

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: 001	ETAPA 1
Título:	La función sensorial como biom
ID Usuario:	X_malonso20514
Nombre:	Mario Arturo Alonso Vanegas
formato:	SC_INFTEC01 INFORME TÉCNICO PARCIAL
Fecha de Envío:	26-APR-17

Reporte de Informe Técnico

Sección:	SC_SEC35
Pregunta:.	1.- Informe sobre las metas alcanzadas tomando en cuenta las programadas en esta etapa.
Respuesta:	<p>Durante esta primera etapa, se realizó la evaluación preoperatoria de los pacientes con epilepsia de difícil control en los que se ha asegurado el diagnóstico correcto, con el diagnóstico sindromático definido y referidos para evaluación preoperatoria. Se elaboró una historia clínica completa con especial énfasis en los factores de pronóstico asociados que incluyen el inicio y la evolución del padecimiento, la semiología de la crisis a lo largo de la enfermedad. La frecuencia, intensidad y duración de las crisis, el aura, factores asociados desencadenantes medicamentos, dosis y sus efectos secundarios, la afección de la memoria y el lenguaje, el deterioro cognitivo y la comorbilidad psiquiátrica. En la evaluación neuropsicológica se realizó la valoración íntegra de las funciones mentales superiores incluyendo lenguaje, inteligencia, memoria verbal y visoespacial y las áreas elocuentes relevantes; ya que con frecuencia existe una correlación entre las áreas de alteración cognitiva y la zona epileptogénica. En la selección de los candidatos se empleó imagen por resonancia magnética de encéfalo con protocolo específico para epilepsia, resonancia magnética funcional, espectroscopia, imagen por emisión de positrones (PET) y tomografía por emisión de fotón único (SPECT). A la fecha, se han identificado 30 pacientes con evaluación prequirúrgica completa con epilepsia de lóbulo temporal de difícil control. Se tienen los tejidos cerebrales de 8 pacientes con Epilepsia de lóbulo Temporal (ELT), y 12 pacientes con epilepsia secundaria, en ambos casos los pacientes son refractarios al tratamiento farmacológico y fueron candidatos a cirugía. Un día antes de la cirugía se les aplica pruebas de olfacción y de potenciales evocados. Se les toma además una muestra de sangre. 1 Evaluación de la función olfatoria. Estudios recientes indican que la prueba de olores puede ser un instrumento diagnóstico temprano de enfermedades neurodegenerativas. Al respecto, el grupo de investigación de la Dra. Guevara ha estandarizado un cuestionario sobre los olores más familiares y preferidos en población mexicana con un rango de edad de 14-94 años. La prueba de olores previamente reportada consiste en varias pruebas con las que es posible evaluar los siguientes dominios: umbral, identificación y reconocimiento, discriminación y memoria olfatoria. Las siguientes pruebas se aplicarán antes y después de la cirugía: a) Prueba de identificación y reconocimiento. El paciente es expuesto a diferentes concentraciones de diferentes aromas. Los aciertos y errores de cada paciente en cada aroma fueron contabilizados. b) Prueba de discriminación. Se expone al paciente a una mezcla de dos aromas. Los aromas usados fueron los mismos que se utilizaron en la prueba de identificación. Los aciertos y errores fueron contabilizados en cada exposición a las mezclas de olores. c) Prueba de memoria. Al inicio de la prueba se expone al paciente a un aroma novedoso (no familiar). 2. Registro de potenciales evocados visuales. Los potenciales evocados evalúan la función de un sistema sensorial y sus vías a través del registro de respuestas provocadas ante un estímulo conocido y normalizado. Los potenciales evocados visuales pueden verse modificados en su amplitud y latencia, al interferir un segundo estímulo sensorial, en este caso un estímulo olfatorio. Se realiza electroencefalografía cuantitativa a los pacientes con un</p>

equipo Nexus 32 de Mindmedia, de 21canales usando electrodos colocados en una gorra para EEG con una distribución de los sensores correspondiente al sistema 10/20 para la colocación de los electrodos. Los potenciales evocados se obtienen mediante la exposición a 100 estímulos visuales alternantes con una frecuencia de 2Hz, Se usó BioTrace+ 2015 como sistema de registro y análisis de los datos. Para asegurar la precisión en la exposición del estímulo, se coloca un Nexus Trigger Interface de Mindmedia el cual asegura un margen de error de no más de 1ms en el registro de cada estímulo. La duración de la exposición a los estímulos visuales es de 1 min, y a los 25 s se expone al paciente al aroma que fue mejor percibido en la evaluación olfatoria. En relación a los resultados obtenidos al presente, se observa que en comparación con un grupo control, los pacientes con ELT presentan cambios importantes de latencia de los potenciales evocados visuales después de la administración de un estímulo olfatorio. En el caso de la amplitud de la onda P300, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos durante la administración del estímulo olfatorio.

3. Evaluación de microRNA El tejido cerebral se obtiene en el quirófano después de su resección. Se mantiene en RNAlater (Quiagen) por no más de 2 horas y se guarda a 4°C toda la noche. Posteriormente se pesa y se guarda pesado a -70°C hasta su uso. El tejido de cada paciente se registra en una base de datos. El tejido se homogeniza en RNazol® RT (Sigma-Aldrich, MO, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, 100 mg de tejido se homogenizan en 1 ml de RNazol. A la mezcla se le agregan 0.4 ml de agua, se incuba por 15 min a temperatura ambiente (TªA) y se centrifuga por 15 min a 12,000 x g a TªA. El sobrenadante se pasa a un tubo nuevo y se agrega etanol al 75% en una proporción 1:0.4. La mezcla se incuba por 10 min en hielo y se centrifuga por 8 min a 12,000 x g a TªA. Para la obtención de la fracción de miRNAs, el sobrenadante se pasa a un tubo nuevo, se le agrega 0.8 vol de isopropanol, se incuba por 30 min en hielo y se centrifuga por 15 min a 12,000 x g a TªA. El precipitado se lava dos veces con 0.4 ml de isopropanol al 70% y se centrifuga por 3 min a 8,000 x g a TªA. El precipitado se resuspende en agua grado biología molecular libre de RNAsas. El índice A260/A280 estimado para la fracción de miRNAs por este método es de 1.6 a 1.7. El RNA aislado se utiliza para realizar la retrotranscripción (RT) para lo cual se usa el kit de retro transcripción TaqMan® Universal PCR Master Mix II, With UNG₂ (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En breve, se prepara una mezcla maestra en hielo. Se mezcla ligeramente y centrifuga brevemente. Se deja la mezcla maestra en hielo hasta preparar la reacción de RT. Se enfria en hielo y se combina con 7 µL de la mezcla maestra en 5 µL de RNA (se usaron 20 ng por reacción). Se mezcla ligeramente y centrifuga brevemente. Se agregan 12 µL de mezcla maestra y RNA a un tubo de 0.2 ml. Se agregan los 3 µL de la solución para RT. El tubo se agita y se centrifuga brevemente. Se mantiene en hielo hasta cargar en el termociclador. Para realizar la qPCR de los miRNAs de interés, se usan ensayos Taqman (TaqMan® MicroRNA Assay, Applied Biosystems) y la mezcla universal recomendada por el fabricante, siguiendo las instrucciones recomendadas. Para esto, los tubos con las sondas se descongelan. Los cDNAs se mezclan con agua libre de nucleasas y se depositan en los tubos de reacción. La mezcla universal se agrega el ensayo Taqman con los primers y sondas correspondientes. Finalmente, se cierran los tubos y se cargan en un ciclador de inducción magnética (MIC, Bio molecular systems, USA). Al presente se tiene la extracción de RNA, transcripción y qPCR de 7 muestras de hipocampo de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal y 4 muestras de hipocampo control. Se usó el RNA nuclear pequeño RNU 48 como control interno, se normalizaron los resultados y se realizó una cuantificación relativa por el método 2-CT. Hemos encontrado que la expresión del miRNA 146a no difiere con respecto al control, con excepción de dos pacientes que mostraron mayor expresión. Los resultados también muestran una correlación positiva significativa entre la expresión del mi RNA 146 a y el tiempo de latencia de la onda p300 ($r=0.7596$, $p<0.05$). También se observa una correlación positiva no significativa entre la amplitud de la onda p300 y la expresión del mi RNA 146 a. No se observa una correlación entre los dominios olfatorios de identificación ni discriminación con el mi RNA con la n actual.

4. Evaluación de polimorfismos Se realizó la extracción y purificación de DNA y la estandarización por PCR en tiempo Real de 5 polimorfismos de los 14 propuestos. Hasta este momento se tiene el perfil genotípico y alélico de cada paciente para los 5 polimorfismos analizados (rs6656401, rs1799724, rs1800629, rs1800630 y rs20417).

5. Estandarización de la extracción de exosomas e identificación de los miRNAs en sangre periférica Se seleccionaron muestras de 4 grupos de pacientes (n=3 por grupo) los cuales se describen a continuación: Grupo 1 = Pacientes pre-quirúrgico con epilepsia del lóbulo temporal en tratamiento farmacológico. Grupo 2 = Pacientes post-quirúrgico de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal con control del padecimiento por tratamiento farmacológico. Grupo 3 = Pacientes post-quirúrgico con epilepsia del lóbulo temporal sin buen control de las crisis a pesar del tratamiento farmacológico Grupo 4 = Pacientes con crisis psicógenicas pero con tratamiento farmacológico (control) Una vez seleccionados, se extrajeron los exosomas utilizando el reactivo Total Exosome Isolation (Invitrogen, USA), según las recomendaciones del proveedor. Brevemente, la muestra una vez centrifugada 20 min a 2000 x g y 20 min a 10000 x g, se le agrega 250 µl de PBS estéril + 150 µl del reactivo Total Exosome Isolation. La mezcla se incuba en hielo por 30 min, se centrifuga 5 min a 10000 x g y se elimina el sobrenadante. El botón con exosomas se resuspende en 50 µl de agua grado biología molecular y se guarda a -70°C para la extracción de miRNAs hasta el momento de su análisis. Para confirmar la presencia de los los miRNAs previamente seleccionados (miR-132, mir-146a, miR-34, miR-9 y miR-196b), se seleccionan otros de mayor o igual interés para el protocolo y se identifica su expresión en los diferentes grupos de pacientes. Se analizan inicialmente las muestras con el microarreglo MiRNA 4.0 array (Affymetrix, USA).

Pregunta:.

2.- Justifique las desviaciones e informe las decisiones que serán tomadas para concluir exitosamente el proyecto.

Respuesta:	Se solicitó la transferencia de \$210,000.00 de gasto de inversión a gasto corriente. Lo anterior fue con base en que se completó la compra del equipo propuesto y hubo un remanente en el mismo.
Pregunta:.	3.- FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS.- Describa las actividades realizadas por los Asistentes de Investigación registrados en el proyecto.
Respuesta:	Se tiene el ingreso a Maestría del Biólogo Experimental Yair Emiliano Delgado Namorado quien realizará como proyecto de Tesis la EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON LA INFLAMACIÓN EN PACIENTES MEXICANOS CON EPILEPSIA. También se tiene a la M. en C. María de los Ángeles Núñez Lumbreras quien está inscrita al programa de doctorado de Neurofarmacología y Terapéutica Experimental y cuyo tema de estudio se enfoca a identificar alteraciones de la barrera hematoencefálica de los pacientes con epilepsia farmacorresistente.
Pregunta:.	4.- Mencione si existen observaciones relevantes al ejercicio del presupuesto autorizado por el fideicomiso.
Respuesta:	No aplica
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:	Al momento no se ha solicitado prórroga.
Pregunta:.	7.- VINCULACIÓN.- Si el proyecto consideró la vinculación con otra institución, informe cuál ha sido la participación de ésta. INSTITUCION (ES) VINCULADA (S): Actividades realizadas: 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: Actividades realizadas:
Respuesta:	No aplica
Observaciones / Justificación:	

Documentos Anexos