

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

IMPRESIÓN DE INFORME TECNICO

Revisión de Informe Técnico

Fondo:	S0008- FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE
Solicitud:	000000000261481- La función sensorial como biom
Etapas: 003	ETAPA 3
Título:	La función sensorial como biom
ID Usuario:	X_rguevara2289
Nombre:	GUEVARA GUZMAN ROSALINDA
formato:	SC_INFTEC01 INFORME TÉCNICO PARCIAL
Fecha de Envío:	08-AUG-19

Reporte de Informe Técnico

Sección:	SC_SEC35
Pregunta:.	1.- Informe sobre las metas alcanzadas tomando en cuenta las programadas en esta etapa.
Respuesta:	<p>El enfoque de la tercera etapa fue comprobar que existen alteraciones en estructuras funcionales, genéticas y moleculares neuroinflamatorias en áreas cerebrales y que estas alteraciones correlacionarán con la función sensorial olfatoria. Así como la exploración de los miRNAs en corteza temporal nos permitirá identificar blancos potenciales que sean de utilidad en el diagnóstico temprano de pacientes con ELTm. Para responder este planteamiento se desarrollaron los siguientes objetivos. a) Evaluar la sensibilidad olfatoria de pacientes con ELTM farmacorresistente y que sean candidatos a cirugía de epilepsia. Se realizaron las pruebas de umbral, identificación y reconocimiento, discriminación y memoria olfatoria. Para la identificación y reconocimiento. El paciente se expuso a diferentes concentraciones de aromas: Vainilla, Canela, Limón, Estoraque Estos se presentaron en un dispositivo tipo ¿plumón¿ en diferentes porcentajes de dilución: 10, 25, 50 y 100 %. El paciente fue expuesto a de los diferentes aromas, comenzando de mayor a menor concentración del aroma. En cada exposición se le preguntó al paciente: ¿percibe algún aroma?, ¿puede reconocer que aroma es? Resultados. Potenciales Evocados: Los parámetros estudiados fueron latencia inicio de la onda p300 y la amplitud de esta. Se observa en pacientes con ELTm disminución en el tiempo de latencia después de estímulo olfatorio, comparado con el grupo control. Amplitud: En el caso de la amplitud de la onda P300, no se observan diferencias significativas entre los grupos durante la administración del estímulo olfatorio B). Identificación de cambios a nivel de la barrera hematoencefálica de pacientes con epilepsia farmacorresistente. Diseño experimental Para este estudio se recolectó neocorteza temporal de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (ELTM) farmacorresistente de la Clínica de Epilepsia del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía ¿Manuel Velasco Suárez¿ (n=15). Grupo I: ELTM secundaria a esclerosis hipocampal. Este grupo incluyó a 12 pacientes: 8 sujetos femeninos (66.6%) y 4 sujetos masculinos (33.3%). La edad promedio de este grupo fue de 30 ± 10.74 años, con una edad de inicio de las crisis epilépticas de 10.43 ± 11.71 años, con un tiempo de evolución de 19.57 ± 13.69 años y con una frecuencia de las crisis por mes de 9.25 ± 8.09. El foco epiléptico se localizó en el hemisferio derecho en 4 (33.33%) de los pacientes e izquierdo en 8 (66.66%) pacientes. El promedio de fármacos antiepilépticos fue de 3 ± 0.73. Grupo II: ELTM secundaria a lesiones (tumores y malformaciones arterio-venosas) Este grupo incluyó a 3 pacientes todos de sexo femenino. La edad promedio de este grupo fue de 26 ± 8.18 años, con una edad de inicio de las crisis epilépticas de 21 ± 5.56 años, con un tiempo de evolución de 5 ± 6.92 años y con una frecuencia de las crisis por mes de 11 ± 8.66. El foco epiléptico se localizó en el hemisferio derecho en las 3 pacientes (100%). El promedio de fármacos antiepilépticos fue de 1.33 ± 0.57 Autopsias Este grupo incluyó a 10 autopsias, 5 (50%) sujetos femeninos y 5 (50%) sujetos masculinos, que fallecieron por diversas causas sin patología neurológica aparente. La edad promedio de este grupo es de 32.5 ± 12.74 años y el promedio del intervalo post-mortem (IPM) fue de 16.4 ± 2.79 horas. Cada muestra de tejido cerebral se colocó en un filtro de papel</p>

cualitativo (Cat.6420-1500, Ahlstrom, USA) para retirar las meninges por el método de rodamiento, en 1 ml de solución Ringer Hepes pH 7.4). el tejido fue cortado en pedazos de 1mm³ con el fin de separar la microvasculatura y eliminar agregados celulares se utilizaron filtros de células estériles pluriStrainer (Lot 50040-01, pluriSelect, Germany) con mallas de 40 µm y 100 µm respectivamente. Los microvasos fueron homogeneizados en amortiguador de lisis RIPA en un baño de hielo a 4 °C. Finalmente, el material obtenido se sometió a experimentos de western blot para analizar la expresión de diferentes proteínas. Resultados Claudina-5: El índice de expresión de claudina-5 (con respecto a β-actina) en los microvasos obtenidos del tejido de autopsias fue de 0.3754 ± 0.1997 unidades de densidad óptica relativa (Figura 5A). En el grupo de pacientes con ELTm secundaria a EH existe un incremento del 309.7% del índice de expresión de claudina-5 (1.538 ± 0.4613 ; $p < 0.001$) con respecto a los niveles observados en autopsias. En el grupo de pacientes con ELTm secundaria a lesión se aprecia un aumento del 392.54% del índice de expresión de claudina (1.849 ± 0.7138 ; $p < 0.01$) con respecto a los niveles en autopsias. ZO-1: El índice de expresión de ZO-1 (con respecto a β-actina) en los microvasos obtenidos del tejido de autopsias fue de 0.9484 ± 0.221 unidades de densidad óptica relativa. En el grupo de pacientes con ELTm secundaria a EH se aprecia una disminución del 61.71% del índice de expresión de ZO-1 (0.3631 ± 0.1458 ; $p < 0.001$) con respecto a los niveles observados en autopsias. En el grupo de pacientes con ELTm secundaria a lesión hay un decremento del 57.78% del índice de expresión de ZO-1 (0.4004 ± 0.1785 ; $p < 0.05$) con respecto a los niveles en autopsias (Figura 6A). No se encontró diferencia estadísticamente significativa en los niveles de ZO-1 entre ambos grupos de ELTm. Ocludina: El índice de expresión de ocludina (con respecto a β-actina) en los microvasos obtenidos del tejido de autopsias fue de 0.4362 ± 0.06754 unidades de densidad óptica relativa). En el tejido de pacientes con ELTm secundaria a esclerosis hipocámpal se percibe una disminución del 31.37% del índice de expresión de ocludina (0.2995 ± 0.06948 ; $p < 0.01$) con respecto a los niveles observados en autopsias. Correlaciones: Las variables clínicas analizadas en el tejido de autopsias no mostraron correlaciones estadísticamente significativas con los valores del índice de expresión de las proteínas de las uniones estrechas (con respecto a β-actina). Los valores de ZO-1 se correlacionaron significativamente con la edad de los pacientes mostrando una disminución en el índice relativo de expresión de la proteína al aumentar la edad en años. C). Identificación de biomarcadores relacionadas con la inflamación y su modificación después de la eliminación del foco epileptogénico en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal. Pacientes y métodos. Se realizó un estudio transversal analítico se incluyeron pacientes de ambos géneros de 18 meses a 60 años con diagnóstico de epilepsia farmacorresistente y epilepsia controlada de 2016 a marzo de 2018. Excluimos pacientes con tratamiento previo con esteroide y diagnósticos asociados a incremento de interleucinas (trastorno del espectro autista, neurolupus, crisis febriles, procesos inflamatorios en general). Las muestras de suero y/o plasma se obtuvieron antes y después del tratamiento quirúrgico (1 año de cirugía tiempo de evolución). Para los ensayos, las muestras fueron analizadas por un sistema multiplex ultrasensible diseño de 32 analitos para placas, Bioplex Human Cytoquin Assay de Biorad. Cada Bio-PLEX® tuvo calibradores mixtos que sirvieron como una curva estándar. Análisis Se agruparon los grupos por Controlados (13), farmacorresistente (41) y Controlados posquirúrgico (11), se realizó un análisis de varianza ANOVA post-hoc Dunnett * $p < 0.05$, $p < 0.01$, comparando los tres grupos. Resultados. El grupo con epilepsia farmacorresistente mostró diferencias significativas con el grupo controlado en la mayoría de las citosinas proinflamatorias; los pacientes postoperados los niveles de citosinas fueron menor que en los pacientes controlados, lo que muestra que el tejido epileptogénico cuando se ha resecado con la consiguiente eliminación de las convulsiones (o una reducción de ellos), la inflamación observada desaparece. Este hallazgo apoya la hipótesis de que la inflamación podría ser principalmente la consecuencia de procesos epileptogénicos. D). Para la Identificación de los miRNAs como biomarcadores de diagnóstico se evaluó la expresión en tejido de corteza cerebral de pacientes con ELTm resistente a fármacos. Características de los pacientes El grupo ELTm incluyó 10 muestras de tejido de 5 pacientes femeninos y 5 masculinos con un rango de edad de 13-57 años, el tratamiento farmacológico prequirúrgico incluyó 2-4 fármacos antiepilépticos. Todo el grupo experimental fue con ELTm. El tejido de neocorteza temporal se recogió inmediatamente después de su resección, se transportó en RNA later y se almacenó a -70°C . Los resultados fueron comparados con 10 tejidos control de sujetos sin trastornos cerebrales con intervalo postmortem máximo de 20 horas informe de la Unidad Médica Forense de la Ciudad de México (SEMEFO). El rango de edad fue de 12-73 años Se realizó la Extracción de RNA a partir de 100 mg de tejido de corteza temporal se homogenizó con 1 ml de reactivo Trizol Se evaluar la integridad del RNA (RIN) seleccionando muestras con RIN arriba de 7. Para la reacción de qPCR se usaron sondas TaqMAN específicas para miRNA-146a, 34a, 1260, 1275, 1298, 451, 132 and 142-3p. (Applied Biosystem) y el Sistema TaqMan master mix. Los valores se normalizaron con el miRNA constitutivo RNU-48 y los datos se analizaron por el método de pfaffl. evaluamos la expresión diferencial de miR-1298, 451, 142-3p, 34a, 1260, 1275, 132 y 146a, obteniendo los siguientes resultados. Características clínicas del grupo de control y expresión de miRNA En pacientes con ELTm, cinco de los ocho miRNAs evaluados, miRNA-34a, 1298, 451, 1260 y 1275 mostraron expresión diferencial significativa comparado con las autopsias. La expresión de miRNA-34a fue de 0.7635 ± 0.3848 ($p = 0.0343$) mostrando una disminución de -1.49 veces de cambio en comparación con los controles, la expresión de miRNA-1298 fue 0.470 ± 0.1582 ($p = 0.0161$) también mostrando una disminución del cambio de -7.0 veces. Por otro lado, la expresión de miRNA-451 en pacientes fue de 35.36 ± 20.24 ($p = 0.0008$) mostrando un aumento de 25.62 veces de cambio en comparación con los controles. La expresión de miRNA-1260 y 1275 exhibió un patrón similar con una media de 34.25 ± 10.36 ($p = 0.0062$) y 38.69 ± 22.11 ($p = 0.04$), representando un aumento de 4.09 y 7.07 veces de cambio respectivamente (Figura 1). Los valores de expresión de miRNA-132, 142-3p y 146a no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo control, lo que sugiere que estos miRNAs no se ven afectados por ELTm en la neocorteza. 3. Artículos científicos en

	<p>revistas internacionales indizadas -Castañeda-Cabral JL, Beas-Zárate C, Rocha-Arrieta LL, Orozco-Suárez SA, Alonso-Vanegas M, Guevara-Guzmán R, Ureña-Guerrero ME. Increased protein expression of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C and their receptors in the temporal neocortex of pharmacoresistant temporal lobe epilepsy patients. J Neuroimmunol. 2019 Mar 15;328:68-72. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.12.007. Epub 2018 Dec 21. -Pérez-Pérez, D., Frías-Soria, C.L., Rocha, L. Drug-resistant epilepsy: from multiple hypotheses to an integral explanation using preclinical resources. Epilepsy & Behavior, in press. -Organista-Juárez D, Jiménez-Hernández A, Rocha-Arrieta L, Alonso-Vanegas M, Guevara-Guzmán R, 2019. Differential Expression of miR-34a, 451, 1260, 1275 and 1298 in the Neocortex of Patients with Mesial Temporal Lobe Epilepsy. Epilepsy Research. (in press) 4. Presentación de los resultados en foros científicos nacionales e internacionales Colunga-Durán A, Castañeda-Cabral JL, Nuñez-Lumbreras MDIA, Alonso-Vanegas M, Ureña-Guerrero M, Orozco-Suárez S, Guevara-Guzmán R, Rocha L. Alterations of the tight junction proteins (claudin-5 and ZO-1) in the microvasculature of temporal neocortex from patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy. 33rd International Epilepsy Congress, Bangkok, 22-26 June 2019.</p>
Pregunta:.	2.- Justifique las desviaciones e informe las decisiones que serán tomadas para concluir exitosamente el proyecto.
Respuesta:	no aplica
Pregunta:.	3.- FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS.- Describa las actividades realizadas por los Asistentes de Investigación registrados en el proyecto.
Respuesta:	-Durante el tercer año del proyecto, la estudiante Adacrid Colunga Durán de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla realizó su servicio social y está en proceso de obtener el grado de licenciada en Medicina General con la tesis ¿Expresión de las proteínas de las uniones estrechas en neocorteza de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal mesial farmacorresistente?. Su trabajo de tesis fue apoyado con el presente proyecto. Durante el tercer año del proyecto el alumno de Servicio social Diego Leonardo García Mata de la Facultad de medicina Universidad Autónoma de México, participó en el desarrollo del presente proyecto.
Pregunta:.	4.- Mencione si existen observaciones relevantes al ejercicio del presupuesto autorizado por el fideicomiso.
Respuesta:	Dado a las necesidades del uso de consumibles básicos para el desarrollo del proyecto nos obligó a pedir la transferencia de los recursos destinados a viajes y viáticos, para la adquisición de consumibles y poder continuar con las actividades de investigación del proyecto.
Pregunta:.	5.- Mencione el estado de las aportaciones complementarias comprometidas. (en el caso de empresas)
Respuesta:	no aplica
Pregunta:.	6.- Mencione si el proyecto cuenta con autorización de prórroga o recalendarización, indicar el motivo y el periodo otorgado.
Respuesta:	El proyecto cuenta con una prórroga del mes de Mayo a Octubre del 2019, con la finalidad de poder concluir de manera satisfactoria este proyecto
Pregunta:.	7.- VINCULACIÓN.- Si el proyecto consideró la vinculación con otra institución, informe cuál ha sido la participación de ésta. INSTITUCION (ES) VINCULADA (S): <div> <div>Actividades realizadas:</div> <div>Si el proyecto no consideró la vinculación con otra institución pero en su desarrollo ha construido nexos con otra institución, informe las actividades y resultados que se hayan desarrollado conjuntamente. INSTITUCIÓN:</div> <div>Actividades realizadas:</div> </div>
Respuesta:	No aplica
Observaciones / Justificación:	

Documentos Anexos