad epiléptica generada	Tipo de protocolo (Duración)
Químico	Ácido kaínico	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas, SE.	Agudo, crónico
	Pilocarpina	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas, SE.	Agudo, crónico
	Pentilentetrazol	Crisis clónico-tónicas generalizadas	Agudo
		Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas.	Crónico (Kindling químico)
		Crisis de ausencia	Agudo
Físico	Kindling eléctrico	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas	Crónico
Genético	Ratas genéticamente modificadas	Crisis de ausencia y crisis convulsivas	Agudo, crónico

El kindling consiste en la estimulación repetida mediante estímulos eléctricos o químicos sobre estructuras límbicas (habitualmente la amígdala, la corteza entorrinal o el hipocampo) produciendo aumento de la excitabilidad neuronal. Las células se transforman en "neuronas patológicas" provocando hiperexcitabilidad capaz de generar crisis epilépticas; primero, cuando se les estimula y, posteriormente de manera espontánea (Auvergne *et al.*, 2002).

Por otra parte, el modelo farmacológico de SE se produce mediante la inyección sistémica o intracerebral de diferentes agentes convulsivos, como el ácido kaínico o 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 días, semanas o meses y súbitamente se inician las crisis de forma espontánea y recurrente (fase crónica) (Kandrataviciu *et al.*, 2014).

La administración de ácido kaínico en roedores provoca la inducción de crisis agudas y por consecuencia daño neuronal en determinadas poblaciones de neuronas del hipocampo (Schauwecker, 2003). Otros compuestos como el pentilentetrazol (PTZ), la estriquina, N-metilD, L-aspartato, la toxina tetánica, y la penicilina son fármacos ampliamente utilizados para generar modelos de convulsiones agudas. Asimismo, el modelo de convulsiones agudas puede servir para la detección rápida de la acción de fármacos antiepilépticos, pero no necesariamente resulta en epilepsia crónica (Kandrataviciu *et al.*, 2014).

La pilocarpina es un agonista de los receptores colinérgicos muscarínicos. De manera interesante, las características clínicas y neuropatológicas de la ELT en humano se reproduce con la inyección sistémica o intracerebral de pilocarpina. Asimismo, provoca daños estructurales y convulsiones recurrentes y espontáneas que desembocan en el sistema límbico (Curia *et al.*, 2008). En la tabla 2, se resumen algunos de los modelos experimentales más usados en el área de investigación, el tipo de crisis que generan y la duración del protocolo.

Tratamientos farmacológicos

En aproximadamente dos tercios de las personas con epilepsia, las convulsiones se controlan con fármacos antiepilépticos (FAE) y el fármaco se elige de acuerdo con el tipo de crisis (Gómez, 2004). Algunos de los fármacos más utilizados son benzodiazepinas, fenitoína, carbamacepina, valproato sódico, vigabatrina, lamotrigina, pregabalina, topiramato, levetiracetam, entre otros (Zavala-Tecuapetla y López-Meraz, 2011).

Los efectos adversos de los FAE sobre el aprendizaje, la conducta y las funciones cognitivas dependen del mecanismo de acción del fármaco. El primer efecto es por la dosis administrada, el segundo por los niveles séricos, el tercer efecto se debe a la respuesta biológica del paciente y por último por la aparición precoz, crónica o diferida del efecto adverso nocivo (García-Peñas *et al.*, 2014).

Los pacientes con epilepsia crónica usualmente requieren un tratamiento a largo plazo con FAE y aquellos con epilepsia refractaria a menudo reciben politerapia

(Laxer *et al.*, 2014). Se ha intentado la aplicación de otros medios terapéuticos cuando un paciente no responde al tratamiento farmacológico. Por lo tanto, se requiere de nuevas terapias con el objetivo de tener el control completo de las crisis, especialmente las convulsiones tónico-clónicas (Laxer *et al.*, 2014).

Tratamientos quirúrgicos

La cirugía de la epilepsia ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de casos refractarios a los fármacos. Se observa ausencia de crisis en el 38% de los pacientes un año después de la intervención y disminución de las crisis parciales con pérdida de conocimiento en el 58% superior a los resultados obtenidos con tratamiento farmacológico. Asimismo, se presenta ausencia de crisis en el 3% y disminución del 8% en crisis parciales con pérdida de conciencia (Gómez, 2004).

A pesar de la resección completa del área afectada, del gran número de pacientes operados y del desarrollo de nuevas técnicas, un alto porcentaje de pacientes continúa con crisis. En estos casos, se postula la posible patología hipocampal epileptiforme bilateral y lesiones neocorticales extrahipocampales (Bender del Busto *et al.*, 2006).

Tratamientos alternativos (Terapias metabólicas)

Las terapias metabólicas son tratamientos alternativos para controlar las crisis en pacientes con epilepsia refractaria. Están diseñadas para disminuir drásticamente la disposición de la glucosa a través de la reducción de carbohidratos, por lo que, el cuerpo humano comienza a metabolizar la grasa. Al metabolizar los lípidos, se producen β -hidroxibutirato (β -OHB), acetoacetato y acetona (cuerpos cetónicos), productos que pueden ser medidos en suero y orina. A partir de ello se ha observado que casi cualquier dieta que resulta en cetonemia y/o niveles reducidos de glucosa en sangre puede producir un efecto anticonvulsivo (Cervenka y Kossoff, 2013).

Dieta cetogénica

Las dietas que producen un estado de cetosis se denominan “cetogénicas”. La dieta cetogénica (DC) es un tratamiento no farmacológico, utilizado desde 1921 (Armeno

et al., 2014). La popularidad de la DC creció a lo largo del siglo pasado, pero rápidamente fue suplantada por la aparición de nuevos fármacos antiepilépticos (como la fenitoína) que se hicieron disponibles en la década de 1930's (Masino y Rho, 2012).

En la DC clásica el 90% de la ingesta calórica se obtiene a partir del consumo de lípidos y este cambio fundamental del consumo de carbohidratos a la oxidación de ácidos grasos da lugar a efectos clínicos similares al ayuno (Cervenka y Kossoff, 2013). Dado que se trata de un plan alimentario no equilibrado tanto en macro como en micronutrientes, puede causar déficits nutricionales en energía, proteínas, minerales y vitaminas y exceso de lípidos, con riesgo de ocasionar efectos secundarios no deseados. Uno de los más frecuentes es el aumento excesivo de la acidosis metabólica y manifestaciones gastrointestinales como el dolor abdominal e intolerancia a la alimentación con riesgo de deshidratación e hipoglucemia. Además, la DC puede empeorar el metabolismo óseo si no se realizan el seguimiento y aporte de suplementos de manera adecuada (Armeno *et al.*, 2014).

Restricción calórica

La restricción calórica (RC) consiste en la limitación de calorías totales derivadas de carbohidratos, grasas o proteínas a un nivel de 25 a 60% por debajo del consumo normal de calorías. Varios estudios han reportado que la RC es la única intervención dietética que se conoce por incrementar la longevidad y retardar el proceso de envejecimiento en diferentes modelos animales (Li Y. *et al.*, 2011).

Se conoce que la corteza cerebral en el envejecimiento de ratas alimentadas de manera libre (*ad libitum*, AL) se caracteriza por cambios en la densidad sináptica y el transporte de vesículas que posiblemente afectan a la transmisión sináptica con el aumento de la edad. Se ha demostrado que el régimen de RC induce una función neuroprotectora. Esta neuroprotección se caracteriza por una respuesta alterada al estrés oxidativo (Wood *et al.*, 2015).

La RC conduce a una serie de cambios bioquímicos y metabólicos; algunos de estos cambios se han demostrado en estudios con animales para disminuir la epileptogénesis. Los cambios que podrían ser relevantes para afectar la ictiogénesis

incluyen disminución en los niveles de glucosa y en la inflamación sistémica, aumento de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), inhibición de la cinasa blanco de la rapamicina de células de mamífero (mTOR), y aumento de la autofagia (Yuen y Sander, 2014).

Restricción alimentaria

La restricción alimentaria (RA) consiste en evitar el consumo de alimentos y bebidas calóricas por distintos períodos, por lo general el período de alimentación abarca 12 h (Damiola *et al.*, 2000; Hatori *et al.*, 2012). La aplicación de la RA da como resultado una reducción aproximada del 20 al 30% de la ingesta calórica (Bronwen *et al.*, 2006). El mantenimiento de la dieta durante 2-4 meses en ratas da como resultado la resistencia de las neuronas del hipocampo a la degeneración inducida por la administración de ácido kaínico (Bruce-Keller *et al.*, 1999).

Este modelo alimentario ha sido sugerido como una posible terapia alternativa para el tratamiento de la epilepsia refractaria debido a que se ha descrito recientemente un efecto anticonvulsivante en modelos de crisis agudas. Este efecto se le atribuye a que dicha dieta restrictiva es capaz de modular la actividad de los principales componentes de las rutas de señalización implicadas en el metabolismo energético (vías de señalización AMPK y Akt). Asimismo, se incrementa la concentración de metabolitos secundarios (como β -OHB) disminuyendo la actividad de proteínas capaces de alterar la estructura de la cromatina (HDACs) y promoviendo la acetilación de algunos residuos de lisina de la histona 3 (Landgrave-Gómez *et al.*, 2016).

Efectos mediados por las terapias metabólicas

Las terapias metabólicas han demostrado ser eficientes para pacientes cuyas convulsiones no han respondido a los FAEs (Landgrave-Gómez *et al.*, 2017; Yuen y Sander, 2014). Estos tipos de tratamientos al disminuir los niveles de glucosa se incrementa la producción de cuerpos cetónicos, se restablece el ciclo de los ácidos

tricarboxílicos (CAT) y se restauran los neurotransmisores y los canales iónicos (Landgrave-Gómez *et al.*, 2017).

Se sabe que altos niveles circulantes de cuerpos cetónicos pueden proteger el tejido cerebral contra la epilepsia refractaria. Sin embargo, no son claros los mecanismos celulares y moleculares que subyacen el efecto protector y diferentes hipótesis han sido propuestas (Kobow y Blümcke, 2014). Enseguida se profundizará sobre el posible vínculo metabólico con la regulación epigenética.

Rutas e Intermediarios metabólicos

La habilidad de las neuronas para activar las vías metabólicas es en respuesta de la activación sináptica. Las neuronas utilizan el lactato como combustible oxidativo, además metabolizan la glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato para mantener su equilibrio redox y evitar la apoptosis. La glucosa es el combustible energético principal del cerebro, también es un precursor que suministra intermediarios metabólicos para reacciones biosintéticas (Figura 3). En el cerebro, la mayoría de estos intermediarios sirven para sintetizar neurotransmisores, así como otras moléculas de importancia biológica (Kobow y Blümcke, 2014).

Bajo ciertas condiciones de disponibilidad de glucosa, el cerebro presenta adaptación metabólica y utiliza β -OHB, acetoacetato y acetona como fuentes de energía alternativa. Las neuronas metabolizan los cuerpos cetónicos en acetil-coenzima A (acetil-CoA), que se oxida a través del CAT (Prins, 2008). Se sabe que niveles circulantes elevados de cuerpos cetónicos contribuyen a los efectos antiepilépticos (McNally y Hartman, 2012).

Los mecanismos celulares y moleculares subyacentes al efecto protector de los cuerpos cetónicos no están claros y se han presentado varias hipótesis (Masino y Rho, 2012). Sin embargo, en los últimos años se han demostrado vínculos funcionales entre el metabolismo y el control epigenético (Landgrave-Gómez *et al.*, 2017).

Regulación epigenética

Las enzimas de las histonas y del DNA (DNMTs, HATs, HDACs, HMTs, entre muchos otros) perciben diferentes cambios metabólicos alterados por los diferentes regímenes dietéticos (Landgrave-Gómez *et al.*, 2015). Al requerir cofactores de numerosas vías bioquímicas se inicia, se perpetua o se eliminan diferentes marcas epigenéticas (Kobow y Blümcke, 2014). Estas enzimas se asocian a grandes complejos multiprotéicos uniéndose a secuencias específicas del DNA regulando la expresión génica (Riccio 2010).

En la figura 3 se presenta un esquema de los procesos metabólicos de las células neuronales y su interacción con los mecanismos epigenéticos, por ejemplo, la acetilación de histonas y la metilación del DNA en el núcleo (Kobow y Blümcke, 2014). En las neuronas, las enzimas modificadoras de la cromatina mejor caracterizadas son las histonas acetilasas (HAT) y las histonas desacetilasas (HDAC). Cuando la glucólisis excede la capacidad metabólica aeróbica de la célula, el lactato se acumula y entra al núcleo, inhibiendo la actividad de HDAC. Se genera una hiperacetilación aumentando la expresión génica en una amplia gama de genes blanco. Se ha demostrado que las HDACs asociadas a los genes activos presentan sobreexpresión y hay menores probabilidades de que se encuentren reguladas a la baja (Latham *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha hipotetizado que el efecto benéfico de las dietas metabólicas se debe a la inhibición de HDACs por β -OHB. Las concentraciones de acetil-CoA y NAD⁺ afecta la acetilación de histonas y por lo tanto el estado metabólico celular y la regulación transcripcional. Curiosamente, los defectos en muchas enzimas del CAT pueden conducir a la epilepsia en los seres humanos (Kobow y Blümcke, 2014).

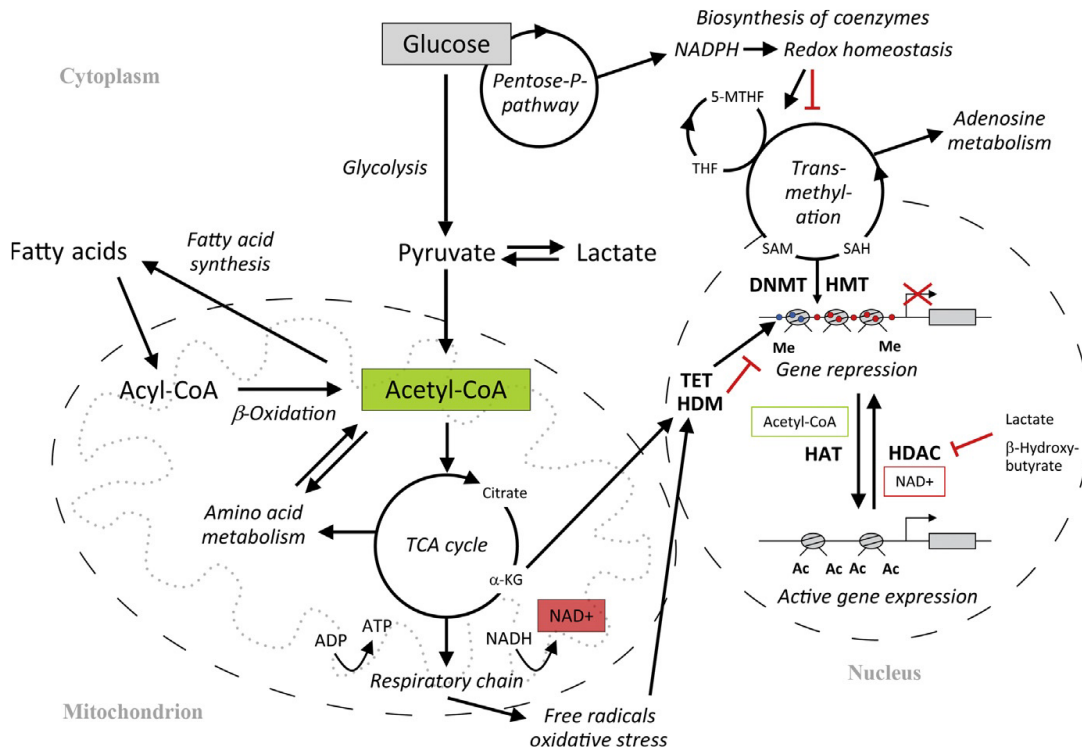


Figura 3. El metabolismo afecta la regulación epigenética y genética a través de la disponibilidad de cofactores. Ac, grupo acetil; HAT/HDAC, histona acetiltransferasa/deacetilasa; Me, grupo metilo; HMT/HDM, histona metiltransferasa/demetilasa; puntos rojos, metilación del DNA, 5-mC; puntos azules, hidroximetilación del DNA, 5-hmC; DNMT, DNA metiltransferasa; TET, translocación 10-11 (enzima de desmetilación del DNA-); ADP/ATP, adenosina di-/ trifosfato; NAD⁺/NADH₂, nicotinamida adenina dinucleótido (hidróxido); 5-MTHF/THF, (5-metil) tetrahidrofolato; SAM/SAH, S-adenosilmetionina/-homocisteína (Tomado de Kobow y Blümcke, 2014).

Para mantener su equilibrio redox las neuronas metabolizan la glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato, incluso en condiciones cuando el lactato se utiliza como combustible oxidativo primario. La alteración de la capacidad de amortiguación redox celular afecta la actividad enzimática de la metionina adenosiltransferasa (MAT), ésta utiliza el grupo metilo proporcionado por 5'metiltetrahidrofolato (5'-MTHF) y el aminoácido metionina para regenerar S-Adenosilmetionina (SAM) como donador del grupo metilo para la metilación del DNA (Kobow y Blümcke, 2014). Cuando el DNA está simétricamente metilado, los grupos metilo promueven un cambio conformacional de la estructura del DNA. La principal consecuencia de la metilación es que una gran variedad de factores de transcripción ya no pueden reconocer el DNA reprimiendo la expresión transcripcional (Landgrave-Gómez *et al.*, 2015). Mutaciones en las enzimas de la vía de

transmetilación, en el ciclo del folato, así como los cambios en el metabolismo de la adenosina se han relacionado con la epilepsia en los seres humanos (Kobow y Blümcke, 2014).

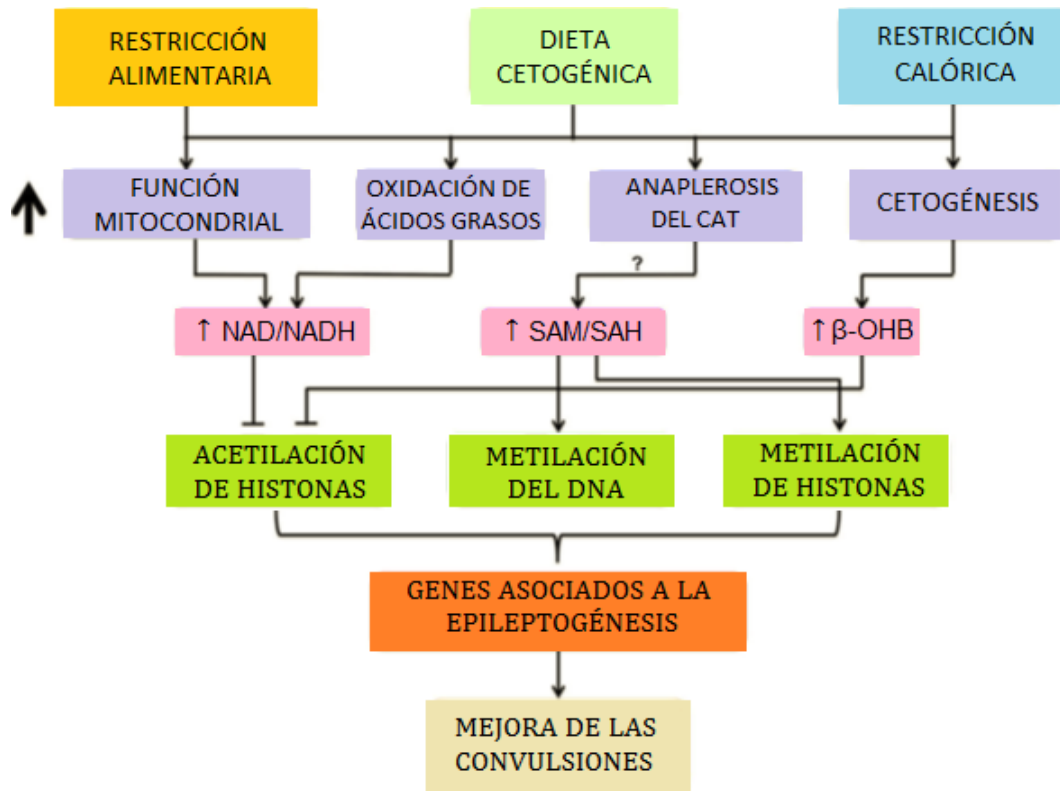


Figura 4. Los procesos metabólicos de los tratamientos dietéticos pueden mejorar las crisis a través de la regulación génica mediante modificaciones epigenéticas. Los tratamientos dietéticos que han demostrado eficacia en la epilepsia (restricción alimentaria, dieta cetogénica y restricción calórica) son capaces de inducir un cambio metabólico específico. Cada una de las intervenciones regulan la actividad de diferentes rutas metabólicas; estos cambios incrementan la concentración de una gran variedad de metabolitos (NAD⁺, SAM, y β-OHB) alterando la actividad de modificadores epigenéticos (HDACs, HMTs y DNMTs) contribuyendo a restaurar los patrones aberrantes de expresión génica inducidos por la epilepsia y favoreciendo efectos beneficiosos como mejora de las crisis convulsivas (Tomado de Landgrave-Gómez et al., 2017).

A diferencia de los cambios genéticos, las modificaciones epigenéticas son reversibles, lo que sugiere que DNMTs, HATs, HDACs y HMTs pueden ser blancos terapéuticos. Específicamente, el vínculo entre la epilepsia y el tratamiento dietético ha sido ampliamente estudiado. En la figura 4 se puede observar que a través de los diferentes tratamientos metabólicos las concentraciones de algunos metabolitos

pueden verse alterados, como NAD⁺, SAM, y β -OHB, que son capaces de modular la actividad de las enzimas involucradas en procesos de regulación epigénica (HDACs, HMTs y DNMTs) contribuyendo a restaurar los patrones aberrantes de expresión génica inducidos por la epilepsia y favoreciendo efectos benéficos como la reducción de crisis convulsivas (Landgrave-Gómez *et al.*, 2017).

Factor de Silenciamiento Restrictivo Neuronal (NRSF/REST)

El factor de silenciamiento restrictivo neuronal (NRSF/REST) es una proteína que pertenece a la familia de represores transcripcionales Gli-Krüppel. Dicho represor recluta histonas deacetilasas, desmetilasas y metiltransferasas modulando la arquitectura epigenética de la cromatina y afectando la expresión de genes blanco Olguin, 2006.

NRSF/REST interactúa con correpresores, uno localizado en el dominio N-terminal (aa 43-83) mSin3a y el otro en el dominio C-terminal (989-1097) CoREST. Estos correpresores a su vez reclutan HDACs del tipo 1 y 2, regulando la acetilación de la región aminoterminal de las histonas en el núcleo del nucleosoma estableciendo patrones específicos de hiper o hipoacetilación, asociados a la activación y represión de genes. NRSF/REST se une al elemento represor-1/elemento (RE-1/NRSE), presente en el promotor o en regiones reguladoras de los genes neuronales estructurales a través de los primeros ocho dedos de zinc (figura 5). El noveno dedo de zinc es necesario para reclutar a CoREST siendo el dominio sant de CoREST necesario para su unión a NRSF/REST (Olguin, 2006).

De manera reciente, ha recibido especial atención NRSF/REST como blanco terapéutico para enfermedades neurodegenerativas y otras enfermedades mentales (Zhao *et al.*, 2017). Asimismo, algunos genes blancos de NRSF/REST están involucrados en la excitabilidad neuronal por lo que podría estar implicado en la generación de la epilepsia (Roopra *et al.*, 2012).

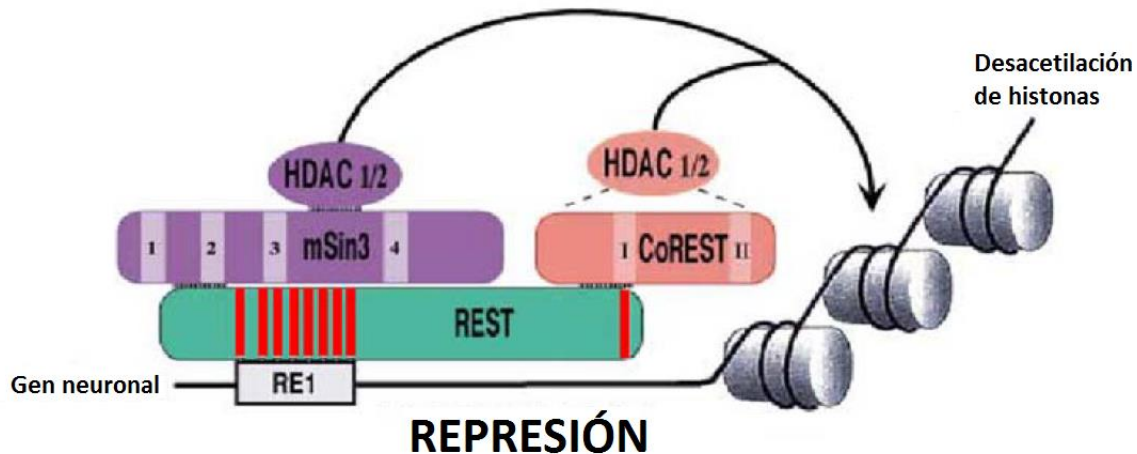


Figura 5. Estructura función de NRSF/REST (Tomado modificado de Ballas et al., 2001).

Estructura y función de NRSF/REST.

Se ha demostrado que NRSF/REST es el determinante clave para la expresión de genes específicos de las neuronas y es un importante regulador de la expresión de genes neuronales durante la embriogénesis temprana. Además, este regulador transcripcional contribuye a la diferenciación neuronal durante el desarrollo programando la expresión génica en las neuronas maduras (Patterson *et al.*, 2017).

Hasta la fecha se ha observado que NRSF/REST reprime más de 2000 genes neuronales específicos en tejidos no neuronales y precursores neurales indiferenciados (Zhao *et al.*, 2017). Es importante destacar que este represor desempeña un papel crucial en la regulación de funciones vitales del cerebro, además de estar involucrado en la diferenciación neuronal y en la plasticidad sináptica, contribuye a la regulación del crecimiento neuronal, en la liberación y el transporte vesicular, así como en los conductores iónicos (Campestrini *et al.*, 2017).

En el cerebro de rata adulta, el RNAm de NRSF/REST se encuentra en el sistema olfatorio (capa de gránulos y capas plexiformes), corteza cerebral, en el hipocampo, diencefalo (tálamo e hipotálamo), mesencefalo (como la sustancia nigra *pars compacta*), tronco encefálico y el cerebelo, con los niveles más altos detectados en el hipocampo, médula y mesencefalo. En el cerebro humano los altos niveles de RNAm se detectan en los adultos mayores. Lo que indica que los niveles de

NRSF/REST durante el envejecimiento están estrechamente correlacionados con la cognición y la longevidad resaltando sus múltiples funciones en el cerebro (Zhao *et al.*, 2017).

NRSF/REST recluta a CoREST para reprimir específicamente la expresión de genes neuronales en células no neuronales y células madre neurales. Sin embargo, en las células madre neurales, CoREST tiene objetivos de un grupo de genes que no son objetivos de REST, lo que sugiere otros mecanismos pertinentes en la especificación neuronal. CoREST es parte del complejo correpressor, que comprende la histona desmetilasa LSD1/KDM1A y las histonas desacetilasas 1 y 2 (HDAC1/2), denominado como complejo LCH (Barrios *et al.*, 2014).

En los seres humanos, CoREST está codificado por el gen *rcor1* que contiene 482 aminoácidos con una masa molecular de 66 kDa. Además, otros dos genes, *rcor2* que codifica a CoREST2 y cuenta con 523 aminoácidos, mientras que *rcor3* codifica para CoREST3, una proteína con cuatro isoformas de 436, 449,495 y 553 aminoácidos generados por el empalme alternativo (splicing). Aunque las tres proteínas muestran una alta identidad de secuencia, se sabe poco sobre las actividades transcripcionales de CoREST 1, CoREST2 Y CoREST3, sus asociaciones funcionales y su perfil de expresión en el cerebro de mamíferos (Barrios *et al.*, 2014).

Papel de NRSF/REST en la epilepsia.

La represión de NRSF/REST se ha investigado principalmente en células madre y en la diferenciación neuronal, demostrando su importancia también en las neuronas adultas (Nechiporuk *et al.*, 2015). Los bajos niveles de NRSF/REST durante la diferenciación se deben a la regulación de la expresión de genes que codifican a factores de transcripción, proteínas de liberación de transmisores, canales dependientes de voltaje y proteínas de señalización. El incremento de NRSF/REST en las neuronas ocurre durante el envejecimiento. Sin embargo, la estimulación prolongada con diversos agentes induce aumento de NRSF/REST, que se asocia a la represión de genes específicos de las neuronas. El efecto protector o perjudicial

del aumento neuronal de NRSF/REST sigue siendo un tema de debate (Zhao *et al.*, 2017).

Debido a que puede controlar patrones de transcripción fundamentales se ha investigado a mayor detalle la contribución de NRSF/REST en enfermedades neurológicas como en la epilepsia y su desarrollo (epileptogénesis) (Roopra *et al.*, 2012; Pozzi *et al.*, 2013; Baldelli y Meldolesi, 2015). La expresión génica de REST/NRSF en el hipocampo aumenta significativamente posterior a las convulsiones en un modelo experimental de crisis epilépticas (McClelland *et al.*, 2011). La represión resultante del aumento de NRSF/REST incluyó 10% de los genes diana analizados, incluyendo aquellos que codifican canales y proteínas de señalización. Además, se encontró que la afinidad de la unión de NRSF/REST a la secuencia RE-1 del ADN de sus genes blanco provocaba no sólo la restauración de corrientes específicas sino también la reducción del patrón inicial de convulsiones (McClelland *et al.*, 2014).

Algunas investigaciones han enfatizado el papel de NRSF/REST en la inducción de la epilepsia y posiblemente en protección contra ella. Un grupo de investigación informó acerca de los efectos del inhibidor glucolítico 2-desoxi-D-glucosa (2DG) en un modelo de kindling en ratas, se observó reducción del efecto antiepiléptico, debido a la activación de un complejo remodelador de la cromatina controlado por aumento de NRSF/REST (Garriga-Canut *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha demostrado que la dieta cetogénica mantiene su efecto antiepiléptico incluso en ausencia del aumento de NRSF/REST (Hu *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que NRSF/REST es un objetivo terapéutico potencial para enfermedades neurodegenerativas y otros trastornos cerebrales. Su pérdida o translocación podría llevar a la demencia en los seres humanos y su inhibición puede ser eficaz para las convulsiones. Por lo tanto, se requieren estudios adicionales sobre la función de NRSF/REST en el cerebro epiléptico.

JUSTIFICACIÓN

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos que afecta a hombres y mujeres de cualquier edad y de todos los grupos socioeconómicos alrededor del mundo, en el cual, la mayor frecuencia se presenta en países en vías de desarrollo como México. Es un grave problema de salud pública debido a su alta tasa de incidencia y prevalencia en países que no tienen acceso a la atención médica adecuada o a fármacos antiepilépticos. Probar los efectos de las terapias basadas en el metabolismo para disminuir las crisis epilépticas podría dar paso a una alternativa para los pacientes farmacorresistentes.

Los cambios en la expresión de genes son eventos críticos que determinan el desarrollo de la epilepsia. Sin embargo, los mecanismos de expresión de los genes involucrados en esta enfermedad se continúan debatiendo. El efecto benéfico del tratamiento de restricción alimentaria en la epilepsia puede generar nuevas alternativas factibles para uso humano siendo accesible en pacientes que se encuentran en países en vías de desarrollo.

HIPÓTESIS

Si en la epilepsia existe desregulación en la expresión génica de NRSF/REST, CoREST y HDACs, entonces el tratamiento de restricción alimentaria podría evitar la sobreexpresión génica del factor de represión y su complejo inducido por crisis epilépticas y así explicar su efecto anticonvulsivo.

OBJETIVO

Analizar el efecto de la restricción alimentaria en la expresión génica del factor de represión REST/NRSF en un modelo de crisis agudas a través de un curso temporal (3 h, 24 h y 48 h).

Objetivos particulares

1. Analizar los cambios de expresión génica que codifican para las variantes del correpresor (CoREST 1, CoREST 2, CoREST 3) a través del tiempo.
2. Analizar los cambios de expresión génica que codifican para HDAC 1 y HDAC 2 a distintos tiempos posterior al estado epiléptico.

MATERIALES Y MÉTODO

Tratamiento de restricción alimentaria.

Se utilizaron un total de 46 ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de 210-290 g las cuales se mantuvieron bajo condiciones estándares de bioterio. Las ratas se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de estudio, cada uno con una n=5: grupo control *ad libitum* (AL), grupo restricción alimentaria (RA), grupo *ad libitum* con status epilepticus (AL-SE) y grupo de restricción alimentaria con SE (RA-SE). Los grupos AL y AL-SE tuvieron libre acceso a comida y agua. El tratamiento de RA consistió en permitir a los animales el libre acceso de alimento durante 2 horas al día por 20 días con libre acceso al agua, al día 21 se realizó el modelo de crisis agudas.

Inducción del estado epiléptico.

La combinación de litio-pilocarpina es utilizada para inducir lesiones cerebrales agudas y modelos para producir la epilepsia (Curia, 2008). El modelo consistió en una inyección intraperitoneal de cloruro de litio (3 mEq/kg, i.p.); 18 h después se administró una inyección subcutánea de escopolamina (1 mg/kg, s.c.), posteriormente (30 min después) se administró pilocarpina (60 mg/kg, s.c.) vía subcutánea para inducir SE. Los grupos AL y RA fueron inyectados con el vehículo (solución salina).

Los animales que presentaron SE recibieron una dosis de diazepam (5 mg/kg, i.m.) una hora después del comienzo del SE para parar las crisis. Posteriormente, se colocaron en un baño de hielo por un periodo de una hora. Por último, las ratas fueron trasladadas a una habitación con temperatura constante de 18 °C donde se mantuvieron por 3 h, 24 h y 48 h. Los animales fueron sacrificados por decapitación para obtener ambos hipocampos los cuales fueron colocados en tubos conteniendo el reactivo de TRIzol, se almacenaron a -70°C hasta su posterior utilización.

Aislamiento del RNA.

Los hipocampos fueron homogeneizados mediante un homogenizador OMNI y se agregó Trizol hasta obtener un volumen de 1 mL. A cada tubo se añadió 0.2 mL de cloroformo y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos, se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se lavaron con 500 µl de alcohol isopropílico. Se agitaron vigorosamente y se guardaron a -20 °C por una noche para precipitar el RNA. Al día siguiente se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 1mL de etanol al 75% v/v. Se centrifugó nuevamente 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 libre con RNAsas.

Una vez realizada la extracción del RNA de las muestras, se revisó la integridad del mismo mediante un gel de agarosa al 1% teñido con el colorante RelGel (Biotium) observando la integridad de dos bandas definidas que corresponden al ARN ribosomal de 28 y 18 unidades Svedberg.

Partiendo de la muestra obtenida en la extracción de RNA, se procedió a tratar las muestras con DNAsas para evitar contaminación por DNA genómico utilizando un kit de Ambion. Para este procedimiento, se agregó amortiguador en la siguiente proporción: 1 µL de amortiguador por cada 10 µL de muestra además de 1 µL 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 µL.

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. Una vez cuantificada la cantidad de RNA presente, se realizaron los cálculos necesarios para tener aproximadamente 5 µg de RNA total.

La síntesis del DNA complementario (cDNA) se realizó con base en las indicaciones del kit ReverAid First Strand cDNA synthesis y protocolo de Thermo scientific.

En un tubo libre de nucleasas se agregó 2 μL de RNA total, posteriormente se colocó 1 μL del primer (Random Hexamer Primer), la mezcla se llevó a 12 μL con agua libre de nucleasas. Enseguida la mezcla se incubó a 65°C por 5 minutos y se agregaron los siguientes componentes: 4 μL de 5X Reaction Buffer, 1 μL de RiboLock RNase Inhibitor, 2 μL de 10 mM dNTP Mix y 1 μL de RevertAid M-MuLV RT. La muestra se mezcló y se centrifugó, posteriormente se dejó en incubación por 5 minutos a 25°C seguido de 42°C por 60 minutos. La reacción de síntesis se finalizó en el termociclador Techne TC-512 a 70°C por 5 minutos.

Cuantificación de la expresión de los genes mediante PCR.

Para la evaluación de la expresión de los genes, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real. Se utilizó 1 μg de RNA para sintetizar el DNA complementario utilizando el kit ReverAid First Strand cDNA synthesis (Thermo Scientific)

Se obtuvieron las sondas comerciales TaqMan® Gene Expression Assay en Thermo Scientific. para la cuantificación de la expresión génica de REST (Rn01413148_m1), CoREST 1 (Rn01429779_m1), CoREST 2 (Rn01454662_g1), CoREST 3 (Rn01411929_m1), HDAC 1 (Rn01519308_g1) y HDAC 2 (Rn01193634_g1). En la cuantificación se utilizó el sistema de detección Eco Real (Illumina). La normalización de los datos se basó en la cuantificación de utilizando el gen beta actina (ACTB) como gene constitutivo.

De cada muestra se tomó 100 ng de cDNA llevándose a un volumen final de 10 μl conteniendo 5 μl Taqman Gene Expression Master mix (2X) (Thermo Scientific), 1 μl de templado cDNA, 1 μl de Taqman Probe 3 μl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de los ciclos fueron 2 min a 50°C para optimizar la actividad de la enzima UDG, 10 min a 95°C para activar la enzima Taq polimerasa, seguido por 40 ciclos de amplificación consistiendo cada uno: 15 s a 95°C para desnaturalizar el

DNA, 30 s a 60°C para alinear/extender el templado. Asimismo se realizó un control negativo.

Los resultados del ciclo umbral (CT) de los valores de los genes estudiados y del control de normalización se analizaron mediante el software DataAssist (Applied Biosystems) para calcular la concentración de las muestras extrapolando el valor de CT con la curva estándar (Pfaffl *et al.*, 2002).

Análisis estadístico.

Una vez teniendo la cuantificación relativa de los genes, los datos obtenidos se graficaron para observar la expresión de los genes y se analizaron con ayuda del programa GraphPad Prism, se utilizaron las pruebas estadísticas de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos (α 0.05). Para determinar si alguna de las diferencias entre medias es estadísticamente significativa, se utilizó la prueba de ANOVA de un factor. Para valores paramétricos las comparaciones entre grupos se realizó una ANOVA y una prueba de Tukey y para valores no paramétricos se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y una prueba de Dunns.

RESULTADOS

Medición del peso corporal y tiempo de latencia a la primera crisis.

Para determinar si el tratamiento de restricción alimentaria presentaba cambios en el peso corporal, se graficaron los pesos registrados de los animales un día antes del tratamiento y antes de la inyección con litio-pilocarpina. En la figura 6 se puede observar que los animales con alimentación *Ad Libitum* (AL) presentaron incremento significativo del peso corporal ($p > 0.0001$; prueba t test). Los animales con restricción alimentaria en los primeros días disminuyen su peso de manera significativa (datos no mostrados) y al transcurrir los días los animales con RA recuperan su peso hasta alcanzar su peso inicial (fig. 6), observándose ambas barras de la gráfica casi iguales. Por otra parte, en la figura 7 se muestran los datos del peso inicial de las ratas, se separaron los individuos aleatoriamente en régimen AL y RA. Al final del tratamiento los datos entre AL y RA muestran diferencia significativa de peso, las ratas con acceso libre al alimento tienen un peso de 327 g en promedio, más elevado que las ratas con RA que presentaron un promedio de 233.4 g.

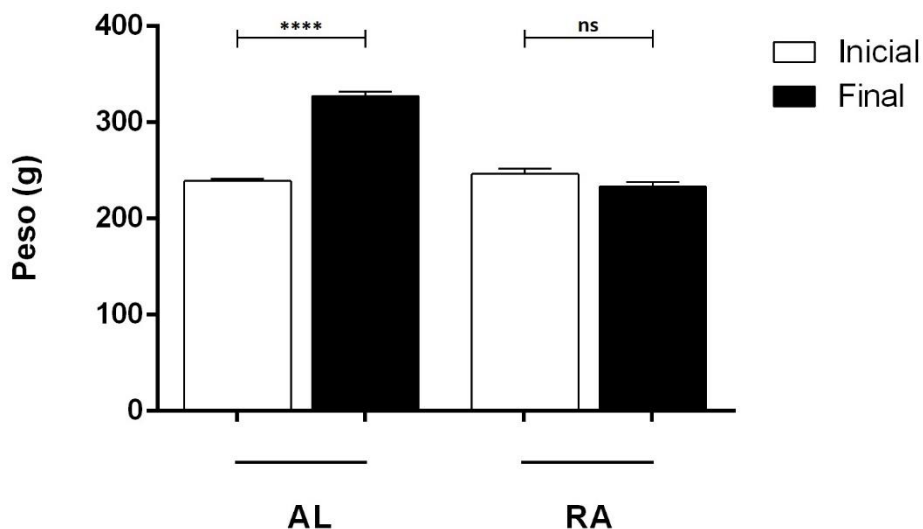


Figura 6. Peso corporal de los animales con el tratamiento de restricción alimentaria. Al final del tratamiento con restricción alimentaria se observó que el peso de los animales disminuye en comparación con el grupo *Ad Libitum* (AL). Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba unpaired t test ($n=15$; **** $p < 0.0001$; ns= no significativo).

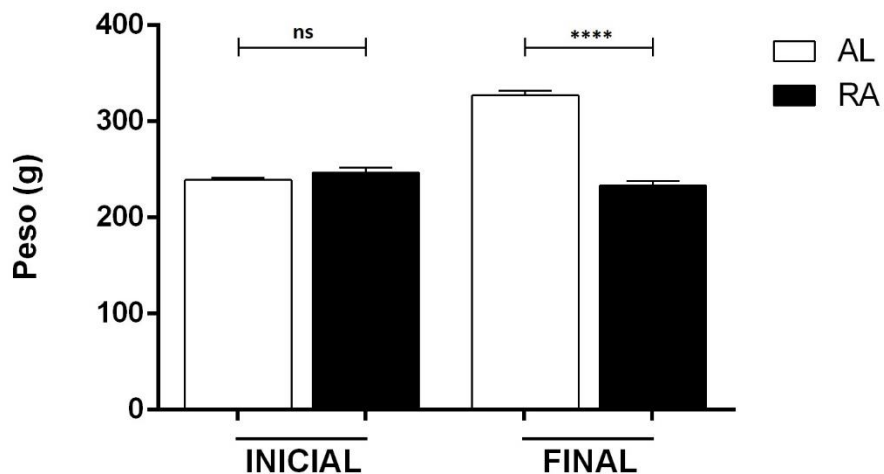


Figura 7. Peso corporal de los animales al inicio y final del tratamiento de restricción alimentaria. Los animales con alimento *ad libitum* (AL) en comparación con el grupo de restricción alimentaria (RA) muestran aumento significativo del peso al final del régimen. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba unpaired t test (n=15; ****p<0.0001; ns= no significativo).

Después de la inyección con pilocarpina para inducir el SE, se registró el tiempo de latencia antes de la primera crisis. Como se observa en la figura 8, existe incremento significativo en el tiempo de latencia a la primera crisis en los animales que fueron sujetos a la restricción alimentaria en comparación con los animales que tuvieron libre acceso a comida (AL).

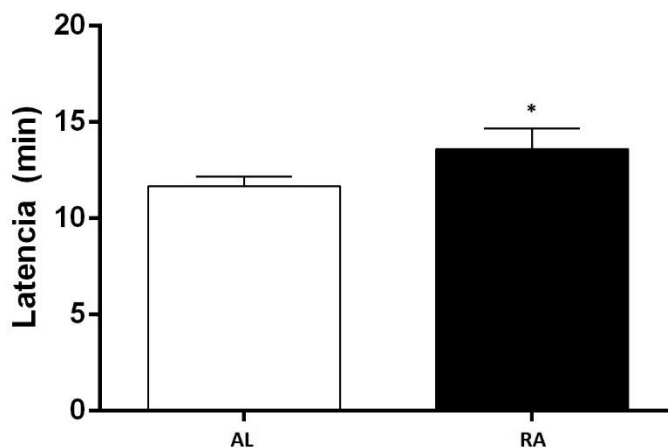


Figura 8. La restricción alimentaria aumenta el período de latencia antes de la primera convulsión. Los animales con el tratamiento de restricción alimentaria presentan una mayor latencia a la primera convulsión. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba t-test (n=15; *p<0.03).

Efecto de la restricción alimentaria en la expresión génica de NRSF/REST, CoREST (1, 2 y 3) y HDACs (1 y 2).

Con el fin de obtener resultados que nos permitieran observar cambios más sutiles en los niveles de expresión génica de NRSF/REST, CoREST (1, 2 y 3) y HDAC (1 y 2), se realizó la cuantificación relativa mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se utilizó como gen de referencia ACTB.

Para comprobar si la RA *per se* podría tener un cambio en la expresión génica de los genes estudiados; se comparó el promedio de la expresión relativa de los genes blanco con alimentación *ad libitum* (AL) y restricción alimentaria (RA) (Figura 9). La primera columna de cada gen (blanco) indica el promedio con el tratamiento AL y la segunda columna (negro) indica el tratamiento con restricción alimentaria. La cuantificación relativa se realizó 24 horas después de la inyección con solución salina. De manera general el promedio de la expresión relativa en el tratamiento de AL se mantiene en los genes y con el régimen de RA se observa un aumento del promedio de la expresión relativa (Figura 9). En el caso de CoREST 3 el promedio de la expresión disminuye ligeramente con el tratamiento de RA.

En la figura 9 se observan los promedios de la expresión relativa. Para el gen NRSF/REST, el promedio de la expresión relativa en el grupo AL fue de 1.028 y con RA aumentó el promedio de la expresión a 1.125. Con alimentación AL el promedio de la expresión relativa de CoREST 1 fue de 1.037 y con RA aumento a 1.377. En el caso de CoREST 2 con tratamiento AL fue 1.026 y con tratamiento RA fue 1.132. Para HDAC 1 y 2 los grupos control fueron de 1.083 y 1.075 y con RA fue de 1.259 y 1.620 respectivamente. A diferencia de los demás genes, CoREST 3 con alimentación AL el promedio de expresión fue de 1.043 y hay una mínima disminución con el tratamiento de RA a 0.7809.

Estos resultados apuntan que no existe diferencia significativa entre la dieta restrictiva (RA) y la condición de libre acceso a la comida (AL) ($n= 5$; $\alpha= 0.05$.) para estos genes cuantificados. Por lo anterior se utilizó como control la expresión del grupo AL para comparar los diferentes tiempos post *SE*. Los datos de la figura 9 se

expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba de t test ($n= 5$; $\alpha= 0.05$, diferencia no significativa).

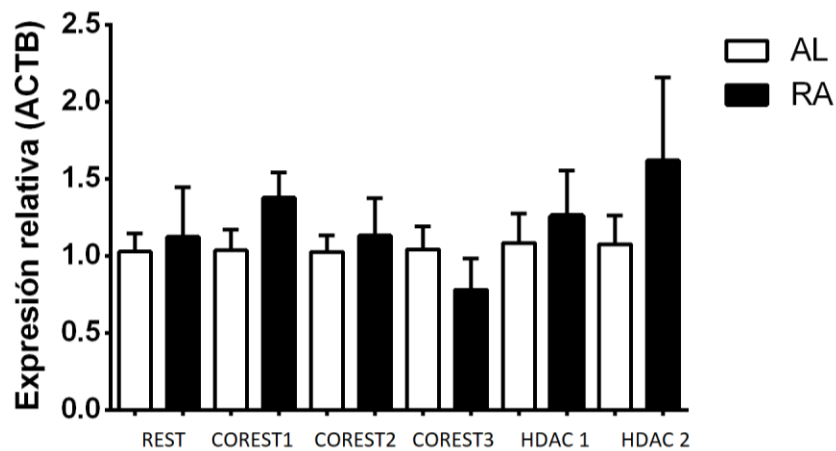


Figura 9. Expresión relativa de los genes blanco con alimentación Ad Libitum (AL) y restricción alimentaria (RA). Se observa que aumenta la expresión de los genes con el tratamiento de RA, en el caso del gen CoREST 3 con RA la expresión disminuye. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba de t test ($n= 5$; $\alpha= 0.05$, diferencia no significativa).

A continuación, los datos indican el resultado del comportamiento de los genes a los diferentes tiempos de estudio (3 h, 24 h y 48 h) después de la inducción al estado epiléptico (SE) con alimentación ad libitum (ALSE) y restricción alimentaria (RASE). Todos los datos se normalizaron con el gen ACTB y al control no se le indujo el estado epiléptico para poder observar las concentraciones de la expresión relativa del gen en condiciones normales.

En la figura 10 se presenta un gráfico de barras en el que se compara el promedio de la expresión relativa de NRSF/REST en hipocampo de ratas, con el tratamiento de la dieta restrictiva (RASE) y con el libre acceso a comida (ALSE), con la posterior inducción del estado epiléptico. En el gráfico puede observarse que hay una expresión relativa aumentada significativamente en el tratamiento RASE a las 3 horas después del SE (1.910) con respecto al control (1.028). El grupo ALSE a las 3 horas al igual que RASE es mayor que el control y presenta diferencia significativa (2.000). 24 horas después del SE el grupo ALSE presenta aumento significativo en el promedio de la expresión de NRSF/REST (2.276), el grupo RASE a pesar de tener un promedio ligeramente superior al grupo control es menor que ALSE (1.472).

De manera general en la figura 10 se observa un incremento de la expresión del gen a las 3 horas en ambos grupos y posteriormente a mayor tiempo posterior al SE la expresión relativa de NRSF/REST disminuye, en ambos grupos de estudio ALSE y RASE. A las 48 horas prácticamente ambos grupos alcanzan niveles de expresión muy similares al grupo control y sus promedios no son significativos, el grupo de RASE presenta un promedio de 1.394 y el grupo ALSE 1.338.

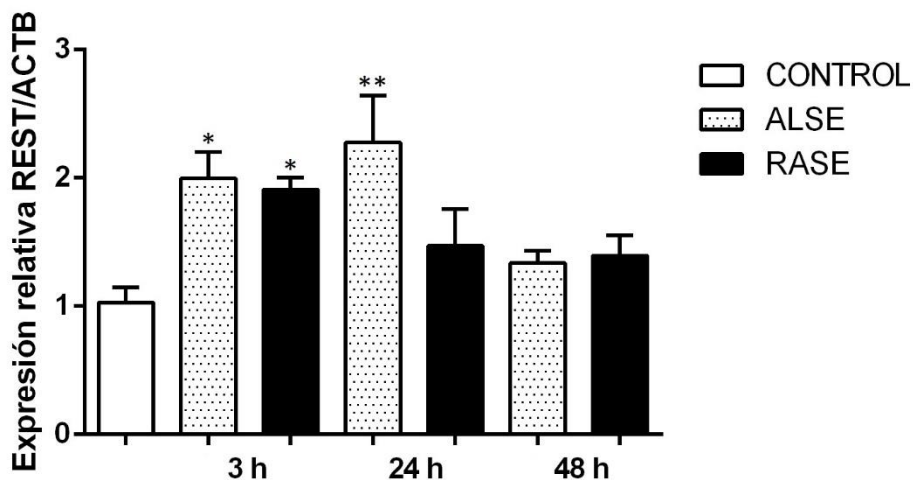


Figura 10. Expresión relativa de REST con alimentación Ad Libitum (ALSE) y restricción alimentaria (RASE) 3, 24 y 48 horas post SE. Se observa de forma general que aumenta la expresión de los genes con el SE y la expresión disminuye conforme aumenta el tiempo de exposición al SE. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba ANOVA ($f=4.296$, $**p=0.0034$, $r^2=0.4793$) $n=5$; comparación múltiple prueba de Dunnett's $*p<0.05$.

En la figura 11 se presenta la expresión relativa del gen CoREST 1. A las tres horas se observa un incremento significativo al triple de la expresión relativa del gen en el grupo ALSE (3.158), el grupo RASE también muestra significancia en sus datos pero su promedio disminuye (2.356), ambos grupos superan la expresión del control (1.037). A las 24 horas la expresión de ambos grupos disminuye con respecto a las 3 horas, el grupo ALSE presenta un promedio de 2.474, siendo significativo mientras que RASE su promedio es menor y no es significativo (1.571). Por último, la expresión de CoREST 1 a las 48 horas después de la inducción del SE es menor en ambos grupos estando por debajo del control. ALSE tiene un promedio de expresión mayor (0.8985) que RASE (0.5156), ambos resultados no son significativos. Prueba ANOVA ($f=9.316$, $***p<0.0001$, $r^2=0.6663$) $n=5$; comparación múltiple prueba de Dunnett's $*p<0.05$.

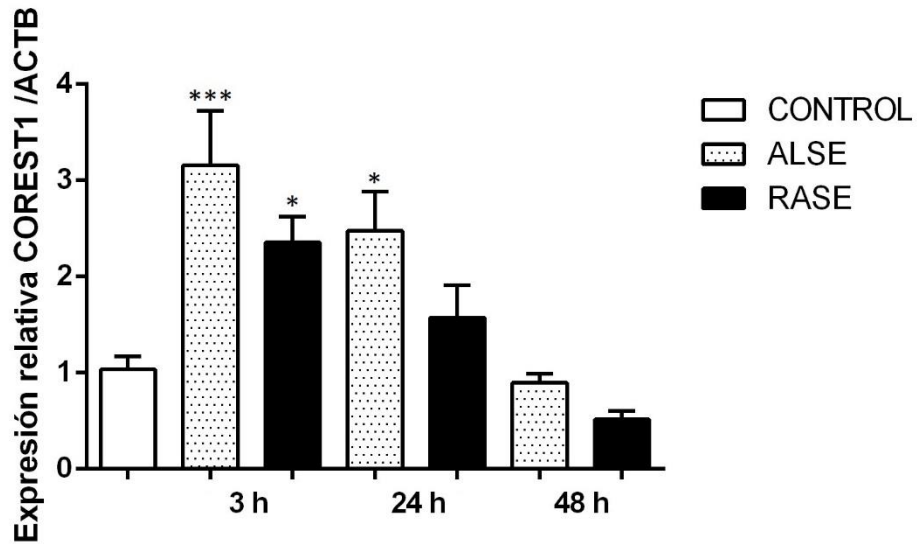


Figura 11. Expresión relativa de CoREST1 con alimentación Ad Libitum (ALSE) y con tratamiento de restricción alimentaria (RASE) 3, 24 y 48 horas post SE. Se observa que la expresión se triplica a las 3 h en el grupo ALSE y disminuye a las 24 h y a las 48 h. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. La expresión de los grupos RASE es muy similar a su homólogo ALSE sin embargo su expresión es menor. Prueba ANOVA ($f=9.316$, $***p<0.0001$, $r^2=0.6663$) $n=5$; comparación múltiple prueba de Dunnett's $*p<0.05$.

Para observar si las variantes de CoREST presentaban el mismo patrón, se cuantificó la expresión relativa de CoREST 2 y 3.

La expresión relativa de CoREST 2 se muestra en la figura 12. De manera general la expresión relativa de todos los grupos de estudio es menor al grupo control (1.026). Tres horas después de la inducción del SE la expresión relativa de ambos grupos disminuye significativamente y se observa que el grupo ALSE (0.5201) es menor al grupo RASE (0.5802). A las 24 horas el grupo ALSE (0.9562) es el que presenta mayor expresión génica comparada con los otros tiempos estudiados; sin embargo, es menor al grupo control (1.026) y este resultado no es significativo. RASE (0.3457) a las 24 horas muestra una diferencia significativa ($*p<0.05$) respecto al control y es el grupo que posee menor expresión relativa de CoREST 2. 48 horas después de haber inducido el SE la expresión del grupo ALSE (0.5476) es mayor al grupo RASE (0.4498) ambos presentan diferencia significativa. A pesar de ello, ambos grupos tienen expresión menor al grupo control.

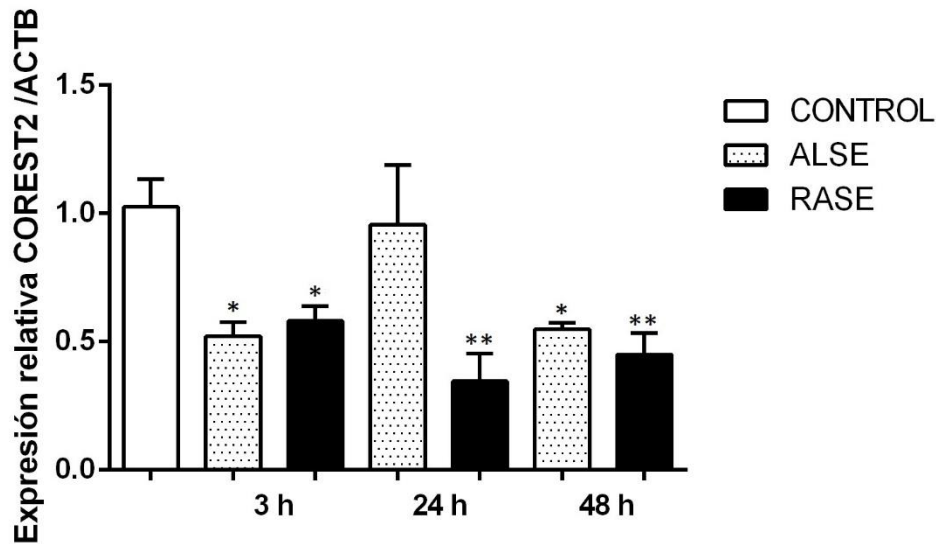


Figura 12. Expresión relativa de CoREST2 con alimentación Ad Libitum (ALSE) y con restricción alimentaria (RASE) 3, 24 y 48 horas post SE. A los tres tiempos se muestran diferencias significativas siendo menor la expresión del gen CoREST2. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba de ANOVA ($f=5.043$, $**p=0.0013$, $r^2=0.5194$) $n=5$; comparación múltiple prueba de Dunnett's $*p<0.05$.

La variante tres de CoREST se muestra en la figura 13. Al igual que la expresión de CoREST2; los grupos ALSE y RASE de los tres tiempos presentaron menor expresión del gen CoREST3 en comparación con el control (1.043). A las 3 h de la inducción al SE la expresión del gen disminuyó significativamente a la mitad en ambos grupos siendo un poco menor el grupo RASE (0.4473) con el grupo ALSE (0.5032). 24 h después del SE aumentó la expresión del gen en ambos grupos solo ALSE (0.9467) tiene un promedio mayor sin ser significativo y RASE (0.6612) tiene menor expresión y es significativo. En el último tiempo ambos grupos disminuyen la expresión del gen significativamente. Siendo ALSE (0.3622) ligeramente superior en la expresión de CoREST3 a RASE (0.3312). Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba de ANOVA ($f= 8.225$, $****p= < 0.0001$ $r^2= 0.6380$) $n=5$; comparación múltiple prueba de Dunnett's $*p<0.05$.

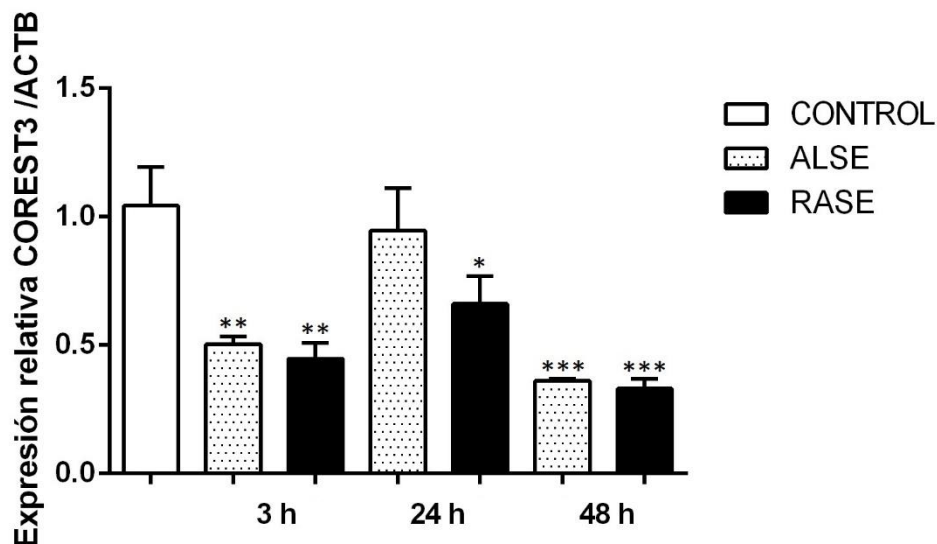


Figura 13. Expresión relativa de CoREST3 con alimentación Ad Libitum (ALSE) y restricción alimentaria (RASE) a las 3, 24 y 48 horas post SE. A las 3 h de la inducción al SE la expresión de CoREST3 disminuye a la mitad en ambos grupos (ALSE y RASE). 24 h después aumenta la expresión en ese tiempo solo hay diferencia significativa en el grupo RASE. Finalmente a las 48 h ambos grupos disminuyen la expresión del gen significativamente. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba de ANOVA ($f = 8.225$, $****p < 0.0001$ $r^2 = 0.6380$) $n=5$; comparación múltiple prueba de Dunnett's $*p < 0.05$.

Finalmente, para conocer un poco más el comportamiento de los genes involucrados en el complejo represor de REST/NRSF se analizaron las dos variantes de HDAC en la expresión génica relativa con el SE y con los dos tipos de alimentación. Las dos variantes de HDAC que se estudiaron presentaron un comportamiento similar entre ambos genes.

En la figura 14 se presenta la expresión relativa del gen HDAC1; a las tres horas después de la inducción al SE el grupo con alimentación *ad libitum* ALSE (0.7703) fue el que presentó menor expresión del gen, seguido de los animales sometidos a restricción RASE (0.8069), en los dos grupos la expresión del gen es menor respecto al grupo control (1.083). 24 horas después del SE, aumenta significativamente la expresión de HDAC1 en ALSE (1.754). RASE (1.084) 24 después de la inducción al SE aumenta ligeramente con respecto al control sin embargo es menor a ALSE y el promedio no es significativo. A las 48 horas disminuye la expresión del gen en el grupo ALSE (0.9594) y RASE (0.9072). No obstante, la expresión génica de ambos grupos a las 48 horas es ligeramente menor

al grupo control, pero es mayor que la expresión observada en ambos grupos a las 3 horas. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba de ANOVA ($f= 5.328$, $***p= 0.0009$, $r^2= 0.5331$) $n=5$; comparación múltiple prueba de Dunnett's $*p<0.05$.

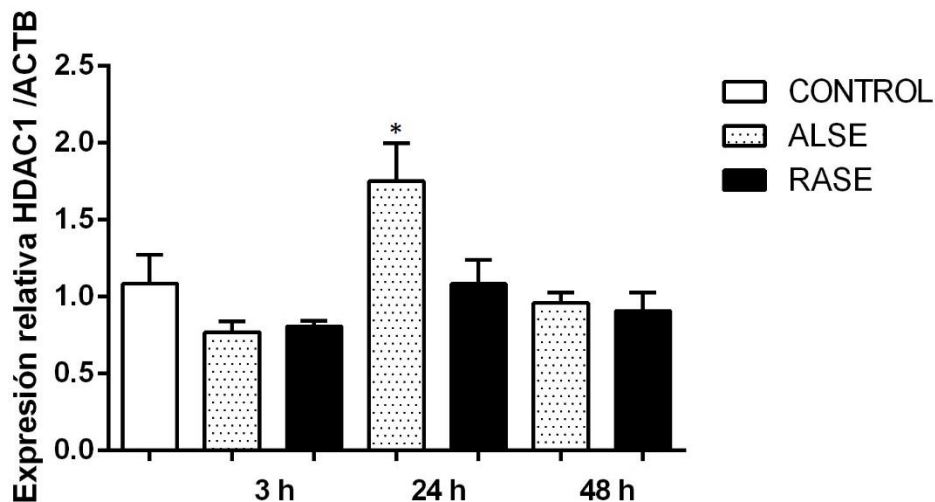


Figura 14. Expresión relativa de HDAC1 con alimentación Ad Libitum (ALSE) y restricción alimentaria (RASE) a las 3, 24 y 48 horas post SE. En los tres tiempos ambos grupos disminuyen un poco su expresión sin embargo no es significativa a diferencia del grupo ALSE a las 24 h que la expresión del gen aumento, la cual muestra significancia. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba de ANOVA ($f= 5.328$, $***p= 0.0009$, $r^2= 0.5331$) $n=5$; comparación múltiple prueba de Dunnett's $*p<0.05$.

El comportamiento en la expresión relativa del gen HDAC 2 es muy similar a la variante 1. En la figura 15 se observa que la menor expresión de HDAC2 es en el tratamiento ALSE a las 3 horas (0.5543), en ese mismo tiempo la expresión de HDAC 2 en el grupo RASE es mayor (0.7915); aunque sin una diferencia significativa, ambos grupos presentan expresión relativa inferior al grupo control (1.075). Contrariamente el grupo que presentó mayor expresión del gen superando incluso al grupo control fue el grupo ALSE a las 24 horas (1.984), mostrando diferencia significativa. En ese mismo tiempo el grupo RASE (1.059) tuvo una expresión ligeramente menor comparado con el grupo ALSE y el control. Finalmente, la expresión relativa de HDAC 2 a las 48 horas después de inducir el SE en ambos grupos ALSE (0.7280) y RASE (0.6317), la expresión es menor al

grupo control (Prueba de ANOVA ($f= 6.326$, $***p= 0.0003$, $r^2= 0.5755$) $n=5$; comparación múltiple prueba de Dunnett's $*p<0.05$).

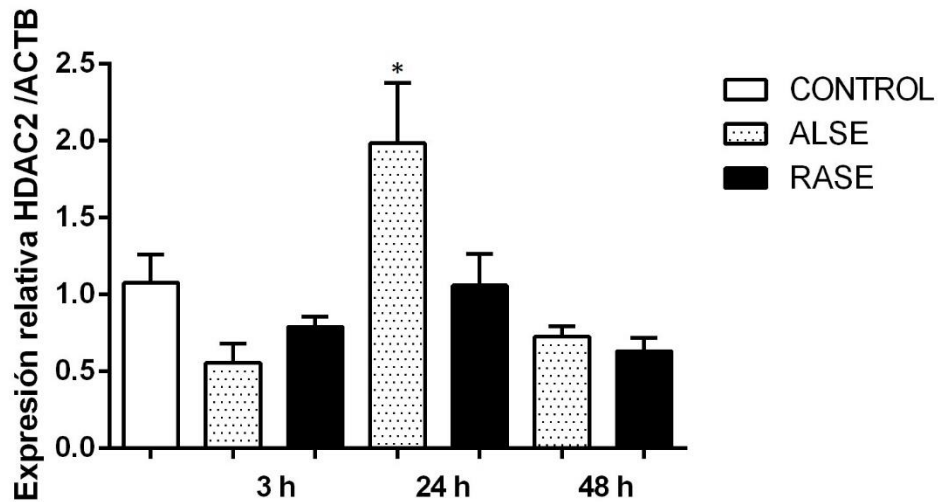


Figura 15. Expresión relativa de HDAC2 con alimentación Ad Libitum (ALSE) y con restricción alimentaria (RASE) a las 3, 24 y 48 horas post SE. La expresión del gen en el grupo ALSE a las 24 h es casi al doble que el control, mostrando diferencia significativa, la expresión de RASE se mantiene de manera similar al control. En los demás tiempos la expresión disminuye sin mostrar diferencia significativa. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. Prueba de ANOVA ($f= 6.326$, $***p= 0.0003$, $r^2= 0.5755$) $n=5$; comparación múltiple prueba de Dunnett's $*p<0.05$.

DISCUSIÓN

Los tratamientos dietéticos se han utilizado desde la antigüedad para el tratamiento de la epilepsia. Estas terapias metabólicas han surgido como alternativa para disminuir las convulsiones en pacientes con epilepsia refractaria (Hartman *et al.*, 2013). A la fecha, poco se sabe acerca del efecto de la restricción alimentaria en la expresión génica involucrada en este trastorno. Al respecto se ha reportado que, la restricción alimentaria puede producir modificaciones epigenéticas en la H3 en dos residuos de lisina (9 y 14), estas marcas epigenéticas están relacionadas con activación de transcripción génica (Landgrave *et al.*, 2016).

En el tratamiento con dietas restrictivas, se ha reportado de manera constante la pérdida inicial de peso corporal que se ve compensada o no a lo largo del tratamiento, dependiendo de la dieta. El manejo y disposición de la glucosa parece ser un factor importante en la conservación o la ganancia de peso. En el caso de la restricción alimentaria, la reducción del peso corporal ha sido previamente descrita (Landgrave *et al.*, 2016), en donde se observó que a los dos días de tratamiento de restricción alimentaria los animales presentaron reducción significativa de peso comparado con ratas alimentadas libremente. Esta reducción está asociada a la disminución drástica en la ingesta de comida; sin embargo, al transcurrir los días los animales aumentan el consumo de alimento y el peso corporal se reestablece. Resultados similares se observaron en una dieta cetogénica realizada por cuatro semanas en ratas jóvenes y adultas donde hay pérdida significativa de peso corporal (Michael *et al.*, 2017) sugiriendo que ambas dietas tienen efectos similares en cuanto a la pérdida inicial de peso.

Después de la inyección con pilocarpina se observó que existe incremento significativo en el tiempo de latencia a la primera crisis en los animales que fueron sujetos a restricción alimentaria en comparación con los animales que tuvieron libre acceso a comida (AL). Estos resultados se han descrito previamente demostrando que la restricción alimentaria puede tener un efecto anticonvulsivante observado mediante una latencia prolongada a la primera crisis (Landgrave *et al.*, 2016). En

este sentido animales sometidos a una dieta de ayuno intermitente presentaron una incidencia significativamente menor a la inducción del SE y una duración significativamente mayor del período de latencia a las crisis espontáneas que el grupo alimentado libremente (Parinejad *et al.*, 2009). Ambas dietas presentaron efectos positivos en cuanto a la evaluación de las crisis por la escala de Racine.

Efecto de la restricción alimentaria en la expresión génica.

Con el objetivo de observar de manera general el efecto de la dieta de restricción alimentaria sobre la expresión génica de NRSF/REST, COREST y HDAC'S; se comparó el promedio de la expresión relativa de los genes blanco con alimentación Ad Libitum (AL) contra la restricción alimentaria (RA), sin inducción del SE. De manera general se observa un incremento discreto no significativo, de la expresión de NRSF/REST, COREST1, COREST2, HDAC1 Y HDAC2 en el grupo con RA; sin embargo, los cambios en la expresión génica de COREST3, a diferencia del resto de los genes estudiados, con la RA disminuye la expresión con respecto al grupo AL, sin una diferencia estadísticamente significativa. De la misma manera un grupo de investigación sugiere que la alimentación con CR induce cambios en la expresión génica. Notaron que se vieron alterados una gran cantidad de reguladores epigenéticos (Wood *et al.*, 2015) incluidos genes involucrados en la desacetilación de histonas (HDAC's) así como en la homeostasis del acetil transferasa de histonas (HTA's).

REST

NRSF/REST es un factor de transcripción conocido por su papel en la diferenciación neuronal, su función en el cerebro maduro se ha observado muy poco (Korosi *et al.*, 2010; McClelland *et al.*, 2011). Recientemente se propuso a NRSF/REST como protector en el envejecimiento y la demencia (Lu *et al.*, 2014). Además, REST puede estar involucrado en trastornos neurológicos como las convulsiones generadas por eventos isquémicos (Calderone *et al.*, 2003; Kaneko *et al.*, 2014). La contribución de NRSF/REST en la epilepsia y en su desarrollo (epileptogénesis) es actualmente constante foco de estudio (Roopra *et al.*, 2012)

En el trabajo que aquí se presenta se observa la expresión génica de NRSF/REST después de la inducción al SE en condiciones AL y RA; en donde la expresión aumenta en los grupos ALSE de los diferentes tiempos. Campestrini y sus colaboradores en el 2017 vieron que la expresión de RNAm de NRSF/REST aumenta significativamente en el hipocampo de ratas cuando tienen una actividad física y en edad adulta. Estos resultados se deben, probablemente a que NRSF/REST tiene un papel fundamental en la neuroplasticidad del hipocampo en animales de edad avanzada.

A pesar de conocer que la expresión génica de NRSF/REST aumenta en los grupos ALSE se desconoce si la expresión proteica aumenta en este grupo. Sin embargo, en un estudio con ratas jóvenes se mostró un aumento significativo de la proteína NRSF/REST después de inducción de crisis febriles a los 2 días y se mantiene hasta los 19 días, teniendo una disminución de la proteína hasta el día 60. NRSF/REST se considera como un potente mediador de defectos inducidos por convulsiones en la red del giro dentado, que es crucial para controlar el flujo de información al hipocampo. También se observó que la estructura y función de NRSF/REST es importante en los problemas de memoria duraderos provocados por las convulsiones febriles (Patterson *et al.*, 2017)

En otro estudio se observó que después del SE (McClelland *et al.*, 2011, 2014) los niveles de RNAm y proteína de NRSF/REST aumentaban. En los resultados aquí presentados se observa que a las tres horas de inducción el SE aumentan los niveles de NRSF/REST siendo este tiempo evaluado, el más elevado. Este resultado se compara con otros reportes previamente publicados; en los cuales se observó que la inducción de la epilepsia en el hipocampo incrementó los niveles de NRSF/REST (Palm *et al.*, 1998; Roopra *et al.*, 2001; Garriga-Canut *et al.*, 2006; McClelland *et al.*, 2011, 2014).

En este trabajo se observa disminución de NRSF/REST conforme aumenta la latencia. Esto ocurre ya que los niveles de NRSF/REST pueden oscilar después de una crisis o de convulsiones espontáneas durante las fases latentes y activas de la epilepsia. Cuando sucede este proceso NRSF/REST puede no ser necesario para

la represión persistente de genes blanco. Los cambios epigenéticos de la cromatina mediados por NRSF/REST, consisten en cambios en la metilación de las histonas conduciendo a una represión duradera que puede que ya no requiera la presencia de REST (McClelland *et al.*, 2011).

Garriga Canut y colaboradores en 2006 investigaron el efecto del inhibidor glicolítico 2 deoxy-D-glucosa (2DG) en un modelo de epilepsia del lóbulo temporal. La inhibición glicolítica resulta en el aumento del reclutamiento del correpresor CtBP a los sitios de unión de NRSF/REST. Además, la interacción de NRSF/REST con CtBP es sensible a NADH una propiedad que contribuye a la regulación metabólica de la expresión génica neuronal involucrados en la epilepsia. La inhibición glicolítica perjudica la epileptogénesis, reprime los objetivos de NRSF/REST. Sus resultados muestran que la represión mediada por NRSF/REST es bajo control metabólico y son consistentes con la hipótesis de que NRSF/REST media los efectos represivos de 2DG en la expresión del hipocampo de BDNF y TrkB *in vivo*. La acción terapéutica de la dieta cetogénica y en este caso la restricción alimentaria como tratamiento para la epilepsia puede deberse en parte a la regulación metabólica de la función NRSF/REST relacionada con una disposición limitada de la glucosa.

Los estudios sobre NRSF/REST y sus complejos correpresores han proporcionado nuevas ideas sustanciales sobre las interacciones funcionales entre complejos. Los estudios de NRSF/REST han sido particularmente informativos; debido a, la capacidad de esta proteína para reclutar dos complejos a través de dominios individuales (Ooi y Wood, 2007). Aunque se ha observado la contribución de NRSF/REST en la epilepsia, se conoce muy poco acerca de la función de las variantes de su complejo represor CoREST en este trastorno a continuación, discutiremos sobre el tema.

Diferentes estudios han comenzado a caracterizar los roles específicos que desempeñan los complejos NRSF/REST y CoREST durante la especialización y diferenciación neuronal. Por ejemplo, se ha reportado que REST y CoREST regulan la expresión de genes diana en las neuronas posmitóticas (Ballas *et al.*, 2005). También se ha reportado la protección que desempeña CoREST en el cerebro de

modelos animales de edad avanzada; así como la relación de este complejo en la preservación de la función cognitiva y la longevidad en humanos (lu *et al.*, 2014).

CoREST está codificada por el gen *rcor1* y tiene 482 aminoácidos con una masa molecular de 66 kDa. Se han encontrado otros dos genes, *rcor2* y *rcor3*, con una fuerte homología con el gen CoREST, en humanos y en otras especies. En humanos, *rcor2* codifica CoREST2, una proteína de 523 aminoácidos, mientras que *rcor3* codifica CoREST3, una proteína con cuatro isoformas de 436, 449, 495 y 553 aminoácidos generados por un empalme alternativo (Barrios *et al.*, 2014).

Se ha observado que CoREST está presente en el cerebro, donde REST, en general, se expresa en niveles muy bajos. El patrón de expresión proteica más extendido de CoREST en animales adultos sugiere que, además de servir como un corepresor para NRSF/REST, CoREST también podría cumplir una función similar para otras proteínas de unión al ADN (Andrés *et al.*, 1999). En los resultados que aquí se muestran, se observa mayor expresión relativa del gen CoREST 1 en el grupo ALSE. El grupo RASE también muestra significancia en sus datos, pero su promedio disminuye esto puede deberse a una protección por parte de la dieta de restricción atenuando los cambios en la expresión del gen CoREST1. La expresión génica de CoREST 1 a las 48 horas después de la inducción del SE es menor en ambos grupos estando por debajo del control. Estos resultados nos muestran los cambios en la expresión del gen; sin embargo, se desconoce si hay cambios en los niveles de la proteína. De acuerdo con Saez y colaboradores en el 2015, CoREST 1 sufre una reducción importante en los niveles de proteína durante la diferenciación neuronal de células PC12 y en neuronas corticales maduras in vitro. Cabe mencionar que existe poca evidencia científica, que demuestra el rol de esta proteína en la epilepsia o en tratamientos dietéticos.

Durante los últimos años las evidencias muestran la importancia de CoREST 1, LSD 1 Y HDAC1/2 en la diferenciación neuronal. Pocos reportes muestran el rol de CoREST 2 y CoREST 3 en diferenciación neuronal (Saez *et al.*, 2015).

De acuerdo a la hipótesis propuesta, se esperaba que las variantes de CoREST tendrían una sobreexpresión. Sin embargo, de acuerdo con los resultados la

expresión relativa del gen CoREST 2 de todos los grupos de estudio fue menor al grupo control. Esto puede deberse a que CoREST 2 tiene menor represión transcripcional que CoREST 1 (Barrios *et al.*, 2014). En otro estudio se observó que la regulación negativa de Rcor2 (CoREST 2) puede provocar neuro inflamación, en modelos de envejecimiento; sugiriendo a Rcor2, como objetivo potencial para prevenir o tratar la inflamación crónica y neurodegeneración relacionadas con la edad avanzada (Álvarez *et al.*, 2014).

En un estudio publicado por Pilotto y colaboradores en 2015, estudiaron las propiedades de los componentes moleculares del complejo LSD1 CoREST y evaluaron la afinidad de unión de los péptidos de histona tanto al sitio activo de LSD1 como al ADN nucleosómico. Notaron que CoREST3 muestra menor capacidad represiva comparada con CoREST 1. Asimismo, CoREST3 junto con el dominio SANT2 no muestra actividad represiva. En nuestros resultados se observa que en los grupos ALSE y RASE la expresión de CoREST3 está a la baja, indicando una menor actividad represiva sobre el complejo; sin embargo, estos resultados no muestran si la proteína es funcional ya que solo se está observando la presencia del gen en la muestra.

En los resultados aquí expuestos se puede observar que la expresión del gen HDAC en el tratamiento RASE es menor que en los grupos sin SE; sin embargo, en ALSE la expresión génica es mayor, por lo que la dieta puede estar teniendo un probable efecto inhibitorio en HDAC's haciendo que esta enzima se reprima. Algunos medicamentos como el valproato son conocidos como inhibidores de HDACs. También se ha observado que el tratamiento con butirato puede retardar el progreso de la epileptogénesis a través de la inhibición de HDACs (Reddy *et al.*, 2018). El butirato es un producto del metabolismo de las grasas y se ha observado su incremento en las dietas cetogénicas, en restricción alimentaria, ayuno intermitente y en la restricción calórica. Sin embargo, en el presente trabajo solo se observó el comportamiento del gen HDAC's y su inhibición puede estar relacionada con la presencia del butirato, ahora se tendría que estudiar a detalle la proteína comprobar

si efectivamente está quitando acetilaciones a las histonas y cuáles son los efectos en la progresión de la epilepsia.

CONCLUSIÓN

- De acuerdo a los resultados obtenidos, en el modelo de crisis agudas hay desregulación de la expresión génica del complejo NRSF/REST, CoREST y HDAC's y la restricción alimentaria *per se* disminuyó la expresión génica de REST y CoREST1, sin un impacto significativo en los genes CoREST 2, CoREST3 y HDAC's; por lo que concluimos que no todo el complejo se comporta de forma uniforme y se sabe que la expresión de cada factor está determinada por ciertas afinidades entre ellos.
- A pesar de que los genes estudiados forman parte de un mismo complejo cada uno mostró una expresión génica distinta en ambos tratamientos (ALSE y RASE) y en los diferentes tiempos. Se sugiere estudiar la expresión proteica y comprobar si las proteínas son funcionales y su impacto en el desarrollo y progresión de la epilepsia.

APÉNDICE

Procedimiento para extracción de ARN

Reactivos
TRizol Reagent
Cloroformo puro
Isopropanol puro
Etanol 75%
H ₂ O + DEPC

Las muestras de hipocampos se dejan con 500µl de TRizol y se homogenizan.

Fase de separación

- Agregar 0.2 ml de cloroformo por 1 ml de TRizol.
- Agitar vigorosamente por 15 seg.
- Incubar por 2-3 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12,000 xg por 15 min a 4°C.
- Remover la fase acuosa y se coloca en un nuevo tubo.

Precipitación del ARN

- Agregar 0.5 ml de isopropanol a la fase acuosa por 1ml de TRizol.
- Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12000 xg por 10 min a 4°C.

Lavado del ARN

- Remover el sobrenadante del tubo, dejando solo el pellet.
- Lavar el pellet, con 1ml de etanol por 1ml de TRizol.
- Agitar en vortex y centrifugar el tubo a 7500 xg por 5 min a 4°C y descartar fase acuosa.
- Repetir 2 veces.
- Dejar el pellet al aire por 5 a 10 min.

Resuspensión del ARN

- Resuspender el pellet del ARN con H₂O libre de RNA (10 µl por hipocampo) o 0.5% de solución SDS.
- Incubar a baño María a 55-60°C por 10-15 min.
- Incubar a -70°C.

Purificación de ARN (Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus w/ Zymo-Spin™ IICG Columns)

Reactivos
TRizol Reagent
Direct-zol™ RNA prelavado
DNase I
DNA Digestion Buffer
H₂O libre de DNA y RNA.
Etanol 95-100%

- Agregar 1 vol de etanol directamente a la muestra.
- Colocar la muestra a un tubo Zymo-Spin™ IICG Column y centrifugar a 12000 xg por 1 min.
- Transferir la columna a un nuevo tubo Zymo-Spin™ IICG Column.
- Agregar a 400 µl. Direct-zol RNA Pre wash al tubo y centrifugar a 12000 xg por 1min. Descartar la fase acuosa. Repetir.
- Agregar 700µl de RNA wash Buffer al tubo y centrifugar a 12000 xg por 1 min.
- Transferir a un nuevo tubo libre de ARN.
- Agregar 25 µl de agua libre de ADN y ARN directamente al tubo y centrifugar.
- Guardar a -70°C.

Remoción de ADN de la muestra de ARN (DNA-free™ Kit)

Reactivos
rDNase I
10X DNase I Buffer
DNase Inactivation Reagent
H₂O libre de nucleasas

- Agregar 1µl de 10X DNase I Buffer y 0.25µl de rDNase I al ARN y mezclar.
- Incubar a 37°C por 20-30 min en el termoblock.
- Agregar resuspension de DNase Inactivation Reagent (1µl por hipocampo) y mezclar.
- Incubar por 2 min a temperatura ambiente y mezclar ocasionalmente.
- Centrifugar a 12000 rpm por 1.5 min y transferir el ARN a un tubo limpio de ARN.

Retrotranscripción (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit).

Reactivos
ARN templado
Primer
H₂O libre de nucleasas
5x Reaction Buffer
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)
10 mM dNTP Mix
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)

- Agregar los reactivos de acuerdo con siguiente orden

- a) ARN templado: Total de ARN (0.1 ng - 5 µg), poly(A) mRNA (10 pg - 0.5 µg) o ARN específico (0.01 pg - 0.5 µg).
 - b) Primer: Oligo (dT)₁₈ primer (1µl), Random Hexamer primer (1 µl) o gene-specific primer (15-20 pmol).
 - c) Agua libre de nucleasas (aforar a 12 µl).
- Incubar 65°C por 5min.
 - Agregar 4 µl de 5X Reaction Buffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µl de 10 mM dNTP Mix y 1 µl de RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl)
 - Mezclar y centrifugar.
 - Para oligo(dT)₁₈ o primer de gene específico, incubar por 60 min a 42°C. Para random hexamer primed synthesis, incubar por 5 min at 25°C seguido de 60 min a 42°C. Note.
 - Terminar la reacción calentando a 70°C por 5 min.
 - Convertir las muestras de RNA a cDNA.

Gel de agarosa

Reactivos
Agarosa
Buffer TAE 1X
Gel RED
Blue juice
H ₂ O

- Agregar 0.5 g de agarosa más 50 ml de TAE. Disolver y calentar.
- Agregar 8 µl de intercalante de ácidos nucleicos (gel RED).
- En la cámara de flujo colocar la mezcla y el peine. Esperar a que se polimerice.
- Retirar el peine y colocar cámara de flujo en la cámara externa y agregar TAE hasta cubrir.

- En cada carril se agregar 1 μl de muestra, 1 μl de Blue juice y 8 μl de H_2O .
- Correr el gel de 45 min a 1 hora a 100V.
- Revelar el gel en un transiluminador.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez L. M., Molina M. P., Castro F. M., Cosín T. M., Cristòfol R., Párrizas M., Escorihuela R. M., Pallàs M., Sanfeliu C., Kaliman P. 2014. Rcor2 underexpression in senescent mice: a target for inflammaging? *J Neuroinflammation.*; 11: 126.

Andrés M., Burger C., Peral-Rubio M., Battaglioli E., Anderson M, Grimes J., Dallman J, Ballas N, Mandel G. 1999. CoREST: A functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 9873–9878,

Armeno M., Caraballo R., Vaccarezza M., Alberti M.J., Ríos V., Galicchio S., Grandis E.S., Mestre G., Escobal N., Matarrese P., Viollaz R., Agostinho A., Díez C., Cresta A., Cabrera A., Blanco V., Ferrero H., Gambarini V., Sosa P., Bouquet C., Caramuta L., Guisande S., Gamboni B., Hassan A., Pesce L., Argumedo L., Dlugoszewski C., DeMartini M.G., Panico L. 2014. Consenso nacional sobre dieta cetogénica. *Revista de Neurología.* 59: 213-23.

Auvergne R., Leré C., El Bahh B., Arthaud S., Lespinet V., Rougier A., Le Gal La Salle G., 2002. Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment. *Brain research.* 954 (2): 277-285.

Baldelli P y Meldolesi J. 2015. The transcription repressor REST in Adult Neurons: Physiology, Pathology, and Diseases. *eNeuro.* 2 (4).

Ballas N, Grunseich C, Lu DD, Speh JC, Mandel G. 2005. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell;* 121(4):645-657.

Ballas N, Battaglioli E, Atouf F, Andres ME, Chenoweth J, Anderson ME, Burger C, Moniwa M, Davie JR, Bowers WJ. 2001. Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron* 31: 353-365.

Barrios AP, Gomez AV, Saez JE, Ciossani G, Toffolo E, Battaglioli E, Mattevi A, Andres ME. 2014. Differential properties of transcriptional complexes formed by the CoREST family. *Mol Cell Biol.* 34: 2760-70.

Bender del Busto J.E., Morales-Chacón L., García-Maeso I., García-Navarro M.E. 2006. Evaluación clínica pre y posquirúrgica de pacientes con epilepsia refractaria del lóbulo temporal. Estudio preliminar. *Rev Mex Neuroci* 7 (2): 112-119.

Berg A.T., Berkovic A.F., Brodie M.J., Buchhalter J., Cross J.H., Emde Boas W., Engel J., French J., Glauser T.A., Mathern G.W., Moshé S.L., Nordli D., Plouin P., Scheffer I.E., 2010, Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009, *Epilepsia*, 51(4):676-685.

Bronwen M., Matsson M., Maudsley S. 2006. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing research reviews* 5: 332-353.

Bruce-Keller A.J., Umberger G., McFall R., Mattson M.P. 1999. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann Neurol* 45: 8-15.

Calderone A, Jover T, Noh K, Tanaka H, Yokota H, Lin Y, Grooms S., Regis R, Bennett M y Zukin S. 2003. Ischemic Insults Derepress the Gene Silencer REST in Neurons Destined to Die. *Journal of Neuroscience*. 23 (6) 2112-2121;

Campestrini K., Pertile A., Da Silva R., Prediger R., Latini A., Aguiar A., 2017. Running for REST: Physical activity attenuates neuroinflammation in the hippocampus of aged mice. *Brain, Behavior and Immunity* 61: 31-35.

Cervenka M.C., Kossoff E.H. 2013. Dietary Treatment of Intractable Epilepsy. *Continuum*. 19 (3): 756-766.

Curia G., Longo D., Biagini G., Jones R.S.G., Avoli M., 2008, The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *Journal of Neuroscience Methods* 172; 143-157.

Damiola F., Minh N.L., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F., Schibler U., 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the ecentral pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development* 14: 2950-2961.

García-García .M.E. 2010, Modelos experimentales en epilepsia, *Neurología* 25 (3): 181-188.

García-Peñas J.J., Fournier-Del Castillo M.C., Domínguez-Carral J. 2014. Epilepsia y cognición: el papel de los fármacos antiepilépticos. *Revista de Neurología* 58: s37-42.

Garriga-Canut M., Schoenike B., Qazi R., Bergendahl K., Daley T.J., Pfender R.M., Morrison J.F., Ockuly J., Stafstrom C., Sutula T., Roopra A. 2006. 2-Deoxy-D-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CtBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure. *Nature Neuroscience*. 9 (11): 1382-1387.

Gómez M.V. 2004. Epilepsia del lóbulo temporal mesial: fisiopatología, características clínicas, tratamiento y pronóstico. *Revista de neurología*. 38: 656-63.

Hatori M., Vollmers C. Zarrinpar A., DiTacchio L., Bushong E.A., Gill S., Leblanc M., Chaix A., Joens M., Fitzpatrick J.A., Ellisman M.H., Panda S. 2012. Time restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high fat diet. *Cell Metabolism* 15 (6): 848-860.

Hartman AL, Rubenstein JE, Kossoff EH. 2013. Intermittent fasting: a “new” historical strategy for controlling seizures? *Epilepsy Res*. 104 (3): 275–9.

Heck N., Garwood J., Loeffler J.P., 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.

Hu XL, Cheng X, Cai L, Tan GH, Xu L, Feng XY, Lu TJ, Xiong H, Fei J, Xiong ZQ. 2011. Conditional deletion of NRSF in forebrain neurons accelerates epileptogenesis in the kindling model. *Cerebral Cortex* 21:2158–2165.

Huang C., Fu X.H., Zhou D., Li J.M. 2015. The role of Wnt/ β -Catenin signaling pathway in disrupted hippocampal neurogenesis of temporal lobe epilepsy: a potential therapeutic target? *Neurochem Res* 40: 1319-1332.

Kaneko N, Hwang JY, Gertner M, Pontarelli F, Zukin RS. 2014. Casein kinase 1 suppresses activation of REST in insulted hippocampal neurons and halts ischemia-induced neuronal death. *The Journal of Neuroscience* 34:6030–6039.

Kandrataviciu L., Balista P.A., López-Aguilar C., Ruggiero R.N., Umeoka E.H, García-Cairasco N., Bueno-Junior L.S., Leite J.P. 2014. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatric Disease and treatment*. 10.

Kobow K., Blümcke I. 2014. Epigenetic mechanisms in epilepsy. *Progress in Brain Research*. 213: 279-316.

Korosi A, Shanabrough M, McClelland S, Liu ZW, Borok E, Gao XB, Horvath TL, Baram TZ. 2010. Early-life experience reduces excitation to stress-responsive hypothalamic neurons and reprograms the expression of corticotropin-releasing hormone. *The Journal of Neuroscience* 30:703–713.

Landgrave-Gómez J, Mercado-Gómez O F., Guevara-Guzmán R. 2015. Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*.

Landgrave-Gómez J, Mercado-Gómez O F, Vázquez-García M, Rodríguez-Molina V, Córdova-Dávalos L, Arriaga-Ávila V, Miranda-Martínez A, Guevara-Guzmán R, 2016. Anticonvulsant Effect of Time-Restricted Feeding in a Pilocarpine-Induced Seizure Model: Metabolic and Epigenetic Implications *Front Cell Neurosci*. 10:7.

Landgrave-Gómez J, Vargas-Romero F., Mercado-Gómez O F, Guevara-Guzmán R. 2017. The emerging role of epigenetics on dietary treatment for epilepsy. *Curr Nutr Rep*.

Latham T., Mackay L., Sproul D., Karim M., Culley J., Harrison D.J., Hayward L., Langridge-Smith P., Gilbert N., Ramsahoye B. 2012. Lactate, a product of glycolytic metabolism, inhibits histone deacetylase activity and promotes changes in gene expression. *Nucleic Acids Research*. 40 (11): 4794-4803.

Laxer K.D., Trinko E., Hirsch L.J, Cendes F., Langfitt J., Delanty N., Resnick T., Benbadis S.R. 2014. *Epilepsy and Behavior* 37: 59-70.

Li Y, Daniel M., Tollefsbol T.O., 2011. Epigenetic regulation of caloric restriction in aging. *Medicine* 9: 98.

López-Meraz M.L., Roche 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

Lu T, Aron L, Zullo J, Pan Y, Kim H, Chen Y, Yang TH, Kim HM, Drake D, Liu XS, Bennett DA, Colaiácovo MP, Yankner BA. 2014. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*: 507(7493):448-54.

Masino S.A. & Rho J.M., 2012. Mechanisms of ketogenic diet action. *Jasper's Basic Mechanisms of Epilepsies*. 4th edition. Bethesda. National Center for Biotechnology Information. US.

McClelland S., Flynn C., Dubé C., Richichi C., Zha Q., Ghestem A., Esclapez M., Bernard C., Baram T.Z. 2011. Neuron-restrictive silencer factor-mediated cyclic nucleotide gated channelopathy in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 70 (3): 454-465.

McClelland S., Brennan G.P., Dubé C., Rajpara S., Iyer S., Richichi C., Bernard C., Baram T.Z., 2014. The transcription factor NRSF contributes to epileptogenesis by selective repression of a subset of target genes. *eLife*. 3: 1-21.

McNally M.A., Hartman A.L., 2012. Ketone bodies in epilepsy. *J Neurochem*. 121

Michael J. J. Duplisea, Esther K. Wilson, Eric C.K. Cheung, Brian A. Parker, Sheryl T. Carr, Conrad K. Ashby, Benjamin T. Bikman, and David M. Thomson. 2017. Effects of Ketogenic Diet in Young Adult and Old Rats. 31: 1.

Nechiporuk T., McGann J., Mullendorff K., Hsieh J., Wurst W., Floss T., Mandel G. 2015. The REST remodeling complex protects genomic integrity during embryonic neurogenesis. *eLife*;5:e09584.

Olguín A.P., 2006. Participación del Factor Silenciador Neuronal Restrictivo (REST/NRSF) en la Neurogénesis de *Xenopus laevis*. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Ooi L. y Wood L. 2007. Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nature reviews. Genetics.* 8: 544-554.

Palm K., Belluardo N., Metsis M., Timmusk T. 1998. Neuronal Expression of Zinc Finger Transcription Factor REST/NRSF/XBR Gene. *The Journal of Neuroscience,* 18(4):1280–1296.

Patterson K.P., Barry J.M., Curran M.M., Singh-Taylor A., Brennan G., Rismanchi N., Page M., Noam Y., Holmes G.L. Baram T.Z. 2017. Enduring memory impairments provoked by developmental febrile seizures are mediated by functional and structural effects of neuronal restrictive silencing factor. *The journal of neuroscience.* 37 (14): 3799-3812.

Parinejad, N., Keshavarzi, S., Movahedin, M., Raza, M. 2009. Behavioral and histological assessment of the effect of intermittent feeding in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 86, 54–65.

Pfaffl M., Horgan G., Dempfle L., 2002. Relative expression software tool for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research.* 30, 9.

Pilotto S., Speranzinia V., Tortoricia M., Durand D., Fishd A., Valente S., Federico Fornerisa F., Maie A., Sixmad T., Vachette P., Mattevia A. 2015. Interplay among nucleosomal DNA, histone tails, and corepressor CoREST underlies LSD1-mediated H3 demethylation. *PNAS.* 112 (9): 2752-2757.

Pitkänen A. y Lukasiuk K., 2009. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy and Behavior* 14: 16-25.

Pitkänen A. y Lukasiuk K., 2011. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurology* 10: 173-86.

Pitkänen A. y Sutula T.P., 2002, Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurology* 1: 173-81.

Pozzi D., Lignani G., Ferrea E., Contestabile A., Paonessa F., D'Alessandro R., Lippiello P., Boido D., Fassio A., Meldolesi J., Valtorta F., Benfenati F., Baldelli P.

2013. REST/NRSF-mediated intrinsic homeostasis protects neuronal networks from hyperexcitability. *The EMBO Journal* 32: 2994-3007.

Prins M., 2008. Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brains injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 28: 1-16

Rao M.S, Hattiangady B., Rai K.S., Shetty A.K, 2007. Strategies for promoting anti-seizure effects of hippocampal fetal cells grafted into the hippocampus of rats exhibiting chronic temporal lobe epilepsy. *Neurobiology Dis.* 27(2): 117-132.

Reddy SD, Clossen BL, Reddy DS. 2018. Epigenetic Histone Deacetylation Inhibition Prevents the Development and Persistence of Temporal Lobe Epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther.* 364 (1):97-109.

Riccio A., 2010. Dynamic epigenetic regulation in neurons: enzymes, stimuli and signaling pathways. *Nature neuroscience.* 13 (11): 1330-1337.

Roopra, A., Dingleline R., Hsieh J. 2012. Epigenetics and Epilepsy. *Epilepsia.* 53: 2-10.

Roopra A, Huang Y, Dingleline R. 2001. Neurological disease: listening to gene silencers. *Mol Interv.* 1: 219–228.

Sáez J., Gómez A., Barrios A., Parada G., Galdames L., González M., Andrés M. 2015. Decreased Expression of CoREST1 and CoREST2 Together with LSD1 and HDAC1/2 during Neuronal Differentiation. *PLOS ONE.* 10 (6) 1371.

Schauwecker P.E. 2003. Genetic basis of kainate-induced excitotoxicity in mice: phenotypic modulation of seizure-induced cell death. *Epilepsy Research* 55: 201-210.

Wood S.H., Dam S., Craig T., Tacutu R., O'Toole A., Merry B.J. Magalhães J.P. 2015. Transcriptome analysis in calorie-restricted rats implicates epigenetic and post-translational mechanisms in neuroprotection and aging. *Genome Biology* 16: 285.

Yusta I.A., 2005, Crisis convulsivas. Concepto, clasificación y etiología. Servicio de Neurología. Hospital Universitario de Guadalajara. 17:s68-s73.

Yuen A.W., Sander J.W. 2014. Rationale for using intermittent calorie restriction as a dietary treatment for drug resistant epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 33: 110-114.

Zavala-Tecuapetla C., López-Meraz M., 2011. Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo. *Neurobiología* 2(2): 190811.

Zhao Y., Zhu M., Yu Y., Qiu L., Zhang Y., He L., Zhang J. 2017. Brain REST/NRSF is not only a silent repressor but also an active protector. *Mol Neurobiol.* 54: 542-550.