



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**Análisis de la expresión de las proteínas de fisión mitocondrial
(Drp-1 y Fis-1) en el daño hipocampal en un modelo murino de
status epilepticus inducido con litio-pilocarpina**

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

PRESENTA

Dulce Gabriela Carrera Calvo



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: MONTIEL AGUIRRE JESUS FERNANDO**

VOCAL: **Profesor: TORRES MARQUEZ MARIA EUGENIA**

SECRETARIO: **Profesor: GUEVARA GUZMAN ROSALINDA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: MAYA AMPUDIA VANESSA REBECA**

2° SUPLENTE: **Profesor: MALDONADO JIMENEZ PERLA DEYANIRA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de fisiología; laboratorio sensorial 412 y 414, Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Laura Elena Córdova Dávalos

SUSTENTANTE:

Dulce Gabriela Carrera Calvo

ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosín trifosfato
Ca²⁺	Ion calcio
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	DNA codificante
Ca²⁺	Ion calcio
mtDNA	DNA mitocondrial
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
Drp1	<i>Dynamin Related Protein-1</i> , Proteína semejante a la familia de las dinaminas tipo 1
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EGTA	Ácido etilen-glicol-tetra-acético
ELT	Epilepsia del Lóbulo Temporal
Fis1	Proteína de fisión mitocondrial
GABA	Ácido γ -amino butírico
GTP	Guanosíl trifosfato
h	Hora
i.m.	intramuscular
i.p.	intraperitoneal
KCl	Cloruro de potasio
kDa	kiloDalton
KH₂PO₄	Fosfato monobásico de potasio
LiCl	Cloruro de litio

min.	minutos
mL	militro
mM	milimolar
Na₂HPO₄	Fosfato dibásico de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
nm	nanómetro
Oligo Fw	Cebador directo
Oligo Rv	Cebador reverso
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RNA	Ácido Ribonucleico (RNA)
mRNA	RNA mensajero
rRNA	RNA ribosomal
tRNA	RNA de transferencia
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina

VDAC Canal aniónico dependiente de voltaje

μM micromolar

λ Longitud de onda

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis, la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, por haberme permitido trabajar en su laboratorio y en su proyecto en el cual aprendí y reforcé mis conocimientos adquiridos durante la carrera.

A la Dra. Laura Elena Córdova Dávalos, por su gran colaboración y revisión de éste trabajo. Por la paciencia que mostró y sus consejos académicos los cuales me sirvieron al realizar los experimentos.

Al Dr. Octavio Fabián Mercado Gómez, por el apoyo técnico brindado para la realización del Western blot, así como para la revisión del presente trabajo.

A la QFB. Virginia Selene Arriaga Ávila, por el apoyo técnico brindado a lo largo del desarrollo del proyecto, por todos los conocimientos que me transmitió durante mi estancia en el laboratorio, por ser una gran persona.

Al Biól. Alfredo Miranda Martínez, por sus comentarios constructivo para la mejora de este proyecto de tesis

Al Dr. Eduardo Martínez Abundis, por su apoyo técnico.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (No. IN211913) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. 152613).

Al programa de Becas para la Educación Superior, por otorgarme la beca de titulación 2014.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Epilepsia	2
2.1.1 <i>Etiología y clasificación de la Epilepsia</i>	4
2.1.2 <i>Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT)</i>	5
2.1.3 <i>Actividad neuronal normal</i>	6
2.1.4 <i>Actividad neuronal en la Epilepsia</i>	8
2.2. Modelos experimentales de ELT	10
2.2.1 <i>Modelo Litio-pilocarpina</i>	11
2.3. La mitocondria, aspectos generales	13
2.3.1 <i>Dinámica mitocondrial</i>	14
2.3.2 <i>Dinámica mitocondrial: Fisión mitocondrial</i>	16
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVOS	20
4.1 <i>General</i>	20
4.2 <i>Específicos</i>	20
5. HIPÓTESIS	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1 <i>Obtención de hipocampos en ratas control y post SE</i>	22
6.2 <i>Obtención de las proteínas de Fisión mitocondrial (Drp1 y Fis1) del hipocampo de ratas control y post SE</i>	22
6.3 <i>Análisis de la expresión de los genes codificantes de las proteínas de Fisión mitocondrial (Drp1 y Fis1)</i>	24
7. RESULTADOS	26
7.1 <i>Análisis del contenido de Drp1 y Fis1 en fracciones mitocondriales y citosólicas de ratas control y post SE</i>	26
7.2 <i>Análisis de la expresión de los genes drp1 y fis1 en muestras controles y post SE</i>	28
8. DISCUSIÓN	29
9. CONCLUSIONES	33

10. PERSPECTIVAS	34
11. ANEXO.....	35
12. APÉNDICE	40
13. BIBLIOGRAFÍA.....	46

1. RESUMEN

La epilepsia es un padecimiento que altera al Sistema Nervioso Central y afecta entre 1-2 millones de personas en México. Aproximadamente un tercio de los pacientes con epilepsia son farmacorresistentes. Los mecanismos por los cuales un cerebro deja de ser sano y se convierte en epiléptico son poco claros. En general, en el cerebro las demandas energéticas son altas por lo tanto, el óptimo funcionamiento de la mitocondrias es muy importante en el metabolismo neuronal. Recientes estudios han demostrado la presencia de alteraciones en el balance entre los procesos de fisión y fusión mitocondrial en diversas enfermedades del SNC. En la fisión mitocondrial, la proteína Drp1 se transloca del citosol a la membrana externa mitocondrial en donde es reclutada por Fis1, para después llevar a cabo la hidrólisis de GTP y de esta forma Drp1 se oligomeriza alrededor de la mitocondria para dividirla en dos. Poco se sabe de las alteraciones de la dinámica mitocondrial en la epilepsia. En este trabajo nos planteamos analizar los cambios en la expresión a nivel génica y proteica de las proteínas de fisión mitocondrial Drp1 y Fis1 a tiempos agudos (3, 24 horas y 3 días posteriores a la inducción del SE) y crónicos (1 y 2 semanas y 1 mes). Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado que 24 h post SE los niveles de expresión proteica de Drp1 se incrementan sólo en la fracción citosólica y no ocurren cambios significativos en la fracción mitocondrial. Tampoco se observan cambios significativos en la expresión proteica de Fis1. A nivel de expresión génica en tiempos agudos se observa una disminución en la expresión del gen *drp1* a las 3H y una tendencia a incrementarse a las 24 h y no se observan cambios en la expresión de Fis1 en los tiempos analizados hasta este momento (3h y 24 h).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Epilepsia

La epilepsia es una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes debido a una descarga excesiva en las neuronas cerebrales, con pérdida o no de la conciencia, asociadas a diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas, que puede ocurrir a cualquier edad (OMS, 2012). Algunos autores indican que el término epilepsia no hace referencia a una enfermedad específica sino a todo el conjunto de trastornos neurológicos que representa una reacción anormal del encéfalo (López y Solís, 2012).

El término epilepsia proviene del latín *epilepsia* y significa “ser sobrecogido bruscamente o tomado desde arriba”. Algunos personajes que han trascendido en la historia de la humanidad han padecido algún tipo de epilepsia como Sócrates, Empédocles, Platón, Dostoievski, Vincent Van Gogh, Alfred Nobel y Lord Byron (Acevedo y cols., 2008).

La epilepsia afecta a personas de todas las razas, sexos y edades (de Cabo de la Vega y cols., 2006). La Organización Mundial de la Salud en el 2014 estima que alrededor de 65 millones de personas en el mundo están diagnosticadas con algún tipo de epilepsia. En México son aproximadamente entre 1 y 2 millones de personas afectadas por ésta patología (OMS, 2012).

En la literatura se mencionan los posibles mecanismos por los cuales se adquiere la epilepsia; sin embargo, aún no se ha dilucidado cuál es la causa principal que la provoca. La explicación más aceptada se apoya en la presencia de alguna alteración cerebral generada a edad temprana; por ejemplo, crisis febriles que después de un periodo de tiempo constituyen, un factor de riesgo para desarrollar más adelante algún tipo de epilepsia (Miranda y Godoy, 2015). Existen estudios que muestran cierta asociación entre el desarrollo de la epilepsia con trauma encefálico, hipoxia o infecciones del sistema nervioso central (SNC) (Volcy, 2004), así como daño cerebral o historia familiar de epilepsia (Miranda y Godoy, 2015).

Las manifestaciones clínicas de la epilepsia son las crisis epilépticas, las cuales pueden ir desde la pérdida transitoria de la conciencia (ausencias), movimientos y contracciones involuntarios de los músculos, o bien manifestarse como la pérdida del tono muscular (Acevedo, y cols. 2008; Garcia y cols., 2010).

Es importante no confundir la epilepsia con otros términos como lo son las crisis y el *status epilepticus (SE)* o estado epiléptico. Las crisis son el resultado de alteraciones motoras y/o sensoriales que resultan de un desbalance en la actividad neuronal. Éstos pueden ser eventos aislados o agudos, los cuales no están asociados con la epilepsia, mientras que aquellos que se presentan de forma espontánea o crónica son considerados como parte de la epilepsia (López, 2009). Las crisis pueden ser de dos tipos, convulsivas o no convulsivas. Las crisis epilépticas convulsivas conocidas como “convulsiones” se caracterizan por presentar movimientos “exagerados” (o sacudidas) del cuerpo o de las extremidades superiores y/o inferiores y en éstas se incluyen las crisis clónicas (*clonus*), tónicas y tónico-clónicas. Por su parte, las crisis no convulsivas se presentan como alteraciones parciales o totales de la capacidad de respuesta del paciente. En ellas se encuentran las crisis de ausencia (lapsos de inconciencia), mioclónicas (*mioclonus*) y atónicas (Acevedo y cols., 2008; López, 2009); cabe señalar que todas y cada una de ellas tienen una sintomatología, la cual no se abordará en la presente tesis.

Por otra parte, estado epiléptico o *SE* es considerado como una emergencia médica que puede traer como consecuencia daño cerebral, epileptogénesis (ver en párrafos más adelante) e incluso la muerte (Torres y cols., 2011). La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) en 1981 señaló que el término se refiere a una crisis epiléptica que persiste durante un cierto tiempo o se repite con la frecuencia suficiente para que no ocurra la recuperación de la conciencia entre los ataques (García, 2012). Hoy en día, el *SE* se define como una sola convulsión clínica que puede presentar convulsiones repetidas durante un período de más de 30 minutos sin intervención de recuperación de la conciencia (Knake y cols., 2009). Durante el *SE* existe una falla en los mecanismos homeostáticos que suprimen las crisis de manera natural, los cuales son mediados por el GABA (López, 2009).

Aún no se tiene un consenso general para indicar el tiempo de duración de una crisis epiléptica para que pueda ser considerada como *SE*. Sin embargo, en la práctica clínica se considera como *SE* a aquella crisis que persiste por más de 30 minutos a pesar del tratamiento adecuado con fármacos antiepilépticos de primera y segunda línea (García, 2012; Knake y cols., 2009).

2.1.1 Etiología y clasificación de la Epilepsia

El Comité de Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) desde los años 80's se ha dado a la tarea de realizar una clasificación de esta patología (Gómez y Bellas, 2011). En la Tabla 1 se muestra la categorización de la epilepsia realizada por la ILAE desde 1989 según criterios etiológicos y topográficos.

El área cerebral que parece ser la principal fuente de descarga epiléptica se denomina foco epiléptico (López, 2009). Tomando en cuenta dicho concepto, la epilepsia se divide en tres tipos: parciales/focales cuando se habla de un foco epiléptico y, el cual corresponde aproximadamente al 60% de las epilepsias (Samba y Kuruba, 2013), generalizadas, donde la descarga incontrolable de las neuronas involucra a ambos hemisferios cerebrales (López, 2009) y representan alrededor del 40% de las epilepsias (Samba y Kuruba, 2013) y también se habla de aquellas en las que la localización del foco es indeterminada (Gómez y Bellas, 2011).

Según la causa del desarrollo de la epilepsia (o etiología) cada uno presenta una subdivisión: las idiopáticas o primarias, sintomáticas (o secundarias) y criptogénicas (Nagel, y cols., 2007). En las primarias, el padecimiento es de origen desconocido y no existe otra causa que no sea una posible predisposición hereditaria (Gómez y Bellas, 2011). Las epilepsias de tipo sintomáticas son consideradas como secundarias a procesos (de etiología conocida o sospechosa) que afectaron al SNC tales como hipoxia-isquemia, infecciones, traumatismos, malformaciones congénitas, alteraciones en el metabolismo (innatas) así como neoplasias e intoxicaciones (López, 2009). Las criptogénicas se refieren a aquellas que son de causa desconocida y/o aún no son determinadas como no idiopáticas (Luengo, 2014).

Tabla 1. Esquema de la clasificación de las epilepsias de la Liga Internacional contra la Epilepsia de 1989. Obtenido de Gómez, J. (2011).

<p>Relacionadas con una localización (focales, parciales)</p> <p>Idiopáticas (p. ej., epilepsia infantil benigna con puntas centrotemporales)</p> <p>Sintomáticas (p. ej., epilepsias del lóbulo temporal, epilepsias del lóbulo frontal)</p> <p>Criptogénicas</p>
<p>Generalizadas</p> <p>Idiopáticas, según la edad de comienzo (p. ej., convulsiones familiares neonatales benignas, epilepsia con ausencias infantil, epilepsia con ausencias juvenil, epilepsia mioclónica juvenil)</p> <p>Criptogénicas o sintomáticas, por orden de edad (p. ej., síndrome de West, síndrome de Lennox-Gastaut)</p> <p>Sintomáticas</p> <p>De etiología no específica</p> <p>Síndromes específicos</p>
<p>De localización indeterminada</p> <p>Con crisis tanto generalizadas como focales</p> <p>Sin características generalizadas o focales inequívocas</p>
<p>Síndromes especiales</p> <p>Crisis relacionadas con la situación (p. ej., convulsiones febriles, crisis o estados epilépticos aislados)</p>

2.1.2 ***Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT)***

Dentro de las epilepsias de etiología secundaria o sintomática se encuentra la Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT), la cual es el tipo de epilepsia más frecuente que se presenta en el ser humano; posiblemente, el 20% de todos los pacientes con epilepsia la presentan (Samba y Kuruba, 2013).

Según la clasificación mencionada en líneas anteriores, la ELT corresponde al tipo parcial/focal (Samba y Kuruba, 2013), la cual se caracteriza por la presencia del foco epiléptico a nivel cortical o subcortical pero siempre dentro de un sistema neuronal limitado a un hemisferio cerebral (Gómez y Bellas, 2011; Engel, 1996).

La ELT se caracteriza por el desarrollo de un foco epiléptico en estructuras del lóbulo temporal, en las que se incluyen al hipocampo. Esta estructura cerebral es fundamental para el aprendizaje y la memoria así como para los aspectos emocionales de la conducta (Aguado, 2014).

En resecciones hipocampales de pacientes con ELT, la esclerosis del hipocampo es el hallazgo histológico más frecuente, éste es intratable entre el 50 y el 70% de los casos (Volcy, 2004; Téllez y Ladino, 2013). La esclerosis del hipocampo se caracteriza principalmente por la pérdida de neuronas en la región CA1, giro dentado y CA3 del hipocampo (Krzysztof, 2013; Herrera y cols, 2009; López y Solís, 2012). En la figura 1 pueden observarse las regiones CA1 y CA3 que forman parte del hipocampo.

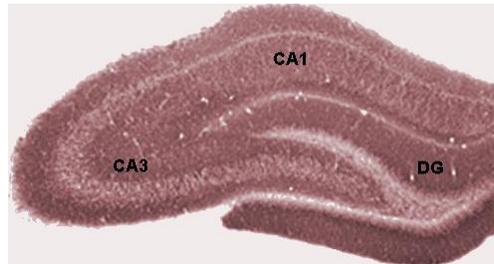


Figura 1. Regiones hipocampales. Se aprecian las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado (DG) que se encuentran afectadas principalmente en ELT.

Los pacientes con epilepsia suelen presentar resistencia a la farmacoterapia, por lo cual su enfermedad puede parecer intratable. Como en la mayoría de las epilepsias, el origen de la ELT no se conoce con certeza. Sin embargo, existen hipótesis que proponen la presencia de un daño inicial (hipoxia, crisis febriles entre otros) o ciertas variaciones genéticas que afectan los mecanismos neuroquímicos. Lo cual predispondría a una mayor susceptibilidad de algunos individuos para presentar ELT (Samba y Kuruba, 2013; Charria, 2007; Duncan y cols., 2006).

2.1.3 Actividad neuronal normal

La comunicación neuronal normal se regula por el equilibrio entre las señales excitadoras e inhibitoras; pero, ¿cómo se da dicha comunicación neuronal?

La excitabilidad neuronal comienza con la despolarización de las neuronas generando un potencial de acción; la propagación de la despolarización de la membrana a lo largo del axón provoca la liberación de los neurotransmisores en las terminales axónicas. El potencial de acción se genera a partir de los cambios

producidos por el flujo iónico. En la sinapsis, los neurotransmisores una vez liberados de las células presinápticas se unen a los receptores postsinápticos. Los principales neurotransmisores en el cerebro son glutamato, ácido γ -amino-butírico (GABA), acetilcolina (ACh), norepinefrina, dopamina, serotonina e histamina. En las neuronas la actividad eléctrica normal está regulada por señales excitadoras e inhibitoras dependientes del glutamato y GABA, respectivamente (Hui y cols., 2013). En la figura 2 observamos un esquema en el que se resume por pasos la sinapsis neuronal.

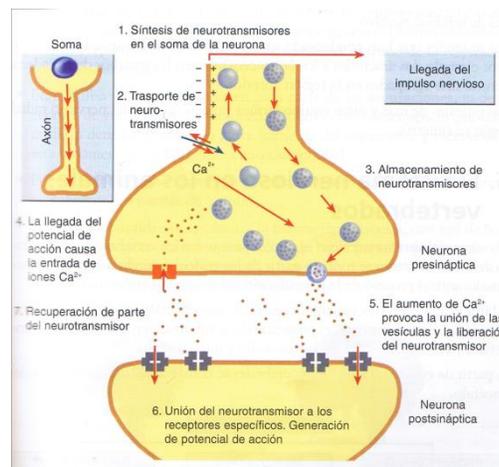


Figura 2. Mecanismos implicados en la sinapsis entre dos neuronas.

El glutamato es responsable de generar potenciales excitadores por la despolarización de las neuronas. Además de tener importancia en la mediación de la transmisión sináptica, participa durante la formación del sistema nervioso, crecimiento y maduración neuronal (Pereno, 2010). Dicho neurotransmisor puede unirse a receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Para el primer caso actúa sobre tres diferentes tipos de receptores, los cuales son ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionico (AMPA), y kainato (KA). Dichos receptores son permeables a Na^+ y K^+ ; la entrada de Na^+ y salida de K^+ lo cual contribuye a la despolarización membranaral y producción del potencial de acción. Por su parte los receptores tipo N-ácido metil-D-aspártico (NMDA) contribuyen a la permeabilidad a los iones Ca^{2+} .

Por su parte, GABA, es el cuya una función es el control del tono inhibitorio que contrarresta la excitación neuronal (Pereno, 2010; Treiman, 2001). Por estos hechos el sistema GABAérgico tiene un importante papel en el equilibrio de los procesos

excitadores neuronales y por ende en la disminución de descargas epileptiformes. Los receptores de GABA también son de tipo ionotrópicos y metabotrópicos; para el primer caso existen receptores GABA tipo A (media la actividad inhibitoria rápida en receptores postsináptico) y GABA tipo B (media la actividad inhibitoria lenta en receptores presinápticos) (Hui y cols., 2013). Los receptores GABA tipo A al permitir el flujo de iones Cl^- hacia el interior de la célula generan una hiperpolarización membranal que se traduce en la rápida inhibición del potencial de acción. El receptor GABA tipo B, asociado al sistema de segundo mensajero, permite un incremento de la concentración de iones K^+ y un decremento de los iones Ca^{2+} (Morimoto y cols., 2004) generando un potencial inhibitorio más lento que el ya mencionado.

2.1.4 Actividad neuronal en la Epilepsia

El proceso epiléptico involucra mecanismos implicados en la iniciación de las crisis (ictogénesis) así como los necesarios para la transformación del cerebro normal en un cerebro epiléptico.

Existen hipótesis que tratan de explicar la fisiopatología de la epilepsia; en ellas se menciona que los sistemas de inhibición sináptica están relacionados con el comienzo de las crisis epilépticas (de Cabo de la Vega y cols., 2006; Garcia y cols., 2010) así como la excitación mediada por mecanismos glutamatérgicos están relacionados con la generación de la actividad epiléptica (Pallud y cols., 2014)

El desbalance entre la inhibición y la excitación neuronal se pierde cuando prevalecen la sobreexcitación o la reducción de la inhibición. Dichos procesos permiten la despolarización de la membrana neuronal para ocasionar un incremento en las descargas excitadoras que finalmente conduce a una crisis epiléptica a un grupo de neuronas e incluso a grupos de neuronas más alejadas (de Cabo de la Vega y cols., 2006; Garcia y cols., 2009).

En la actividad epiléptica se ve alterada la inhibición procedente de las interneuronas que liberan el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC, GABA. Al existir una disminución o pérdida de la inhibición mediada por dicho neurotransmisor aumenta la probabilidad de inducir epileptogénesis. Entre los mecanismos por los que se puede

dar esta pérdida se encuentra el deterioro de la liberación o deficiencia en la síntesis de GABA, modificaciones en los receptores para dicho neurotransmisor o pérdida neuronal (la cual se puede observar en la epilepsia) (Hui y cols., 2013). Este hecho ha sido apoyado por algunos estudios realizados en muestras de tejidos obtenidos de pacientes farmacorresistentes en los que se observa, en algunos casos, la pérdida de interneuronas y neurotransmisión (Pedre y cols., 2008). Por otra parte, la migración y diferenciación de las interneuronas GABAérgicas depende de los factores de transcripción *Dlx*, la función reducida de éstos puede aumentar la excitación neuronal predisponiendo al cerebro a la hiperexcitabilidad y a la epilepsia (de Cabo de la Vega y cols., 2006; Cobos y cols., 2005; Bozzi y cols., 2012).

A partir de éstos datos se sospecha que la pérdida o disfunción de la despolarización mediada por GABA podría ser un factor necesario en el desarrollo del foco epiléptico (de Cabo de la Vega y cols., 2006).

En la epilepsia los mecanismos moleculares que pueden contribuir a una excesiva actividad glutamatérgica están relacionados con la iniciación y progresión de la epilepsia y se incluyen el aumento del efecto agonista de éste sobre sus receptores, aumento en la concentración de glutamato extracelular y modificaciones en el transporte de glutamato así como mecanismos autoinmunes (Hui y cols., 2013).

Hasta el momento, se sabe que la fisiopatología de la epilepsia puede estar relacionada con modificaciones en los procesos eléctricos neuronales. Existen mutaciones en genes que codifican para canales iónicos, receptores de neurotransmisores o para moléculas implicadas en la comunicación neuronal (Charria, 2007). En este sentido, la *canalopatía* ha sido un término empleado para describir la disfunción o defectos en canales iónicos y podría describir la patogénesis de las epilepsias de tipo idiopáticas. Cuando existen modificaciones (mutaciones o polimorfismos) en los genes que codifican para receptores de neurotransmisores se ha reportado la pérdida de la función de los mismos. La farmacorresistencia presentada en un considerado porcentaje de los pacientes con ELT ha sido explicada por alteraciones en los transportadores multifármacos en concreto alteraciones en el transportador ABCB1 (Herrera y cols., 2009).

Los mecanismos o factores por los cuales se da la transformación de redes neuronales normales a hiperexcitables aún son poco claros; sin embargo, todos apoyan la idea de que la epilepsia es ocasionada por diferentes eventos particulares que median después de un periodo de “silencio” cambios bioquímicos o estructurales en las neuronas inhibitorias o excitatorias del SNC (Krzysztof, 2013).

2.2. Modelos experimentales de ELT

Hasta el momento no se cuenta con algún tratamiento farmacológico que "cure" la epilepsia; por ello, los estudios que permitan comprender los mecanismos básicos de la enfermedad son útiles para el desarrollo de tratamientos efectivos. Por tal motivo, emplear modelos experimentales en animales que imiten fisiopatológicamente la epilepsia en humanos permitirán alcanzar tales objetivos (Hui y cols., 2013).

Los modelos animales ayudan a comprender la epileptogénesis, epilepsia crónica, mecanismos de susceptibilidad a alguna lesión neuronal, reorganización sináptica, esclerosis del hipocampo, así como los cambios genéticos presentes en la ELT (Samba y Kuruba, 2013). En los modelos farmacológicos se inicia con la inducción de crisis epilépticas utilizando sustancias convulsivantes que permitan generar un SE (30 min de crisis epilépticas). Después se observa un periodo de latencia se puede advertir un periodo crónico en el que las crisis son recurrentes y espontáneas (Velísek, 2006; Sloviter, 2008).

Las categorías más aceptadas para la clasificación de los modelos experimentales consideran la duración del protocolo para inducir crisis epilépticas, la causa de la actividad epiléptica o el tipo de actividad epiléptica que se genera (Zavala y López, 2011). Además, para la clasificación de los modelos experimentales también se toma en cuenta el tiempo necesario para la inducción de las crisis epilépticas (convulsiones) de tal forma que hay modelos *agudos*, *crónicos* y *multifactoriales*. En los modelos *agudos*, las crisis epilépticas se inducen generalmente en una sola sesión y son útiles para estudiar los mecanismos de inducción y detección de la actividad epiléptica, así como las alteraciones postictales. En los modelos *crónicos*, por ejemplo el *kindling*, la intensidad de las convulsiones aumenta debido a repetidos

estímulos excitatorios (eléctricos o químicos) que finalmente llevan a la generación de crisis epilépticas espontáneas o a la actividad epiléptica persistente (Hui y cols., 2013); de hecho, éstos son considerados verdaderos modelos de epilepsia ya que facilitan el estudio de los procesos de epileptogénesis (Vezzani, 2009). Por su parte, los modelos *multifactoriales* consisten en la manipulación genética de los animales que los predisponen a sufrir crisis epilépticas (Zavala y López, 2011).

También se sabe que la inducción de la epilepsia en los modelos animales puede realizarse empleando agentes químicos, estimulación eléctrica y alteraciones metabólicas o genéticas (Samba y Kuruba, 2013) (Hui Yin, Ahmad, y Makmor Bakr, 2013) (Zavala Tecuapetla y López Meraz, 2011). En los modelos químicos, la inducción de la actividad epiléptica consiste en la administración de compuestos excitadores; por ejemplo, compuestos análogos al glutamato que disminuyen (Knott y cols., 2008) o bloquea la neurotransmisión inhibitoria (antagonistas de GABA). Los más empleados son aquellos modelos que se inducen con ácido kaínico (agonista de receptores glutamatérgicos) y la pilocarpina de la cual se hablará en los siguientes párrafos. Estos dos últimos son conocidos como modelos de inducción de *SE* en donde las crisis, al pasar un tiempo determinado (periodo de latencia), generan crisis espontáneas que simulan a la ELT del humano (Curia, y cols., 2008).

2.2.1 Modelo Litio-pilocarpina

El estado epiléptico y el desarrollo de crisis breves pueden ser modelados por diferentes métodos; sin embargo, en esta tesis sólo se abordará el de litio-pilocarpina, que pertenece al tipo químico-crónico.

El modelo de inducción epiléptica que se empleó para el desarrollo de este trabajo es por administración de pilocarpina, la cual es un alcaloide con acción colinérgica, agonista de los receptores muscarínicos M1 que se utiliza ampliamente para inducir el estado epiléptico de manera similar a la enfermedad desarrollada en humanos. Este modelo se describió por primera vez por Turksi y colaboradores quienes observaron una relación causal entre la estimulación excesiva de los receptores

colinérgicos por la pilocarpina en el cerebro y daño cerebral generado en condiciones de epilepsia (Turski, cols., 1983)

Se conocen dos variantes de este modelo (Zavala y López, 2011). En la primera, la pilocarpina es administrada en altas dosis (300-400 mg/Kg de peso) y la otra variante es de dosis baja (30-60 mg/Kg de peso), la cual consiste en la administración de cloruro de litio (LiCl, 3 mEq/Kg de peso) entre 16 y 24 h previas a la administración de la pilocarpina. Se ha observado que la administración de la alta dosis de pilocarpina genera un mayor porcentaje de muerte en los animales experimentales (Curia y cols., 2008). Para disminuir tal efecto, se emplea la administración de la baja dosis con la previa inyección de LiCl (Müller y cols., 2009). Cabe señalar que en ambos casos se advierte la presencia de convulsiones de origen límbico que se generaliza hasta la aparición del SE, después de cierto tiempo puede generar crisis epilépticas espontáneas (Zavala y López, 2011; Vezzani, 2009).

La modificación a dicho protocolo además de disminuir el porcentaje de mortalidad también potencia el efecto de la pilocarpina. Marchi y colaboradores en el 2009 indicaron que el aumento de la susceptibilidad de las ratas a la pilocarpina, después el tratamiento con litio, puede ser el resultado no solo del efecto directo sobre los receptores colinérgicos, sino también de un aumento en la respuesta inflamatoria primaria mediada por citosinas proinflamatorias como la interleucina 1-B (IL-1 β) (Samba y Kuruba, 2013).

Con el modelo de litio-pilocarpina se ha reportado el daño al hipocampo, semejante al observado en pacientes con ELT (Ben, 2001).

Para medir la intensidad de las convulsiones en roedores sometidos a un protocolo experimental de inducción de epilepsia, se ha utilizado desde hace varios años la escala de Racine. En dicha escala se categorizan seis estados o etapas de intensidad, en la primera se pueden observar la masticación así como movimientos faciales, en la segunda se advierte el cabeceo; la tercera etapa es denominada *clonus*; mientras que en la cuarta etapa, el roedor comienza con las crisis (sacudida de extremidades superiores e inferiores); en la quinta etapa, el animal pierde el

equilibrio y en la sexta etapa, puede o no presentarse la muerte del roedor (Racine, 1972; Lüttjohann y cols., 2009).

Cabe señalar que en los modelos animales, la etiología de la epilepsia es diferente a la del ser humano, la cual generalmente está asociada con traumatismos craneoencefálicos o isquemia. Por dichas razones, es complicado indicar cuál es el mejor modelo que imite el proceso epileptogénico como ocurre en los humanos (Hui y cols., 2013). Por lo tanto, antes de iniciar con un protocolo es recomendable designar cuál o cuáles son las características de la epilepsia en humanos que se tratarán de reproducir en animales (Sloviter, 2008). El modelo de pilocarpina con o sin litio es empleado para mimetizar el ELT en humanos debido a que se generan varios síntomas; por ejemplo, crisis refractarias, pérdida selectiva de interneuronas y una baja tasa de control de las crisis con anticonvulsivantes. Otra de las ventajas del modelo de pilocarpina incluye la posibilidad de observar y analizar los cambios en la anatomía cerebral durante la fase aguda, así como la comparación entre las modificaciones que se presentan en fases iniciales, durante la epileptogénesis y en tiempos crónicos (García y cols., 2009).

2.3. La mitocondria, aspectos generales

Estructuralmente las mitocondrias son organelos de doble membrana (interna y externa), espacio intermembranal y matriz mitocondrial. Cada uno de los compartimentos posee funciones diferentes ya que existe una composición química y proteica diferente (Muñiz y cols., 2000).

La membrana externa mitocondrial (MME) se encuentra en contacto con el citoplasma de la célula, ahí se localizan diversas proteínas, algunas de las cuales forman canales para asegurar la permeabilidad a iones y metabolitos; mientras que la membrana interna mitocondrial (MMI) forma pliegues o crestas donde se localizan proteínas implicadas en la cadena respiratoria necesaria para la generación de adenosín trifosfato (ATP). Por otra parte, la matriz mitocondrial contiene DNA mitocondrial (mtDNA), mitocondrias ribosomales y RNA mitocondrial y en su interior

se llevan a cabo reacciones como el ciclo de Krebs y la beta-oxidación de ácidos grasos (Rodríguez y cols., 2010).

Las mitocondrias están presentes en la mayoría de las células eucariotas sin embargo, se sabe que los glóbulos rojos y las amibas carecen de dicho organelo (Jiménez, 2003). Con los avances en microscopía de fluorescencia y electrónica se ha podido observar la morfología mitocondrial, la cual puede ser alargada o circular. Además, dependiendo del tipo de célula y de la demanda energética que éstas presenten existen variaciones en el tamaño y forma de organizarse (Kuznetsova y cols., 2009).

Se sabe que la distribución mitocondrial en el citoplasma también es variable, por ende no puede suponerse que sean organelos estáticos, sino que se trata de organelos que migran, se dividen y se fusionan para mantener el tamaño, número y adecuada función mitocondrial.

La forma, tamaño, número, distribución y orientación de las mitocondrias varían de un tejido a otro, dependiendo de las necesidades energéticas en cada uno de ellos. Las mitocondrias son organelos necesarios y muy importantes en los diferentes tipos de celulares, por lo tanto en el sistema nervioso (Kuznetsov y cols., 2009).

El cerebro es altamente dependiente de la producción de energía y es altamente vulnerable a la disfunción mitocondrial (Witte y cols., 2010), por ello se han realizado diferentes trabajos en los que se demuestra que las alteraciones en las funciones de éste organelo contribuyen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Haun y cols., 2013; Liesa y cols., 2009; Karbowski, 2003). Estas pueden ser consecuencia de mutaciones en del mtDNA, daño por estrés oxidativo, desregulación de la homeostasis de los iones Ca^{2+} , procesos de neuroinflamación y muerte celular mediada por apoptosis (Rodríguez y cols., 2010).

2.3.1 Dinámica mitocondrial

La *dinámica mitocondrial* se refiere a la capacidad de la mitocondria para someterse a ciclos controlados de fusión y fisión para mediar su movimiento a través del

citoesqueleto, su arquitectura mitocondrial y la interconectividad (Knott 2009; Liesa y Zorzano, 2009).

El tamaño y la función mitocondrial, y por ende la homeostasis de dicho organelo está determinado por un equilibrio entre los mecanismos de fisión y fusión mitocondrial (Wilson y cols., 2013; Kuznetsova y cols., 2009). Alteraciones en este proceso pueden provocar la deformación mitocondrial, la cual ha sido asociada a numerosas enfermedades (Zorzano y cols., 2012).

Todas las células requieren de energía para cumplir con sus funciones. En las neuronas, es por eso que la función de la dinámica mitocondrial es esencial para los procesos neuronales por ejemplo en la producción de energía, mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} y del potencial de membrana, transporte axonal y dendrítico así como la liberación y recaptura de neurotransmisores durante la sinapsis (Knott, 2009).

La fusión y fisión mitocondrial son dos procesos opuestos pero complementarios que están presentes en condiciones normales y patológicas. En este trabajo sólo nos enfocamos en la fisión mitocondrial. Tanto en la fisión como en la fusión participan proteínas pertenecientes a la superfamilia de las Dinaminas, las cuales presentan dominios de GTPasa (Wilson y cols., 2013).

Con base en las similitudes y funciones estructurales, las proteínas pertenecientes a la familia de las dinaminas se han clasificado en las *dinaminas clásicas* y las proteínas semejantes a las dinaminas o *dinaminas-like proteins (DRPs o DLPs)*; las cuales se caracterizan por presentar tres dominios: el de GTPasa, el medio y el dominio efector (GED) (Elgass y cols., 2013). Las dinaminas clásicas, a diferencia de la familia de las *DRPs*, presentan dos dominios adicionales (ver figura 2): el dominio PH (pleckstrin homology) y el PRD (proline- and arginine-rich domain) (Ramachandran, 2011).

La estructura oligomérica de las dinaminas presenta un cambio conformacional en la forma y es dependiente de la hidrólisis de GTP, lo cual tiene como consecuencia la constricción membranal para poder generar la escisión. De manera similar las dinaminas, las *DRPs* llevan a cabo la escisión mitocondrial (Ramachandra, 2011).

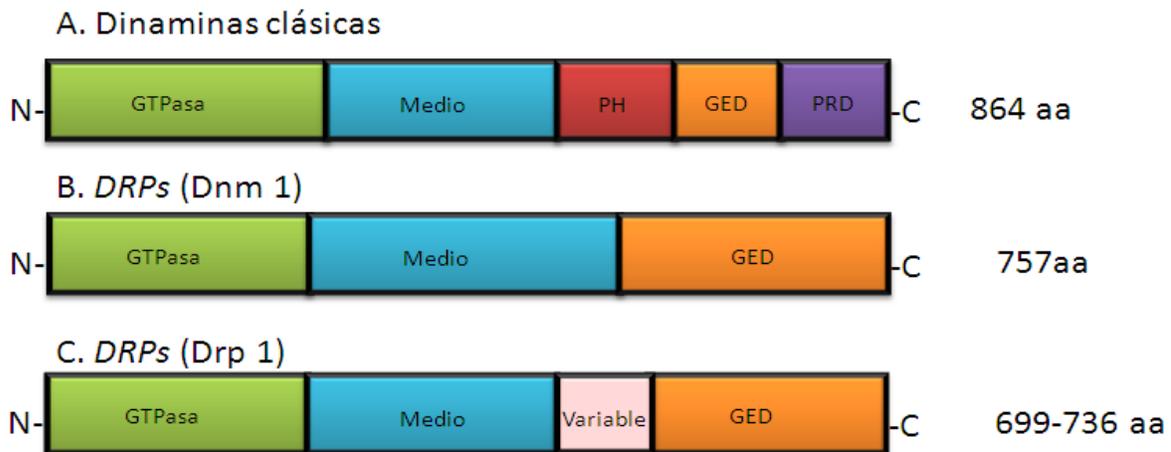


Figura 3. Dominios de las Dinaminas clásicas y DRPs A) Las Dinaminas clásicas se caracterizan por presentar un dominio de GTPasa, el medio de anclaje (Pleckstrin Homology, PH), GTPasa efector (GED) y el dominio rico en prolina (PRD). Las DRPs (B, C) contienen los dominios GTPasa, el medio y GTPasa efector (GED), por su parte Drp 1 a diferencia de Dnm 1 contiene un dominio variable.

2.3.2 Dinámica mitocondrial: Fisión mitocondrial

La fisión mitocondrial es el proceso inverso de la fusión. La “fisión” o división mitocondrial es necesaria durante la división celular para distribuir las mitocondrias a las células hijas (Smirnova y cols., 2001). Además, la fisión mitocondrial se requiere para realizar otros procesos celulares tales como el transporte de dichos organelos a las zonas donde existe una demanda energética, así como el aislamiento de segmentos dañados de las mitocondrias y por lo tanto, promover la autofagia. Cuando estos mecanismos de protección fallan, la fisión mitocondrial también puede promover la apoptosis celular (Wasiak y cols., 2007).

La proteína que se encarga de la regulación de la fisión mitocondrial pertenece a las DRPs y es conocida en los mamíferos como Drp1 (*Dynamin-related protein 1*), Dnm1 (*Dynamain 1-like protein*) en levaduras y DRP3A/B o ADI2a/b en *Arabidopsis thaliana*.

Drp1 es una proteína de aproximadamente 80 kDa que se encuentra en el citosol en forma de dímeros/tetrámeros. Drp1 es reclutada desde el citosol hasta la membrana

externa mitocondrial por proteínas adaptadoras transmembranales como las Fis1 (Merrill y cols., 2011) (figura 4).

La importancia del estudio de las alteraciones en la fisión mitocondrial y sus consecuencias en el desarrollo cerebral, ha sido demostrada en varios artículos científicos. En uno de ellos se ha reportado el caso de la identificación de una recién nacida con una mutación del gen para Drp1 (doble negativo), la cual presentaba crecimiento anormal cerebral, atrofia óptica y acidemia láctica. A los 37 días después del nacimiento la paciente falleció (Waterham y cols., 2007). Para conocer las funciones fisiológicas detalladas de la fisión mitocondrial, se han construido ratones *knockout* (*Drp1*^{-/-}) los cuales sólo sobreviven alrededor de 10.5 y 12.5 días durante el desarrollo embrionario debido a anomalías cerebrales (Ishihara y cols., 2009). Resultados similares han obtenido otros grupos de trabajo, donde se ha relacionado la falta de Drp1 con la muerte de embrionaria en el útero a los tiempos 10.5-12.5 días de desarrollo, así como defectos en el desarrollo de sinapsis, menor desarrollo de hígado y deformación de tejido cardíaco. Aunado a lo anterior, la agregación y distribución inapropiada de mitocondrias han sido observados en neuritas de ratones con genotipo *Drp1*^{-/-} y, éstas muestran alta sensibilidad a la apoptosis. Por otra parte, al sobreactivarse la actividad de Drp1 e inducir una mayor fisión mitocondrial se contribuye a la activación de la muerte neuronal mediada por apoptosis, autofagia (Purnell y Fox, 2013) y necrosis (Qi y cols., 2012).

A diferencia de las dinaminas clásicas, Drp1 necesitan proteínas adaptadoras para llevar a cabo la fisión mitocondrial. Las proteínas adaptadoras interactúan directamente con Drp1 y con la membrana externa mitocondrial, de tal forma que se genera un complejo activo para que, posteriormente, pueda llevarse a cabo la fisión mitocondrial (Bui y Shaw, 2013). Tanto en mamíferos como en levaduras, se presenta una proteína de anclaje conocida como Fis1 (Proteína de Fisión mitocondrial).

Fis1 es una proteína de aproximadamente 17 kDa la cual tiene dos dominios tipo TPR (*tetratricopeptide repeat*) y un segmento hidrofóbico carboxi-terminal con el cual se ancla a la membrana externa mitocondrial (Bliet y cols., 2013).

Defectos en la fisión mitocondrial puede estar implicados en una distribución mitocondrial aberrante en neuronas, lo cual tiene como resultado, alteraciones en la transmisión sináptica (Zhang y Chan, 2007). La disfunción en la fisión mitocondrial tiene un papel importante en la mayoría de los desórdenes que afectan al SNC tales como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y Huntington (Guo y cols., 2013). El papel de Drp1 en estas enfermedades ha sido estudiado con mucho interés; sin embargo, poco se sabe del papel de la dinámica mitocondrial en la epilepsia, en donde las neuronas presentan una alta demanda energética.

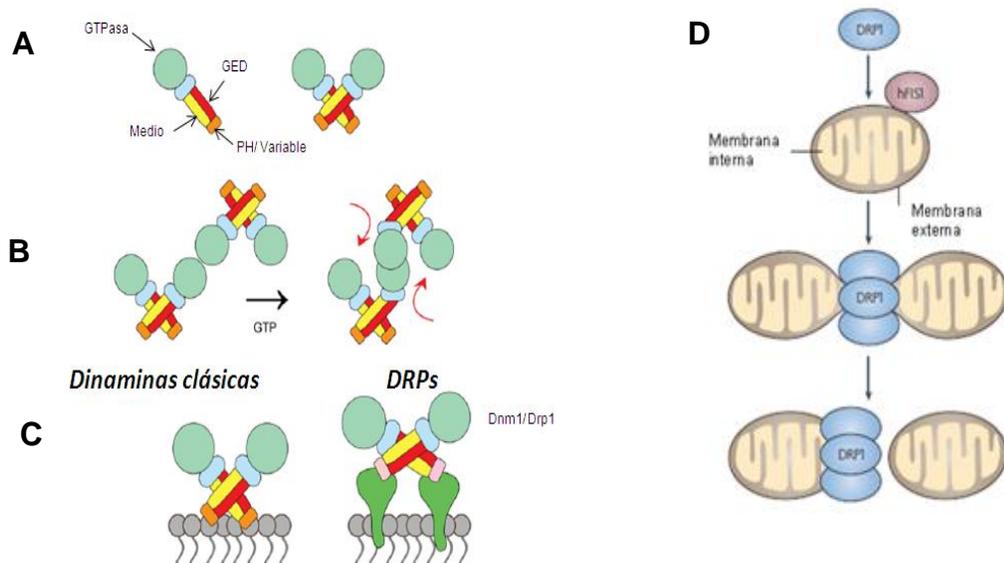


Figura 4. Fisión mitocondrial. A) La familia de las dinaminas está integrada por proteínas dinaminas clásicas y DRPs. en cada una de ellas contienen dominios GTPasa, Medio y GED. B) Las dinaminas forman estructuras de orquilla, en donde la cabeza formada por el dominio de GTPasa llevan a cabo la hidrólisis de GTP. C) en caso de las Dinaminas clásicas, el dominio PH se inserta en la capa lipídica para facilitar la interacción con los fosfolípidos y facilitar el rompimiento de la membrana. Drp1 presenta dominios variables, los cuales sirven de anclaje e interacción con proteínas receptoras. Modificado de Elgass, y cols., (2013). **D)** Drp 1 se encuentra en el citoplasma y se oligomeriza al estar en contacto con la membrana externa mitocondrial. La interacción con dicha membrana se da posiblemente, a través de proteínas adaptadoras como Fis1. Drp1 forma “anillos” alrededor de la membrana externa para dar lugar a la fisión mitocondrial. Modificado de Knott y cols (2008).

3. JUSTIFICACIÓN

La epilepsia es una alteración del Sistema Nervioso Central (SNC) que afecta entre el 1 y 2% de la población mundial (OMS, 2012).

Muchas son las complicaciones que se presentan en pacientes con ELT, por ejemplo, la pérdida neuronal que se describe fundamentalmente en hipocampo (Pedre, 2008), el deterioro de ciertas funciones como alteraciones en la memoria (la más frecuente), la atención, el lenguaje (Weiser, 2004). También se sabe que las personas diagnosticadas con epilepsia presentan un mayor riesgo para presentar psicosis (Clancy y cols., 2014). Todo esto hace que su calidad de vida sea poco favorable e incluso, la integración del paciente dentro de la sociedad se ve afectada.

La homeostasis mitocondrial juega un papel importante en el cerebro ya que éste requiere de una alta cantidad de energía para llevar a cabo los procesos que involucran la excitabilidad neuronal y transmisión sináptica. En ciertas enfermedades que afectan al SNC, por ejemplo Huntington, Parkinson, Alzheimer (Shang-Der Chen, 2010) se han observado cambios en la fisión mitocondrial.

Poco se conoce sobre los cambios que inducen la fisión mitocondrial en procesos epilépticos. Por lo tanto, es muy importante el estudio de dichos mecanismos como estrategia para proponer nuevas alternativas terapéuticas que permitan disminuir el daño neuronal generado por las crisis epilépticas, a fin de que se pueda mejorar la calidad de vida de los pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Analizar los niveles de expresión de las proteínas de fisión mitocondrial (Drp1 y Fis1) asociadas al daño neuronal generado en el hipocampo por la inducción de *status epilepticus (SE)*, en ratas.

4.2 Específicos

- ✓ Analizar la expresión de las proteínas de fisión (Drp1 y Fis1) en las diferentes fracciones obtenidas empleando la técnica de Western Blot en un curso temporal posterior al *SE*
- ✓ Analizar la expresión de los genes que codifican para las proteínas Drp1 y Fis1 a través de un curso temporal posterior al *SE*.

5. HIPÓTESIS

Si las crisis repetidas producen un cambio en la fisión mitocondrial en el hipocampo de ratas entonces se observará un aumento significativo en los niveles de expresión de Drp1 y Fis1 con respecto al grupo control.

6. METODOLOGÍA

6.1 *Obtención de hipocampos en ratas control y post SE*

Inducción de status epilepticus (SE). Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 200-250 g y se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos: 1) grupo control y 2) grupo tratado con pilocarpina (n=6 cada uno). A ambos grupos se les administró diariamente 1 mL/Kg de peso de solución salina isotónica (NaCl 0.9%) vía intraperitoneal (i.p). El empleo de animales como sujetos de experimentación fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Al sexto día se les administró 3 mEq/Kg de cloruro de litio (i.p., SIGMA) y 16 h después de dicho tratamiento se les administró por vía subcutánea (s.c.) 1 mg/Kg de metil nitrato de (-) escopolamina (SIGMA) disuelta en solución salina. Transcurridos 30 minutos, recibieron la inyección de pilocarpina (SIGMA) a una dosis de 30 mg/Kg (s.c.). Para el caso del grupo control, los animales recibieron las inyecciones de cloruro de litio y metil nitrato de (-) escopolamina pero no la pilocarpina. A los animales que presentaron SE, se les administró 5 mg/Kg, i.m. de Diazepam y una hora después de iniciado el ataque se introdujeron por 1 h en una caja sumergida en un baño de hielo. Para medir la intensidad de las convulsiones en los roedores se empleó la escala de Racine categorizando cinco etapas de intensidad. Posteriormente, los animales se mantuvieron en una habitación a 18 °C por dos días y se les alimentó manualmente con suplemento alimenticio.

6.2 *Obtención de las proteínas de Fisión mitocondrial (Drp1 y Fis1) del hipocampo de ratas control y post SE*

Fraccionamiento celular. Los animales controles y los tratados con pilocarpina se sacrificaron a las 3, 24, 72 h, 1, 2 y 4 semanas posteriores a la inducción del SE. Los cerebros se colocaron inmediatamente en Amortiguador salino de fosfatos (PBS) a 4°C y posteriormente los hipocampos se disecaron para ser depositados en 1.5 mL de amortiguador de sacarosa. Los hipocampos se homogenizaron y centrifugaron a 2000g por 15 minutos a 4°C. Posterior a la centrifugación, el sobrenadante se

recuperó y se volvió a centrifugar a 15000g por 20 minutos. El sobrenadante se recuperó como fracción citosólica mientras que la pastilla se resuspendió en 500 μL de solución de sacarosa adicionada con 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA, MP Biomedicals) y se volvió a centrifugar (15000g por 20 minutos). La pastilla mitocondrial se resuspendió en 100 μL de Amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas (Complete-Roche). Todas las fracciones se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La cantidad de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se cuantificó por la técnica de Bradford (BioRad).

Electroforesis desnaturalizante y Western Blot. Para realizar la electroforesis se cargaron 30 μg de proteína de cada una de las fracciones aisladas y se separaron en geles de SDS poliacrilamida al 10% a 100 V por 2.5 h (BioRad PowerPac HC High-Current Power Supply); la transferencia electroforética (18 V, 1 A, 80 min, Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BioRad) se realizó empleando membranas de PVDF (polifluoruro de vinilideno, 0.2 μm , Merk Millipore). El bloqueo de las membranas se realizó utilizando una solución de Amortiguador de Tris-HCl-Salina-Tween 0.1% (TBS-T) con leche descremada al 5% por 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se efectuaron tres lavados de 5 min con TBS-T y las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario. La detección de Drp1 (anti Drp1, 1:500; Santa Cruz) y Fis 1 (anti Fis1, 1:500, Santa Cruz) se realizó en las fracciones mitocondriales, mientras que la fracción citosólica se empleó para la identificación de Drp1. En la fracción mitocondrial se usó VDAC (anti VDAC, 1:2000, Cell Signalling) como control de carga; para la citosólica, beta-Actina (1:500, Santa Cruz). Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas tres veces (cada una por 5 min.) con TBS-T y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (IgG anti ratón o anti conejo, 1:5000, Cell Signalling). Una vez terminada la incubación, las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T y posteriormente fueron reveladas por quimioluminiscencia (Luminata Forte Western HRP, Millipore). Las placas radiográficas se escanearon y se analizó la densidad óptica mediante el programa ImageJ 1.46r.

Análisis estadístico. Los datos se presentan como promedio \pm Error Estándar. Para el análisis estadístico empleó el software GraphPad Prism versión 5.0. Se realizó una *t-student* con un valor de $p < 0.05$.

6.3 Análisis de la expresión de los genes codificantes de las proteínas de Fisión mitocondrial (Drp1 y Fis1)

Extracción de RNA y síntesis de cDNA. Los hipocampos disecados de las ratas control y tratadas con litio-pilocarpina se colocaron en 500 μ L de trizol (Invitrogen) y se congelaron a -70°C hasta ser homogenizados. Se realizó la extracción del RNA según el protocolo sugerido por Invitrogen. Para verificar la integridad de las subunidades ribosomales de las muestras; se corrieron geles de agarosa al 0.8.% TAE 1X. La pureza de las muestras se consideró buena cuando la relación de las absorbancias obtenidas a 260 nm y a 280 nm ($\lambda_{260}/\lambda_{280}$) era de entre 1.7-1.9. Para realizar la síntesis de cDNA a partir de 5 μ g de muestra, se siguieron las especificaciones de *Thermo Scientific Reverte Aid First Strand cDNA Synthesis Kit* (ver condiciones en apéndice). La cantidad de cDNA se cuantificó con el programa Gen 5 (Epoch, Biotek), y se realizaron diluciones para obtener 200 ng de cDNA/ μ L.

Preparación de los oligos. Drp1 (forward primer, Fw, 5'-ATGCCTGTGGGCTAATGAAC-3', reverse primer, Rv, 5'-TTCCTCTCCAGTTGCCTGTT-3'), Fis1 (Fw, 5'-GCAGTTTGAATACGCCTGGT-3' Rv, 5'-TGTAACAGTCCCCGCACATA-3') y el gen de referencia beta-actina (Fw, 5'-AAGACCTCTATGCCAACAC-3' Rv, 5'-TGATCTTCATGGTGCTAGG-3') se diseñaron y sintetizaron por la casa comercial SIGMA. La concentración de cada uno de los oligos (μ g/ μ L) se cuantificó con el programa Gen 5 (Epoch, Biotek). Se prepararon soluciones stock de cada uno de los oligos (20 μ L) a una concentración final de 10 μ M.

Estandarización de la reacción de PCR en tiempo real. Se realizó por duplicado una curva estándar de cinco puntos, con diluciones de las muestras de cDNA en base 10 (para fis1 y actina) y base 5 (para Drp1). Se comenzó con una dilución de 1000 ng/ μ l. Las condiciones para la PCR en tiempo real se optimizaron con SYBER GREEN

(Thermo Scientific); para más detalles puede observar la sección del apéndice 1. Las condiciones en las cuales se realizó la reacción se muestran en la siguiente tabla; se emplearon 45 ciclos para llevar a cabo la reacción.

Tabla 2. Programación de las condiciones para la reacción de PCR en tiempo real

Paso	Tiempo	Temperatura (°C)
<i>Desnaturalización previa</i>	2 min	50
<i>Desnaturalización</i>	10 min	95
<i>Hibridación</i>	15 s	Propia de cada oligo (*)
<i>Extensión</i>	30 s	65
<i>Fin de la reacción</i>	30 s	72

(*) Se probaron varias temperaturas de hibridación para cada oligo partiendo de la de las temperaturas proporcionadas por la casa comercial (SIGMA) $\pm 3^{\circ}\text{C}$. Para todas las determinaciones se empleó una eficiencia de reacción entre 90-110% y una R2 mayor a 0.9.

Electroforesis vertical de DNA en geles de poliacrilamida. Para determinar la especificidad de los productos de amplificación de cada uno de los genes, se corrieron en geles de poliacrilamida (ver apéndice). Los fragmentos se visualizaron bajo la luz ultravioleta tras teñir el gel con GelRed (Invitrogene). Después de realizar la estandarización de las condiciones para llevar a cabo la qRT-PCR se evaluaron los niveles de expresión del transcrito en las muestras control y post *SE* (n=3) empleando el software REST versión 2009.

7. RESULTADOS

Para lograr los objetivos de éste trabajo de tesis se empleó un modelo murino de inducción de epilepsia, el cual mimetiza la fisiopatología de la ELT en humanos.

7.1 Análisis del contenido de Drp1 y Fis1 en fracciones mitocondriales y citosólicas de ratas control y post SE

Drp1 es una proteína que se encuentra en la fracción citosólica y se transloca a la membrana externa mitocondrial para ser reclutada por proteínas adaptadoras y en presencia de GTP cambia su conformación para formar un anillo alrededor de dicho organelo y llevar a cabo la fisión mitocondrial. En la figura 5 se observa que la expresión de la proteína Drp1 aumenta significativamente en la fracción citosólica a las 24h en la condición de SE; sin embargo tanto en la fracción mitocondrial y citosólica a tiempos largos no se observan diferencias significativas (Fig. 6).

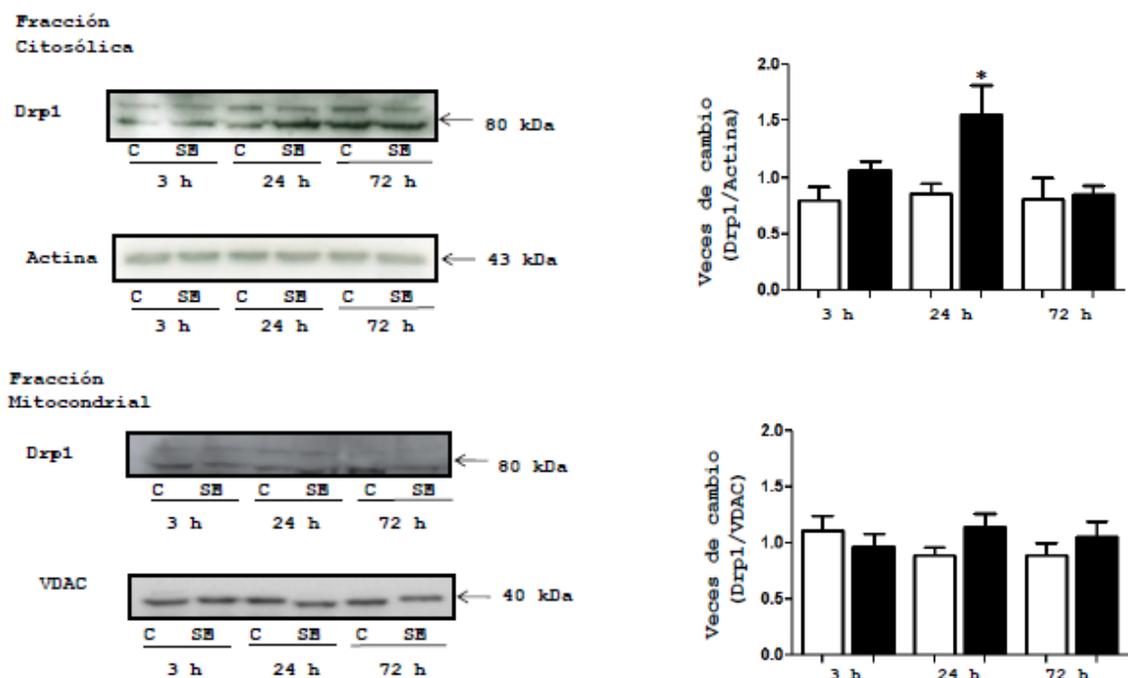


Figura 5. Expresión de la proteína de fisión mitocondrial (Drp1) después del SE. El análisis de Western blot muestra la expresión de Drp-1 en la fracción citosólica y mitocondrial de hipocampos de ratas controles (barras blancas) y post SE (barras negras) a 3, 24 y 72 h (n=6). La expresión de Drp1 en la fracción citosólica a las 24 h se ve incrementada significativamente. En la fracción mitocondrial no se observan cambios significativos en la expresión de Drp1 a los diferentes tiempos. Todos los datos se presentan como Promedio \pm Error Estándar, t-test, $p < 0.05$

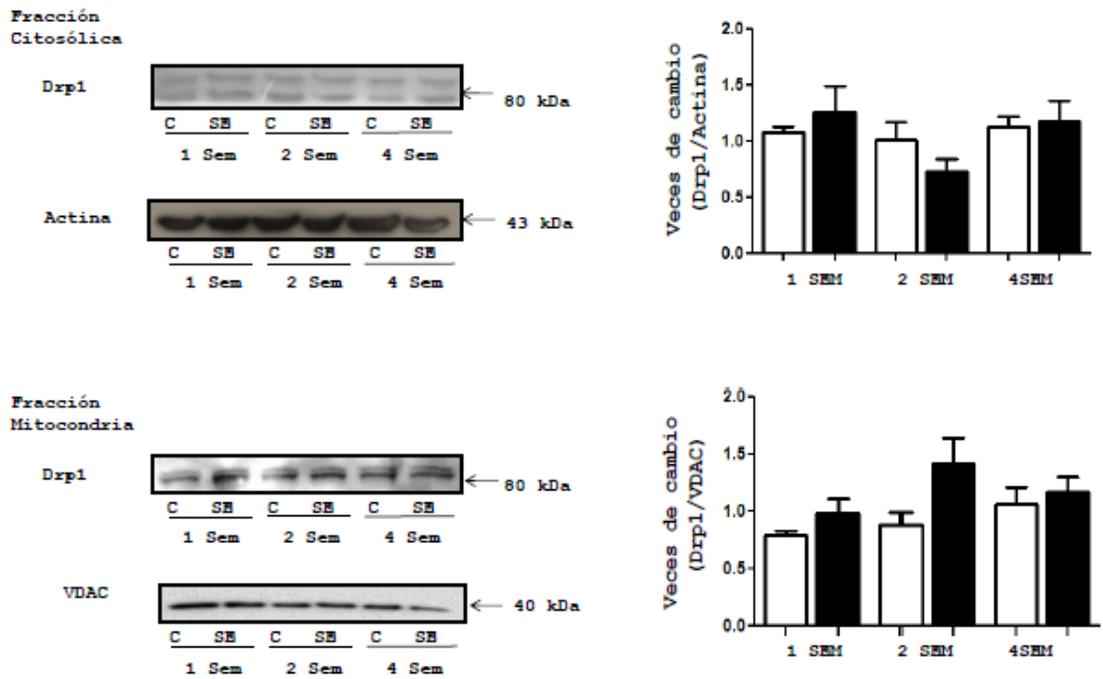


Figura 6. Expresión de la proteína de fisión mitocondrial (Drp-1) después del SE. Análisis de Western blot muestra la expresión de Drp-1 en la fracción citosólica y mitocondrial de hipocampos de ratas controles (barras blancas) y post SE (barras negras) a tiempos de 1, 2 y 4 semanas después (n=6). Puede apreciarse en los gráficos que en ninguno de los tiempos y en ninguna de las fracciones analizadas se observa un incremento significativo. en la expresión de Drp-1. Todos los datos se presentan como Promedio \pm Error Estándar, t-test, $p < 0.05$

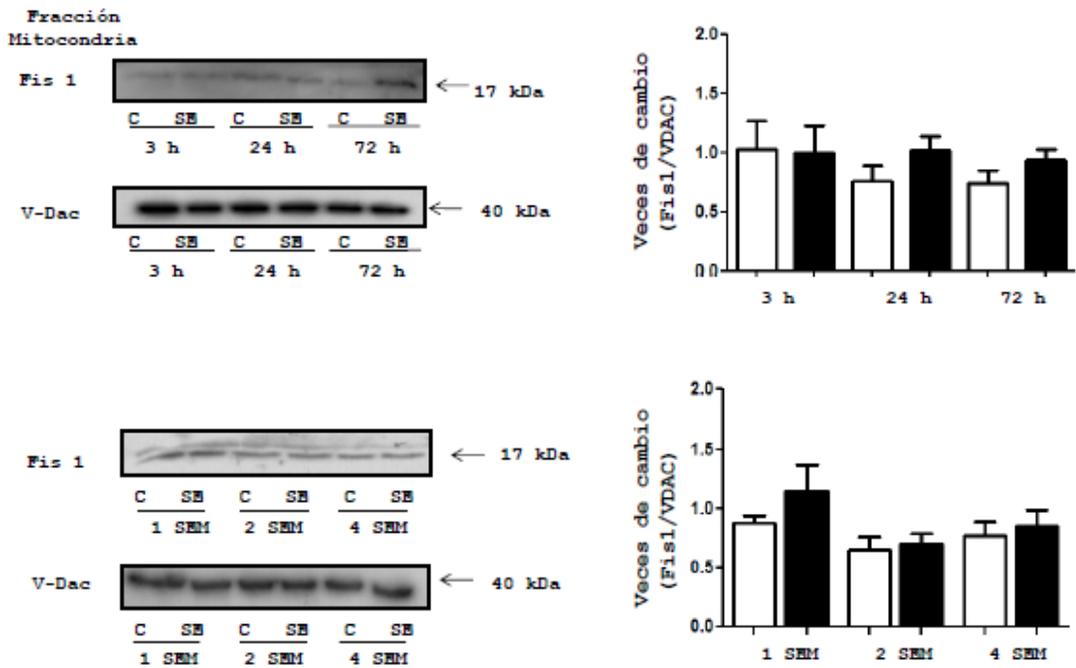


Figura 7. Expresión de la proteína de fisión mitocondrial (Fis 1) después del SE. Análisis de Western blot muestra la expresión de Fis 1 en la fracción mitocondrial de hipocampos de ratas controles (barras blancas) y post SE (barras negras) a tiempos de 3, 24, 72 h, 1, 2 y 4 semanas, n=6. Puede apreciarse en los gráficos que en ninguno de los tiempos existen diferencias en la expresión de Fis 1 con respecto al control. Todos los datos se presentan como Promedio \pm Error Estándar, t-test, $p < 0.05$

La proteína de fisión mitocondrial (Fis1) se encuentra en la membrana externa mitocondrial. Como se muestra en la figura 7 en todos los tiempos analizados, la expresión de Fis1 en la fracción mitocondrial no tiene diferencias significativas con respecto al control.

7.2 Análisis de la expresión de los genes *drp1* y *fis1* en muestras controles y post SE. Datos preliminares

Como se observa en la tabla 3 la expresión génica de *drp1* a las 3 h y 24 h varía entre los tiempos siendo menor a las 3h y mayor a las 24h con respecto al gen constitutivo. En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para *fis1*; en ella se advierte que los niveles de expresión no cambian a los tiempos mencionados.

Tabla 3. Veces de cambio de *drp1* a las 3 y 24 horas post SE, respecto al gen constitutivo (beta-actina).

Gen	Eficiencia de reacción	Expresión
Actina	1.00	1.000
Drp1 3h	0.92	0.598
Drp1 24h	0.92	1.566

Tabla 4. Veces de cambio de *fis1* a las 3 y 24 horas post SE, respecto al gen constitutivo (beta-actina).

Gene	Eficiencia de reacción	Expresión
Actina	1.0	1.000
Fis1 3h	0.92	0.992
Fis1 24h	0.92	1.100

8. DISCUSIÓN

La epilepsia es una patología neurológica que afecta a todas las edades, estratos socioeconómicos, sexos, razas, etc. Este padecimiento representa un problema de salud muy importante el cual afecta severamente la calidad de vida laboral, familiar y social del paciente que lo padece.

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es el tipo de epilepsia más frecuente y que posiblemente el 20% de los pacientes con éste padecimiento la presentan (Samba y Kuruba, 2013). Con base en esto, el uso de modelos animales que mimeticen la epilepsia resulta importante para un mejor conocimiento de la fisiopatología de dicho padecimiento. Por ello, en éste trabajo se empleó el modelo de inducción de *SE* con litio-pilocarpina del cual se han reportado características histológicas y fisiológicas similares a la ELT en humanos.

A pesar de los estudios que se han realizado para conocer cuáles son los factores que generan daño neuronal en la epilepsia, los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la lesión neuronal inducida por convulsiones no se han estudiado de forma clara y las estrategias para proteger al cerebro de una lesión inducida por convulsiones todavía están limitados (Qui y cols., 2013). Los mecanismos que permiten que un cerebro normal se convierta en epiléptico aún son poco claros, Actualmente no existen datos sobre los cambios en la expresión génica o proteica de la proteína de Drp1 y Fis1 en un curso temporal post *SE*.

Se sabe que en las células neuronales sanas, la fusión y la fisión mitocondrial, están en balance continuo para controlar el tamaño, forma y movimiento desde el cuerpo neuronal hasta los axones y dendritas (Hermachandra y cols., 2009). Existe evidencia experimental que apoya la idea de que un desbalance orientado hacia la modificación de los procesos de fisión mitocondrial juega un papel importante en la progresión de enfermedades en las que se afecta al SNC, por ejemplo en la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y Huntington (Bueler, 2009; Wang y cols., 2009; Shirendeb y cols., 2011; Cho y cols., 2013). Se han reportado interacciones aberrantes entre Drp1 y proteínas como Parkin o PINK1 (Lutz y cols., 2009), beta-

amieloide (Cho y cols., 2009) implicadas en las patologías ya enlistadas, de tal forma que se pueden alterar los mecanismos de la fisión mitocondrial y generar la muerte celular (Reddy, et. al., 2011).

Este es uno de los primeros reportes del análisis de la expresión de la proteína Drp1 a tiempos agudos y crónicos post *SE*. Los resultados obtenidos del análisis de la expresión de Drp1 en la fracción citosólica a las 3 h post *SE* indican un aumento que no es estadísticamente significativo con respecto al control; sin embargo, a las 24 h se observa un incremento significativo en la expresión de la proteína Drp1, mientras que a las 72 h se observa una disminución que llega a niveles basales. Al analizar la expresión de Drp1 en la fracción mitocondrial, no se observan cambios significativos a tiempos de 3 h, 24 h y 72 horas. Los resultados sugieren que, aunque en la fracción citosólica a las 24 h se evidencia un aumento significativo en la expresión de Drp1, la proteína no se transloca a la membrana externa mitocondrial (ver Fig. 5).

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio coinciden con los reportados por Qui y cols. (2013), quienes observaron un incremento en la expresión de Drp1 estadísticamente significativo las 3 horas y 24 h post *SE* respecto a los controles, así como una disminución en la expresión de la proteína a las 48 h sin llegar a niveles basales. Sin embargo, a diferencia de nuestro proyecto, en el trabajo de Qui y cols., (2013), no se realizó un fraccionamiento celular, por lo que se reportó un incremento en la expresión de la proteína del extracto total; con sus resultados no se puede concluir que existe fisión mitocondrial la cual, induce la vía intrínseca de la apoptosis por la liberación de proteínas proapoptóticas (Qui y cols., 2013).

Al analizar la expresión de Drp1 a tiempos de 1, 2 y 4 semanas después de la inducción del *SE*, no se observan cambios significativos, aunque a las 2 semanas se nota una tendencia a la disminución de la cantidad de ésta proteína en la fracción citosólica y una tendencia al incremento en la fracción mitocondrial.

Por otra parte, se sabe que Drp1 es regulada por diferentes modificaciones post traduccionales entre las que se encuentran las fosforilaciones, sumoilaciones y nitrosilaciones (Dickey y Strack, 2011; Otera y Mihara, 2011).

Una de las modificaciones más estudiadas es la fosforilación en residuos de serina del dominio variable y del dominio efector de Drp1. Cada uno de estos sitios se fosforila por diferentes cinasas. Actualmente, se sabe que la cinasa de membrana externa mitocondrial PKA/AKAP1 media la fosforilación de la serina 656 (localizada en el carboxilo terminal del dominio efector de GTPasa) lo cual induce elongación mitocondrial y neuroprotección; al ser desfosforilada por PP2A/B β 2, se promueve la fragmentación mitocondrial y la despolarización neuronal (Strack y cols., 2011). Hasta el momento no se han hecho estudios de las alteraciones de dichos mecanismos en epilepsia. En nuestro trabajo sólo se detectó la presencia de la proteína Drp1, no su estado de fosforilación por lo que sería interesante realizar dicha evaluación en los tiempos utilizados en este trabajo, pues se sabe que aunque no cambie la cantidad de proteína, bajo ciertos estímulos sí cambian los estados de fosforilación (Merrill y cols., 2013).

A diferencia de las dinaminas clásicas, las *DRPs* requieren de proteínas adaptadoras que permitan anclar a Drp1 con la membrana externa mitocondrial. Fis1 es una proteína adaptadora, la cual recluta a Drp1 desde el citoplasma hacia la membrana externa mitocondrial. La evaluación de la expresión de Fis1 se realizó a los tiempos ya indicados y como se puede observar en la figura 7 no se presentaron cambios significativos en la expresión de dicha proteína. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con Otera y cols., en el 2010, en los que se demostró que la supresión del gen Fis1 de células HCT116 (carcinoma colorrectal humano) no modificaba la morfología o reclutamiento de Drp1 a la membrana externa mitocondrial y por lo tanto no se induce la fisión mitocondrial.

Además de Fis1, se sabe que existen otras proteínas que interactúan con Drp1 para que sea reclutada y se lleve a cabo la fisión mitocondrial, una de ellas el Factor de Fisión Mitocondrial (Mff, *Mitochondrial fission factor*) del cual se ha demostrado que

se une directamente a Drp1 con la membrana externa mitocondrial lo que incrementa la fisión de dicho organelo (Otera y cols., 2010). Otras proteínas adaptadoras son los factores de elongación mitocondrial 1 (MiD49 y MiD51) los cuales son capaces de formar un complejo de inhibición o activación de la fisión mitocondrial (Wilson y cols., 2013; Bui y Shaw, 2013). A partir de éstos datos sería interesante saber cuál es el papel de éstas proteínas adaptadoras en condiciones post *SE* y la relación que guardan con la fisión mitocondrial.

Además del análisis de la expresión de las proteínas Drp1 y Fis1, se realizó el análisis de la expresión del transcrito de cada una por medio de PCR en tiempo real., cabe señalar que los resultados presentados en éste trabajo son preliminares pues sólo se reporta la expresión del transcrito sin la realización de un análisis estadístico. Así, puede observarse que para *drp1* la cantidad del transcrito tiende a disminuir con respecto al gen constitutivo a las 3h y a aumentar 24h post *SE*. Para *fis1* no se aprecian variaciones en su expresión a ninguno de los tiempos evaluados (tabla 2 y 3).

Lo anterior indica que existen diferentes puntos de regulación entre la transcripción del gen y la traducción de la proteína Drp1 durante el periodo agudo del *SE*.

9. CONCLUSIONES

1. En la fracción citosólica, la expresión de la proteína Drp1, fue significativamente mayor a las 24 h post *SE* con respecto al control.
2. La expresión de Fis1 no mostró cambios significativos post *SE*.
3. La expresión del gen *drp1* disminuye a las 3 h post *SE* y se observa una tendencia a incrementarse a las 24 horas post *SE*.
4. La expresión del gen que codifica para Fis1 no muestra cambios en el transcrito a los tiempos de 3 h y 24 h post *SE*.

10. PERSPECTIVAS

- Analizar cambios en la principal modificación postraduccional (fosforilación) que sufre Drp1 y su relación con la translocación de dicha proteína a la MMO.
- Realizar el análisis estadístico para la expresión del transcrito de *drp1* y *fis1*.
- Realizar el análisis de la ultraestructura mitocondrial a través de microscopía electrónica de transmisión de las regiones CA1 y Giro dentado (las cuales se ven afectadas después del SE).
- Evaluar los cambios en la expresión de las proteínas adaptadoras Mff y MiD49/51 de la proteína Drp1, bajo las mismas condiciones establecidas en este trabajo.
- Analizar los cambios en la expresión de las proteínas de fusión mitocondrial a los tiempos mencionados en éste trabajo.

11. ANEXO

Soluciones y amortiguadores utilizados en el análisis del contenido de las proteínas de Fisión mitocondrial (Drp1 y Fis1) en hipocampo de ratas controles y con SE

Solución de carga 5X

SDS	20.0 g
Glicerol	100.0 mL
DTT	15.4 g
TRIS 0.5M pH 8.5	26.0 mL
Azul de bromofenol	0.1 g

Aforar con agua destilada a un volumen final de 200 mL.

Solución de corrida 10X

Tris base	30.0 g
Glicina	144.0 g
SDS	10.0 g
H ₂ O	1.0 L

Solución de lisis

Tris-HCl	20 mM
EDTA	2 mM
NaCl	20 mM
Tritón X-100	1%
Glicerol	10%

Agregar media tableta de inhibidores de proteasas (cOmplete-Roche).

Solución de sacarosa para el fraccionamiento celular.

Sacarosa	0.25 M
Tris-HCl	15 mM (pH 7.9)
KCl	16 mM
NaCl	15 mM
EDTA	5 mM
EGTA	1 mM
DTT	1 mM

Ajustar pH 7.4 con HCl y aforar (con agua bidestilada) a un volumen final de 1L.

Solución de stripping

Glicina	15 g
SDS	1 g
Tween 20	10 mL

Agitar vigorosamente, ajustar pH 2.2 con HCl y aforar con agua bidestilada a un volumen final de 1L.

Solución de transferencia 10X

Tris base	151 g
Glicina	720 g
H ₂ O	5 L

Para obtener 1 L de amortiguador 1X tomar 100 mL de la solución 10X, añadir 700 mL de H₂O y 200 mL de metanol.

Persulfato de amonio 10%

Persulfato de amonio	0.1 g
Agua destilada	1 mL

Protocolo para preparar geles discontinuos y desnaturalizantes

Geles de acrilamida-bisacrilamida (29:1) al 12%

Gel separador:

H ₂ O	4.53 mL
Acrilamida	5.30 mL
Tris pH 8.8	3.33 mL
SDS 10%	125 µL
APS 10%	125 µL
TEMED	15µL

Gel concentrador:

H ₂ O	1.36 mL
Acrilamida	340 mL
Tris pH 8.8	260 µL
SDS 10%	20 µL
APS 10%	20 µL
TEMED	20 µL

Amortiguador para gel concentrador (0.5 M)

Disolver 90.75 g de Tris-base en 375 mL de agua destilada. Ajustar el pH 8.8 y aforar el volumen a 500 mL.

Amortiguador para gel separador (1.5 M)

Disolver 30.00 g de Tris-base en 400 mL de agua. Ajustar el pH 6.8 y aforar con agua a un volumen final de 500 mL.

Rojo Ponceau

Ácido acético 100%	5.0 mL
Agua destilada	95.0 mL
Rojo Ponceau	0.1 mL

Solución de Acrilamida-Bis acrilamida (29:1)

Acrilamida	141.13 g
Bis acrilamida	5.00 g

Se disuelve en 200 mL de agua destilada, se lleva al aforo (500 mL) y se filtra al vacío.

Solución de bloqueo 5%, para dos membranas

Se pesan 0.5 g de leche descremada y se disuelven en 10 mL de TBS-T 1X

Solución PBS A para 5 L

NaCl	50.00 g
KCl	1.25 g
Na ₂ HPO ₄	7.05 g
KH ₂ PO ₄	1.25 g

Ajustar el pH a 7.4 con HCl y aforar a un volumen final de 5 L con agua destilada.

Amortiguadores y protocolos utilizados en el análisis de la expresión de los genes codificantes de las proteínas de fisión mitocondrial (Drp1 y Fis1)

Gel de agarosa al 0.8%

Para 100 mL de disolución se pesan 0.8 g de agarosa y se disuelven en 100 mL de agua DEPC 0.1%.

Protocolo de síntesis de cDNA

MIX 1	
RNA	μL necesarios para tener 5 μg de muestra
Primer oligo (dT)18	1 μL
Agua	c.b.p 12 μL

MIX 2	
Amortiguador de Rx 5X	2 μL
Ribolock	0.5 μL
10 mM dNTP Mix	1 μL
RT (Reverted Aid)	0.5 μL

Las cantidades representadas en las tablas son las necesarias para realizar una reacción. El MIX 1 se mezcla y posteriormente en el termociclador se corrieron a

60°C por 5 min. Enseguida se le agrega el MIX 2. Una vez realizada la mezcla se prosigue con la reacción para la síntesis de cDNA, incubando por 60 min a 42° C con una extensión final de 70°C por 5 minutos.

Protocolo para la reacción de PCR en tiempo real

En una placa de reacción se añadió en el siguiente orden 5 µL del mix de SYBER GREEN, oligo Fw (+) 10 µM, oligo Rv (-) 10 µM, 1 µL de templado y 2 µL de agua.

Solución TAE al 1X

Para obtener 1 L de TAE 1X tomar 100 mL de la solución 10X y aforar con 900 mL de agua libre de RNAsa

12. APÉNDICE

Inducción de *SE* en ratas macho de la cepa Wistar.

La caracterización de la ELT en ratas macho de la cepa Wistar se realizó empleando Litio-pilocarpina, un modelo de tipo químico-crónico. Aproximadamente treinta minutos después de la administración subcutánea de pilocarpina, a la dosis indicada en el apartado de material y método, se observaron las cinco etapas de la escala de Racine en la cual la severidad de las convulsiones se manifiesta con cambios conductuales hasta la aparición del *SE*. Dichos cambios observados fueron acinesia, piloerección, temblor, salivación, movimientos de cabeza, clonus de miembros anteriores, posición de canguro, pérdida de la postura corporal y crisis límbicas repetidas o *SE*, la última etapa que se deseaba observar. De manera representativa, en la figura 1 se observa una rata en la fase de *SE* la cual ha perdido la postura corporal, presenta salivación y movimientos involuntarios de cabeza. Los animales que no manifestaron los niveles 4 y 5 de la escala de Racine fueron descartados del protocolo experimental.

Los hipocampos disecados de ratas controles y aquellas que entraron en *SE* fueron empleados para el análisis por PCR y Western blot.



Figura 1. Rata macho de la cepa Wistar en *SE*. Se ejemplifica el *SE* inducido con Litio-pilocarpina; puede observarse la postura de canguro, salivación y movimientos involuntarios de la cabeza.

Estandarización del protocolo para WB

En esta parte experimental se analizó el contenido de las proteínas Drp1 y Fis 1 en las muestras controles y post *SE*. Se sabe que Drp1 presenta diferentes isoformas y para determinar cuál de las isoformas de Drp1 era detectada por el anticuerpo, se alinearon las secuencias peptídicas de las isoformas (tabla 1) con la secuencia de la proteína proporcionada por la casa comercial (Santa Cruz Biotechnology). El resultado del alineamiento (Fig 3) indicó que el anticuerpo empleado y la isoforma 1 de Drp1 corresponden.

Para evaluar los cambios en la expresión a nivel de proteína de Drp1 y Fis1, con base en su localización celular, se realizó la estandarización de las condiciones para obtener la fracción citosólica y mitocondrial de los tejidos disecados. Se emplearon como controles de carga a la proteína del citoesqueleto beta-actina, en el caso de la fracción citosólica, y la proteína del canal aniónico voltaje dependiente (VDAC) para la mitocondrial. En la figura 2 se muestra la validación del método de fraccionamiento celular, donde la figura representativa del gel en el carril 3 y 4 correspondientes a la fracción mitocondrial se detecta la expresión de VDAC, y no de la proteína citoplásmica de beta-actina. Este resultado nos permite asegurar que los cambios en la expresión de las proteínas ocurren en la mitocondria.

Tabla 1. Isoformas del gen *drp1*. Los datos han sido tomados de la base de datos ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)

Nombre	ID transcrito	Tamaño bp	Proteína (aa)	Peso kDa
<i>Dnm1l-201</i>	ENSRNOT00000002478	3183 bp	755 aa (view)	83
<i>Dnm1l-202</i>	ENSRNOT00000002479	3150 bp	744 aa (view)	82
<i>Dnm1l-203</i>	ENSRNOT00000002482	3072 bp	718 aa (view)	80
<i>Dnm1l-204</i>	ENSRNOT00000002477	3066 bp	716 aa (view)	79
<i>Dnm1l-205</i>	ENSRNOT00000002485	2896 bp	685 aa (view)	77

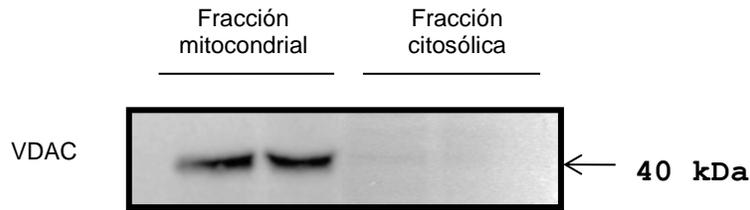


Figura 2. Estandarización de la técnica de Western Blot para el análisis de la expresión de las proteínas Drp1, Fis1. Las fracciones mitocondriales y citosólicas se separaron en un gel SDS-PAGE al 12 %. Se observa en la fracción mitocondrial una banda en 40 kDa, mientras que ésta no aparece en la fracción citosólica.

```

ENSRNOT00000002477_ISOFORMA 4   K-----LIQDNRRETKNVASAGGGIGDGG 555
DNML1_SANTA_CRUZ_ANTICUERPO     KSSKVPSALAPASQEPSPAASAEADGKLIQDSRRETKNVASGGGVGDG- 580
ENSRNOT00000002478_ISOFORMA 1   KSSKVPSALAPASQEPSPAASAEADGKLIQDNRRETKNVASAGGGIGDGG 594
ENSRNOT00000002482_ISOFORMA 3   K-----VASAGGGIGDGG 557
ENSRNOT00000002485_ISOFORMA 5   K-----VASAGGGIG--- 527
ENSRNOT00000002479_ISOFORMA 2   KSSKVPSALAP-----ASQEPSPAASAEADGKVASAGGGIGDGG 583
                                     *                                     ***.***:*

```

Fig 3. Alineamiento de las secuencias peptídicas de las cinco isoformas de DNML (Drp1) y del Anticuerpo Primario anti Drp1. El alineamiento se realizó con el programa Clustal W.

Resultados de la estandarización de las condiciones de amplificación del gen *drp1*, *fis1* y *actina*.

Se analizó la calidad de las muestras por medio un gel de agarosa. En la Figura 4 se muestra un gel representativo en el cual se observa la integridad de la subunidades antes mencionadas, ausencia de DNA genómico y ausencia de degradación

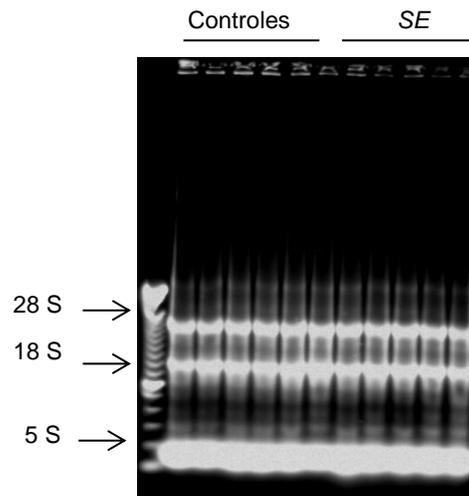


Figura 4. Gel representativo del análisis de la integridad del RNA extraído de ambos Hipocampus de rata.

Se observan las subunidades 28 S, 18 S y 5 S ribosomales y no se observa DNA genómico.

Debido a que la cuantificación precisa de los ácidos nucleicos es esencial para el análisis de la expresión de genes, la concentración y pureza del RNA obtenido fueron determinadas. La pureza se estimó empleando espectrometría ($\lambda_{260}/\lambda_{280}$), tomando valores entre 1.7-1.9 como aceptables.

Una vez verificada la calidad y pureza del RNA, se realizó la transcripción reversa para generar cDNA a partir del RNA; el cDNA obtenido se cuantificó por espectrometría. Se estandarizaron las condiciones de temperatura, tiempos y número de ciclos para llevar a cabo una reacción de PCR eficiente para cada uno de los genes (ver figura representativa 4). Los oligonucleótidos utilizados han sido diseñados por la casa comercial SIGMA.

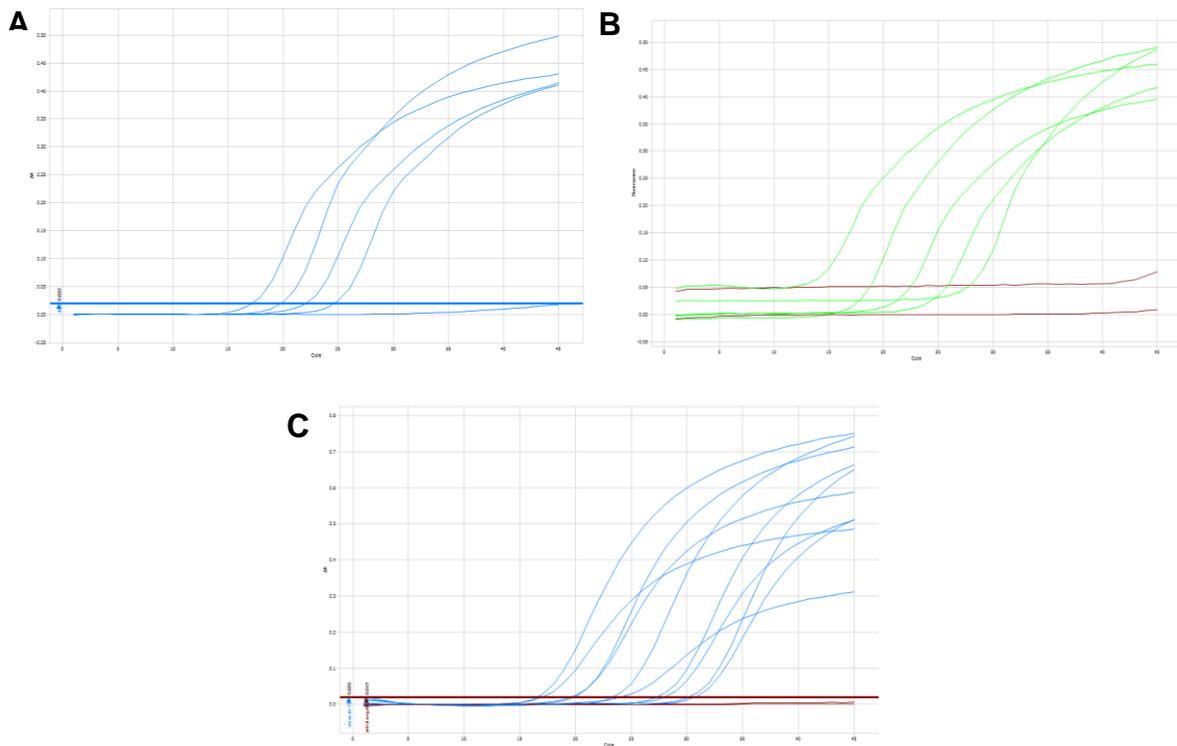


Figura 5. Figura representativa de la amplificación del gen *drp1* (A), *beta actina* (B) y *fis1* (C) en diluciones de cDNA obtenido por retrotranscripción. Puede apreciarse el cambio en la fluorescencia del SYBR Green contra el número de ciclos. Se corrieron dos réplicas para cada cantidad de cDNA. Como control interno se utilizó el gen constitutivo de *beta actina*, como control negativo se emplearon todos los reactivos de PCR sin cDNA.

La evaluación de la eficiencia de la reacción de PCR se realizó graficando los valores de Ct (ciclo umbral o *threshold cycle*) vs concentración del cDNA en base 10 (figura 6). Con base en las curvas estándar se determinaron las condiciones óptimas para la reacción de PCR. Los marcadores de una reacción eficiente son la linealidad (R^2 mayor de 0.980) y una alta eficiencia de amplificación (90-105%). Como se observa en la tabla para cada uno de nuestros ensayos se obtuvieron valores de R^2 mayores a 0.990 y % eficiencia dentro de los valores establecidos, dicha eficiencia asegura la reproducibilidad de los resultados. Con los parámetros ya mencionados, para *drp1* la T_m empleada ha sido de 60 °C, para *fis1*, 63 °C y para *actina* de 57 °C.

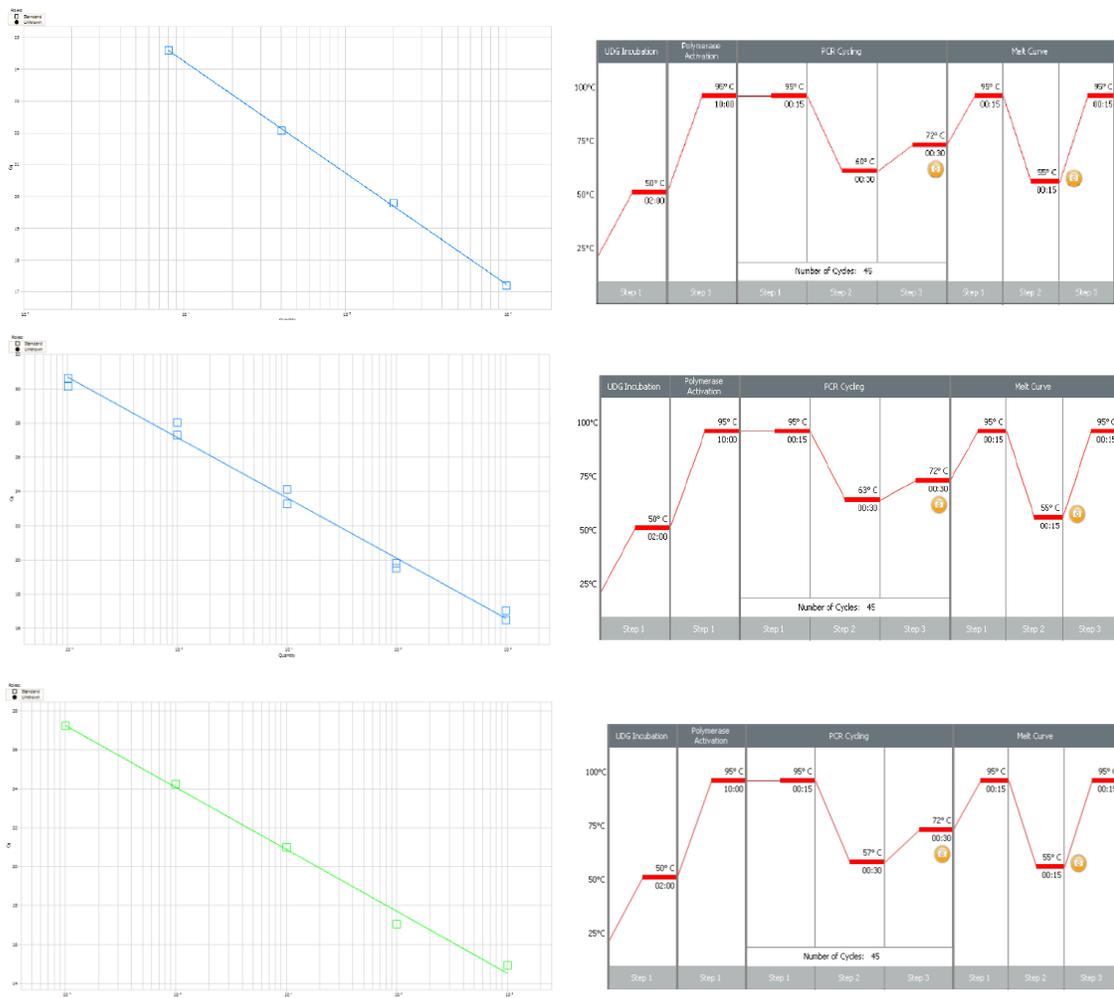


Figura 6. Curva estándar para *drp1* (A), *fis1* (B) y *beta-actina* (C). Cada curva estándar se realizó empleando diluciones por duplicado en base 10 del templado (cDNA). La T_m para *drp1* fue de 60 °C, mientras que para *fis1* y *beta-actina* fue 63°C y 57 °C respectivamente. A la derecha de cada curva estándar se observan las condiciones de la reacción.

Tabla 2. Cálculo de la eficiencia de la reacción de los genes *drp1*, *fis1* y *actina*.

Curva para	Slope	Ordenada al Origen (OO)	R ²	% Eficiencia
<i>Drp1</i>	-3.506	27.758	0.999	92.85
<i>Fis1</i>	-3.530	27.168	0.992	91.99
<i>actina</i>	-3.181	24.073	0.994	100.6

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo, C., Miranda, C., Campos, M., Caraballo, R., Carpio, A., Cuadra, L. y Sander, L. (2008). Informe sobre la Epilepsia en Latino América. Obtenido de <http://www.ibe-epilepsy.org/downloads/Latin%20American%20Regional%20Report%20Spanish.pdf>
2. Aguado Aguilar, L. (13 de Julio de 2014). Aprendizaje y memoria. Obtenido de <http://www.uninet.edu/union99/congress/confs/bas/01Aguado.html>
3. Ben-Ari, Y. (2001). Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia*, 42, 5-7.
4. Berman, S. B., Pineda, F. J. y Hardwick, J. M. (2008). Mitochondrial fission and fusion dynamics: the long and short of it. *Cell Death and Differentiation*, 15, 1147–1152.
5. Blik, A., Shen, Q., y Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biology*, 5(6), 1-17.
6. Bozzi, Y., Casarosa, S. y Caleo, M. (2012). Epilepsy as a neurodevelopmental disorder. *Front. Psychiatry*, 3, 19.
7. Bueler H (2009) Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 218:235–246.
8. Bui, H T y Shaw, JM. (2013). Adapt and Divide: The Emerging Importance of Dynamin Adaptors in Mitochondrial Fission. *Current biology*, 19, 1-23.
9. Charria Ortiz, G. A. (2007). Genética de las Epilepsias. *Medicina Buenos Aires*, 67, 1-13.
10. Chen S.D., Chang, A. Y. y Chuang, Y. C. (2010) The potential role of mitochondrial dysfunction in seizure-associated cell death in the hippocampus and epileptogenesis. 42(6), 461-465.
11. Cho, B., Choi, S. Y., Cho, M. H., Kim, H. J., y Sun, W. (2013). Physiological and Pathological Significance of Dynamin-Related Protein 1 (Drp-1)-Dependent Mitochondrial Fission in the Nervous System. *Experimental Neurobiology*, 22(3), 149-157.
12. Cho, D.H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z. y Lipton, S.A., (2009) S-Nitrosylation of Drp1 Mediates β -Amyloid-Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury, *Science*, 102-105.
13. Clancy, M. J., Clarke, M. C., Connor, D. J., Cannon, M. y Cot, D. R. (2014). The prevalence of psychosis in epilepsy; a systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry*, 14:75

14. Cobos, I., Calcagnotto, M. E., Vilaythong, A. J., Thwin, M. T., Noebels, J. L., Baraban, S. C., y Rubenstein, J. L. (2005). Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nature Neuroscience*, 8, 1059 - 1068.
15. Curia, G., Longob, D., Biagini, G., S.G. Jones, R., y Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*, 172(2-4), 143-157.
16. de Cabo de la Vega, C., Villanueva Hernández, P., y Prieto Martín, A. (2006). Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Revista de Neurología*, 42, 159-168.
17. de Felipe Oroquieta, J., Arellano, J. I., Alonso, L., y Muñoz, A. (2001). Neuropatología de la epilepsia del lóbulo temporal. Alteraciones primarias y secundarias de los circuitos corticales y epileptogenicidad. *Revista de Neurología*, 34, 401-408.
18. Dickey, A., y Strack, S. (2011). PKA/AKAP1 and PP2A/BB2 Regulate Neuronal Morphogenesis via Drp1 Phosphorylation and Mitochondrial Bioenergetics. *J Neuroscience*, 31 (44), 15716-15726.
19. Duncan, J. S., Sander, J. W., Sisodia, S. M. y Walker, M. C. (2006). Adult epilepsy. *The Lancet*, 367, 1087–1100.
20. Elgass, K., Pakay, J., Ryan, M. T., y Palmer, C. S. (2013). Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833, 150-161.
21. Engel, J. (1996). Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 26, 141-150.
22. Engel, T. y Henshall, D. (2009). Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizures-damage and epileptogenesis? *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 1(2), 97-115.
23. García García, M. E., García Morales, I., y Matías G, J. (2009). Modelos experimentales en epilepsia. *Neurología*, 181-188.
24. García Rodríguez, P. L. (2012). Diagnóstico y tratamiento del estado epiléptico. *Revista Cubana de Neurología y Neurocirugía*, 2(2), 150-66.
25. Gómez, A. J., y Bellas Lamas, P. (2011). Nueva clasificación de las epilepsias de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE): ¿un paso en dirección equivocada? *Revista de Neurología*, 52(9), 541-546.
26. Guo, X., Disatnik, M. H., Monbureau, M., Shamloo, M., Rosen, D. M. y Qi, X. (2013). Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington's disease-associated neurodegeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(12), 5371–5388.
27. Reddy, P.H., Moa, P., y Manczak, M. (2009). Mitochondrial Structural and Functional Dynamics in Huntington's Disease. *Brain Res Rev*, 61(1), 33-48.
28. Reddy P.H., Reddy T.P., Manczak M., Calkins M.J., Shirendeb U., Mao P. (2011) Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 67:103–118.

29. Herrera Peco, I., Fernández Millares, V., Pastor, J., Hernando Requejo, V., Sola, R. G., y Alonso Cerezo, C. (2009). Factores genéticos asociados a la epilepsia del lóbulo temporal. *Revista de Neurología*, 49, 541-546.
30. Haun, F., Nakaruma, T. y Lipton S.A., (2013). Dysfunctional Mitochondrial Dynamics in the Pathophysiology of Neurodegenerative Diseases. *J Cell Death*. 2013 ; 6: 27–35.
31. Hui Yin, Y., Ahmad, N. y Makmor Bakr, M. (2013). Pathogenesis of epilepsy: challenges in animal models. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(11), 1119-1132.
32. Ishihara, J., Nomura, M., y Jofuku, A. (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nature Cell Biology*, 11, 958-966.
33. Jiménez, L. F. (2003). Biología celular y molecular. México: Pearson Educación.
34. Kang , H. C., Lee, Y. M. y Kim, H. D. (2013). Mitochondrial disease and epilepsy. *Brain Dev*, 35, 757-761.
35. Karbowski, M. y Youle, R.J., (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 10, 870–880
36. Knake, S., Hamer, H. M., y Rosenow, F. (2009). Status epilepticus: A critical review. *Epilepsy y Behavior*, (15), 10-14.
37. Knott A, B. y Bossy Wetzel, E. (2008). Impairing the Mitochondrial Fission and Fusion Balance: A New Mechanism of Neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.*, 1147, 283-292.
38. Knott, A. B., Perkins, G., Schwarzenba, R. y Bossy Wetzel, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nature Review*, 9(7), 505-518.
39. Krzysztof, K y Sendrowski, W. (2013). Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. *Pharmacological Reports*, 65(3), 555-565
40. Kuznetsov, A. V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P., y Margreiter, R. (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int. J Biochem. Cell Biol.*, 41 (10), 1928-1939.
41. Liesa , M., Palacín, M. y Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Res*, 89(3), 799-845.
42. López Hernandez, E., y Solís, H. (2012). Epilepsia del lóbulo terporal y las neuronas hipocampales de las regiones CA1 y CA3. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 55(5), 1-25.
43. López Meraz, M. L. (20 09). Conceptos básicos de la epilepsia. *Revista Médica de la Universidad de Veracruz*, 31-37.
44. Luengo, O. A. (15 de Abril de 2014). Guía Andaluza de Epilepsia. Obtenido de www.guiasade.com

45. Lüttjohann, A., Fabene, P. F., y van Luijtelaa, G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology y Behavior*, 98, 579-586
46. Lutz, A.K., Exner, N., Fett, M.E., Schlehe, J.S., y cols., (2009) Loss of Parkin or PINK1 Function Increases Drp1-dependent Mitochondrial Fragmentation, *The Journal of Biological chemistry*, 34, pp. 22938–22951.
47. Maestú, F., Martín, P., Sola, R., y Ortiz, T. (1999). Neuropsicología y deterioro cognitivo en la epilepsia. *Revista de Neurología*, 28, 793-798.
48. Medicine, H. C. (01 de Julio de 2014). *UNC Health Care and UNC School of Medicine.* Obtenido de <http://www.med.unc.edu/neurology/files/documents/child-teaching-pdf/Epilepsy%20BASICORE.pdf>
49. Merrill, R., Dagda, R., Dickey, A., Cribbs, J., Green, S., Usachev, Y., y Strack, S. (2011). Mechanism of Neuroprotective Mitochondrial Remodeling by PKA/AKAP1. *PLoS Biology*, 9(4), 1-22.
50. Williams M. y Kim. K. (2014). From membranes to organelles: Emerging roles for dynamin-likeproteins in diverse cellular processes. *European Journal of Cell Biology*, 93, 267-277.
51. Miranda H, H., y Godoy, J. (01 de Enero de 2015). Cuadernos de Neurología. Obtenido de Universidad Católica de Chile: <http://escuela.med.puc.cl/publ/cuadernos/2006/Indice.html>
52. Morimoto, K., Fahnstock, M y Racine, R. (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in Neurobiology*, 73(1), 1-60.
53. Müller, C. J., Bankstahl, M., Gröticke, I., y Löscher, W. (2009). Pilocarpine vs. lithium–pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: Development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. *European Journal of Pharmacology*, 619, 15-24.
54. Muñiz Hernando, E., Velasco Sanz, T., Albarracín Fernández, C., Correa Canales, M., Morales Abad, M., Lunar Hernández, R., Lauría Baca, L. E. (2000). La célula: origen, organización y estructura. *Biología*, pp 119-124, México: Mc Graw-Hill.
55. Navarra, U. d. (2011-2012). El genoma mitocondrial. Obtenido de <http://www.unav.es/ocw/genetica/tema-1-5.html>
56. OMS. (13 de Abril de 2014).www.who.int/es/
57. Otera, H., Wang, C., Cleland, MM., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R. J. y Mihara K., (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells, *191(6)*, 1141-1158.
58. Otera, H., y Mihara, K. (2011). Molecular mechanism and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J. Biochem*, 241-251.
59. Pallud , J., Le Van Quyen, M., Pellegrino, Labussiere, C., Cresto, N., Dieme, M. J., Baulac, M, Duyckaerts, C., Kourdougli, N., Chazal, G., Devaux, B., Rivera, C., Miles, R., Capelle, L.,

- Huberfeld, G. (2014). Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma, 6, 1-11.
60. Pedre, L. et al. (2008). Muerte neuronal en la neocorteza de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente a fármacos. *Neurología*, 23, 555-565.
61. Pereno, G. (2010). Fisiopatología de la Epilepsia del Lóbulo Temporal: Revisión del Proceso de Muerte Neuronal a la Neuroplasticidad. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento (RACC)*, 2, 46-57.
62. Purnell, P., y Fox, H. (2013). Autophagy-mediated turnover of Dynamin-related Protein 1. *Purnell and Fox BMC Neuroscience*, 14, 1-7.
63. Qi, X., Qvit, N., Su, Y.-C. y Rosen, M. (2012). A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *Journal of Cell Science*, 126, 789–802.
64. Qui, X., Cao, L., Yang, L., Zhao, X., Liu, X., Han, Y., y Chi, Z. (2013). Role of mitochondrial fission in neuronal injury in pilocarpine-induced epileptic rats. *Neuroscience*, 15, 157-165.
65. Racine, R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol*, 32, 281-294.
66. Ramachandra, R. (2011). Vesicle scission: Dynamin. *Seminars in Cell y Developmental Biology*, 22(1), 10-17.
67. Rodríguez Violante, M., Cervantes Arriaga, A., Vargas Cañas, S., y Corona, T. (2010). Papel de la función mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas. *Arch Neurocién (Mex) INNN*, 15(1), 39-46.
68. Safiulina, D., y Kaasik, A. (2013). Energetic and Dynamic: How Mitochondria Meet Neuronal Energy Demands, *PLoS Biology research article*, 1-4.
69. Samba Reddy, D., y Kuruba, R. (2013). Experimental Models of Status Epilepticus and Neuronal Injury for Evaluation of Therapeutic Interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18284-18318.
70. Schmittgen, T. D., y Zakrajsek, B. A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem Biophys*, 69-81.
71. Shang Der Chen, A. Y.-C. (2010). The potential role of mitochondrial dysfunction in seizure-associated cell death in the hippocampus and epileptogenesis. *J Bioenerg Biomembr*, 461–465.
72. Sharma, J., Johnston, M. V. y Hossain M. A., (2014). Sex differences in mitochondrial biogenesis determine neuronal death and survival in response to oxygen glucose deprivation and reoxygenation. *BioMed Central*, 15, 1-14.
73. Shirendeb U, Reddy AP, Manczak M, Calkins MJ, Mao P, Tagle DA, Reddy PH (2011) Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in

- Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20:1438–1455.
74. Sloviter, R. S. (2008). Hippocampal epileptogenesis in animal models of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: The importance of the "latent period" and other concepts. *Epilepsia*, 49 Sup 9, 85–92.
75. Smirnova, E., Griparic, L., Shurlan, D.L. y van der Blik A. M., (2001). Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 12(8), 2245-2256.
76. Téllez Zenteno, J. F., y Ladino, L. D. (2013). Epilepsia temporal: aspectos clínicos, diagnósticos y de tratamiento. *Rev Neurol*, 56, 229-242.
77. Torres Zambrano, M., Bustos Sánchez, J. L., y Granados Llamas, F. (2011). Fisiopatología del estatus epiléptico. *Acta Neurol Colomb*, 27, 1-20.
78. Treiman, D. M. (2001). GABAergic Mechanisms in Epilepsy. *Epilepsia*, 8-12.
79. Turski, W., Cavalheiro, E., Schwarz, M., Czuczwar, S., Kleinrok, Z., y L., T. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine I rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*, 315–335.
80. Velísek, L. (2006). Chemically-Induced Acute Seizures. En S. P. Pitkanen A, *Models of seizures and epilepsy*. Elsevier Academic Press. 127-152
81. Vezzani, A. (2009). Pilocarpine-induced seizures revisited: what does the model mimic? *Epilepsy Currents*,9(5), 146-148.
82. Volcy Gómez, M. (2004). Epilepsia del lóbulo temporal mesial: fisiopatología, características clínicas, tratamiento y pronóstico. *Revista de Neurología*, 38, 5.
83. Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA, Zhu X (2009b) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29:9090–9103.
84. Wasiak, S., Zunino, R y McBride, HM., (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 177, 439–450
85. Waterham , H., Koster, J., van Roermund, C., Mooyer, P., Wanders, R., y Leonard, J. (2007). A Lethal Defect of Mitochondrial and Peroxisomal Fission. *The new engl and journa l o f medicine*, 356(17), 1736-1741.
86. Weiser, H.-G. (2004). ILAE Commission Report.Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis . *Epilepsia*, 45(6), 695-714.
87. Wilson, T. J., Slupe, A. M., y Strack, S. (2013). Cell signaling and mitochondrial dynamics: Implications for neuronal function and neurodegenerative disease. *Neurobiology of Disease*, 51, 13-28.

88. Witte, M. E., Geurts, J. J., de Vries, H. E., van der Valk, P., y van Horssen, J. (2010). Mitochondrial dysfunction: A potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion*, 10(5), 411-418.
89. Zavala T, C., yLópez M, M. L. (2011). Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo. *Neurobiología. Revista Electrónica*, 16.
90. Zhang, Y., y Chan, D. (2007). Structural basis for recruitment of mitochondrial fission complexes by Fis 1. *PNAS*, 104 (47), 18526-18530.
91. Zorzano, A., Bach, D., Pich, S., y Palacín, M. (2004). Papel de nuevas proteínas mitocondriales en el balance energético. *Revista Médica Universidad de Navarra*, 48(2), 30-35.
92. Zorzano, A., Segalés, J., Hernández-Álvarez, M. I., y Sorianello, E. (2012). Dinámica mitocondrial y sus implicaciones en la desregulación metabólica y en la neurodegeneración. Obtenido de Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XXXVI: Sistema mitocondrial: un reto en la medicina humana: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1342>