



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE ATENCIÓN A LA SALUD**

**LICENCIATURA EN MEDICINA**

**“EXPRESIÓN DE LA VÍA *WNT* / B-CATENINA EN RATAS EPILÉPTICAS  
INDUCIDAS POR EL MODELO KINDLING SOMETIDAS A RESTRICCIÓN  
CALÓRICA”.**

**M.P.S.S. DANIEL ALEJANDRO ROJAS HERNÁNDEZ**

**2153059040**

**ASESOR.**

**DRA. AIDA HAMDAN PARTIDA, No. Económico 26343**

**FEBRERO 2021.**

**INTRODUCCIÓN**

**3**

<b>CAPÍTULO I INVESTIGACIÓN</b>	<b>3</b>
Título	3
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Justificación	3
1.3 Marco teórico	4
1.4 Objetivo general	7
1.5 Objetivos específicos	7
1.6 Hipótesis	8
1.7 Metodología	8
1.8 Resultados: cuadros y gráficas	12
1.9 Análisis de resultados	15
1.10 Conclusiones de la investigación	15
1.11 Bibliografía	17

<b>CAPÍTULO II CONCLUSIONES DEL PASANTE SOBRE SU SERVICIO SOCIAL</b>	
3.1 En relación a su formación como persona.	22
3.2 En relación a su formación profesional.	22
3.3 En relación a su aportación a la comunidad.	23
3.4 En relación con su institución educativa.	23

## **CAPÍTULO I. INVESTIGACIÓN**

## **Expresión de la vía *Wnt* / $\beta$ -catenina en ratas epilépticas inducidas por el modelo kindling sometidas a restricción calórica.**

### 1.1 Planteamiento del problema.

La epilepsia es una enfermedad que afecta a más del 1% de la población mundial y para la cual no se tiene un tratamiento completamente resolutivo que se le pueda ofrecer a todas las personas que lo padecen. Debido a que algunos pacientes son refractarios a tratamiento médico o no son candidatos a cirugía de epilepsia, se han implementado terapias alimentarias como la dieta cetogénica y la restricción calórica que han mostrado tener un cierto efecto anticonvulsivo y que ayudan a la disminución de las crisis epilépticas. Sin embargo, el mecanismo por el cual estos tratamientos dietéticos disminuyen la frecuencia y duración de las crisis no es comprendido del todo, lo que dificulta la aplicación de este tratamiento de forma concreta y sistemática en los pacientes afectados y dificulta el descubrimiento de nuevos fármacos que puedan ejercer un efecto similar al provocado por la restricción calórica y que permita de una mejor manera el control de las crisis epilépticas de difícil control.

### 1.2 Justificación.

Actualmente no se tiene una relación clara de la vía molecular *Wnt* con las vías glucolíticas y su regulación metabólica, por lo tanto, es necesario conocer el efecto de la restricción calórica sobre la activación de la vía *Wnt* y observar su participación en la formación de cuerpos cetónicos en las neuronas para lograr un efecto antiepiléptico y pueda ser utilizada como blanco de tratamiento para las crisis epilépticas de difícil control y la generación de nuevos fármacos que puedan interactuar con esta vía.

Actualmente no existen reportes en la literatura que describan la participación de las vías de señalización de *Wnt*/ $\beta$ -catenina en neuronas hipocampales, amigdalinas, corteza cerebral y cerebelo en el modelo de epilepsia inducido por Kindling en ratas bajo restricción calórica. Del mismo modo se desconoce el efecto de la restricción calórica sobre estas vías de señalización en neuronas epilépticas del encéfalo y el efecto que produce a nivel del cerebelo, como se ha mencionado en ciertas publicaciones su contribución a la fisiopatología de la epilepsia. Los resultados obtenidos del presente trabajo podrán aportar datos en relación a los mecanismos celulares y moleculares que subyacen al efecto inducido por el kindling, que se caracteriza por ser un modelo que comparte mecanismos similares a las crisis epilépticas que padecen la mayoría de pacientes con esta patología. Por otra parte, podrán conocerse de una mejor manera los

mecanismos de acortamiento de la actividad epiléptica que se han descrito. La investigación relacionada a la vía de señalización *Wnt*/β-catenina en zonas neuronales ya comentadas está aún en proceso, debido a que la mayoría de la literatura de estas vías de señalización intracelular se encuentran descritas en otros tipos celulares. Los mecanismos de acción a nivel intracelular de *Wnt* sobre los efectos bioeléctricos de la membrana celular en la epilepsia y en modelos experimentales bajo restricción calórica aún no están establecidos, sin embargo, se sabe que el metabolismo celular de la neurona se encuentra implicada en la regulación de la excitabilidad de la membrana celular en estos modelos, por lo que se espera profundizar en el conocimiento de la fisiología metabólica de la neurona y su implicación en la patología de la epilepsia.

### 1.3 Marco teórico.

La epilepsia es un desorden neurológico en que ciertos cúmulos de neuronas generan descargas anormales y recurrentes produciendo crisis epilépticas (Engel *et al.*, 1997; Williamson *et al.*, 1997). Se estima que esta patología afecta más del 1% al 1.5% de la población mundial, de los cuales el 30% aproximadamente, no responden a tratamientos farmacológicos (Kwan *et al.*, 2006). Hasta el momento la compleja fisiopatología y vías moleculares de la epileptogénesis y de la epilepsia no se conocen del todo. Debido a las evidencias que se tienen hasta el momento se conocen múltiples mecanismos de vías anatómicas, rutas fisiopatológicas e interacciones moleculares que conlleva al desbalance entre la neurotransmisión inhibitoria y excitatoria, por lo que influye en la estabilidad iónica de las neuronas. Uno de los modelos que se utilizan para generar estas alteraciones a nivel celular de forma experimental es el modelo kindling (Goddard *et al.*, 1969), que da lugar a cambios electrográficos, conductuales y de neurotransmisión que se asemejan a los que se producen en la epilepsia del humano (Bertram, 2007).

La forma más frecuente de epilepsia en el adulto tiene su origen el lóbulo temporal con altas tasas de farmacoresistencia (Téllez *et al.*, 2012). Los desequilibrios entre la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria en el cerebro están implicadas en la fisiopatología de la ELT, en la cual hay una disminución del neurotransmisor GABA, el principal inhibidor de la actividad del SNC. Las convulsiones observadas en la ELT reflejan exceso de excitación, que resulta en la disfunción del circuito inhibitor (Poulter *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

Aunque la farmacoterapia ha mejorado con la introducción de nuevos fármacos que tienen menos efectos secundarios e interacciones, el problema de la epilepsia refractaria no ha sido resuelto (Kwan *et al.*, 2010). A pesar de que el tratamiento médico es el de primera elección en la epilepsia, se han realizado ensayos prospectivos aleatorizados que proporcionan pruebas de grado I de la superioridad de la cirugía de epilepsia a la farmacoterapia para pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (ELT) que no responden al tratamiento con dos fármacos antiepilépticos (Engel *et al.*, 2012). Desafortunadamente, no todos los pacientes son candidatos a cirugía de epilepsia, en

estos pacientes el tratamiento dietético ha mostrado ser una alternativa para reducir la frecuencia de las crisis (Sosa, 2008).

La actividad neuronal está estrechamente relacionada con el metabolismo de los carbohidratos que influyen en la excitabilidad neuronal, los carbohidratos promueven la formación de ácidos grasos para la formación de cuerpos cetónicos, los experimentos con animales han proporcionado evidencia de que el efecto anticonvulsivo de la dieta cetogénica esta mediada por la acetona y que ha mostrado eficacia en el tratamiento de la epilepsia (Palmer, 2013). La glucosa es el principal sustrato para la obtención de energía en los cerebros adultos. Se estima que aproximadamente el 63% de los suministros de glucosa son para la obtención de energía del cerebro de ratas a los 7 días de vida y esto incrementa con la edad (Vannucci *et al.*, 1994). Se ha observado hasta el momento que la vía de señalización *Wnt* participa activamente en vías de regulación de la glucosa, especialmente aumentando la absorción de glucosa en neuronas corticales independientemente de la activación de genes objetivos y el efecto sináptico de *Wnt* (Cisternas *et al.*, 2016).

La restricción calórica (RC) es una terapia dietética natural que mejora la salud, prolonga la longevidad, y reduce los efectos de enfermedades neuroinflamatorias en roedores y humanos (Weindruch *et al.*, 1986; Greene *et al.*, 2001; Duan *et al.*, 2003). La RC se produce a partir de una restricción dietética parcial y difiere del ayuno agudo o inanición ya que reduce el consumo de energía calórica sin causar anorexia o deficiencias de cualquier nutriente específico (Seyfried *et al.*, 2004). La dieta cetogénica es un tratamiento que beneficia a pacientes con epilepsia y es usado frecuentemente en la práctica clínica (Kossoff & Wang, 2013; Wang y Lin, 2013). Además de mejorar el estado de salud, la RC tiene efectos anticonvulsivos en murinos y en otros modelos de epilepsia (Bough *et al.*, 1999; Greene *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2015). La acción antiepiléptica de la RC puede requerir una reducción de las concentraciones de glucosa o insulina y/o incrementar el cuerpo cetónico  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -HB) (Greene *et al.*, 2001; Yamada, 2008). La RC ha mostrado electrográficamente aumento en el umbral de descarga de las neuronas, proporcionando su efecto antiepiléptico (Azarbar *et al.*, 2010) y en ratas con inducción de epilepsia mediante el modelo Kindling aumentó el umbral después de un estímulo aplicado en la amígdala al igual que redujo la duración de la actividad epiléptica. Esto sugirió que la RC conlleva un perfil anti-convulsivo y es totalmente independiente de los cambios de glucosa, insulina o  $\beta$ -HB (Phillips *et al.*, 2015).

Las vías de señalización de *Wnt* son esenciales para el desarrollo y la función del sistema nervioso central, debido a que modula ciertos procesos importantes como la neurogénesis hipocampal, la formación de las hendiduras sinápticas y la regulación mitocondrial (Budnik *et al.*, 2011; Inestrosa & Varela, 2014; Arrázola *et al.*, 2015;). Las señalizaciones de *Wnt* pueden ser divididas en dos vías principalmente: la vía canónica (vía de señalización dependiente de  $\beta$ -catenina) y la vía no canónica (independiente de  $\beta$ -catenina). La vía canónica se ha implicado en conducir a la regulación de la actividad transcripcional y permite la activación de genes como c-Myc y ciclina D vía TCF/LEF (factor de célula T / factor de unión a promotor linfoide) que determina el destino

celular y la determinación, proliferación y diferenciación de células madre. La vía no canónica ha sido implicada principalmente en el movimiento celular y la polaridad, importantes en diversos procesos tales como gastrulación, polaridad de las células del oído interno, patrón dorsoventral, separación de tejidos, migración neuronal y oncogénesis (Logan & Nusse, 2004; MacDonald *et al.*, 2009; Angers y Moon, 2009). En los últimos años se han postulado nuevas rutas de señalización, una de ellas se encuentra implicada en el metabolismo de la glucosa en las neuronas, sin embargo, hasta la fecha se conoce poco sobre los mecanismos que *Wnt* ejerce sobre las vías glucolíticas (Benzler *et al.*, 2012; Benzler *et al.*, 2013; Nobrega *et al.*, 2013). El cerebro es un órgano que consume grandes cantidades de glucosa. En el tejido cerebral, la glucosa es metabolizada a través de la glucólisis y sus productos son utilizados en la fosforilación oxidativa para la producción de ATP, producto con mayor consumo por la neurona durante la formación del gradiente iónico después de la transmisión sináptica (Attwell & Laughlin, 2001; Mergenthaler *et al.*, 2013). La acción de *Wnt3a* sobre las neuronas corticales promueve la absorción de glucosa sin cambios significativos en la expresión y funcionalidad de su transportador GLUT3, pero con incremento en su afinidad. Además, al generar estimulación por el mismo ligando aumenta la actividad de dos enzimas reguladoras de la glucólisis (hexoquinasa y 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,3-bifosfatasa) que fueron correlacionadas directamente con el aumento de la absorción de la glucosa (Cisternas *et al.*, 2016). La unión de *Wnt* específicos (tales como *Wnt1*, *Wnt10b* o *Wnt3A*), a sus receptores *Fzd* (*Frizzled*) -LRP5 o *Fzd*-LRP6, tiene como resultado la activación de proteínas G heterotriméricas intracelulares y proteínas *Dvl* (*Disheveled*), que en giro conduce a la fosforilación y reclutamiento de Axin al LRP5 (o LRP6) y que participa como co-receptor (Tamai *et al.*, 2004; Nusse, 2005). Estos mecanismos conducen a la disociación de  $\beta$ -catenina del complejo de degradación, promoviendo la estabilización y acumulación de  $\beta$ -catenina en el citosol, y su translocación hacia el núcleo, activando factores de transcripción de las familias TCF/LEF (Logan & Nusse 2004; Chien *et al.*, 2009; Angers & Moon, 2009). Por otra parte, el aumento en la expresión de ciclina D en las células piramidales de la región CA1 del hipocampo puede aumentar la sensibilidad al pentilenotetrazol y kainato induciendo convulsiones y muerte celular (Koeller *et al.*, 2008). La activación de la vía *Wnt* /  $\beta$ -catenina y la sobreexpresión de  $\beta$ -Catenina, c-Myc y ciclina D se ha asociado con muerte neuronal en células de Purkinje y granulares de ratas con convulsiones generalizadas (Rubio *et al.*, 2017), sin embargo, también se ha descrito que la activación de la vía de *Wnt*/ $\beta$ -catenina inhibe la muerte celular inducida en el estado epiléptico (Busceti *et al.*, 2007). Se han identificado alteraciones de las vías de señalización de *Wnt*/ $\beta$ -catenina generando mutaciones en genes implicados en la gluconeogénesis y en el metabolismo de la glutamina en hepatocitos. Muchas de estas proteínas implicadas se asocian con la disfunción mitocondrial y en el metabolismo de los carbohidratos, sugiriendo que al haber defectos en la señalización de *Wnt* también se puede determinar un cambio metabólico en la utilización de energía de las células hacia la glucólisis y alejarse de la oxidación de ácidos grasos (Chafey *et al.*, 2009). Por otra parte, la vía de señalización de *Wnt* no canónica o no dependiente

de  $\beta$ -catenina interfiere en la activación indirecta del complejo molecular mTOR que se ha visto implicado en la síntesis de proteínas y factores de crecimiento celular, entre otras (Wong, 2013). La activación de receptores Fzd por su ligando *Wnt* induce inhibición de la enzima GSK-3 $\beta$  (3-cinasa-glucogeno sintasa) la cual es activada de la proteína tuberina (TSC2) (Inoki *et al.*, 2006). Sin estas señales, TSC2 inhibe a la proteína Ras homólogo enriquecido en proteínas del cerebro (Rheb), un activador de mTORC1 (Inoki *et al.*, 2003). Así, la inactivación de Rheb por TSC2 conduce a la inhibición de mTORC1 y la inhibición de TSC2 conduce a la activación indirecta de mTORC1. Recientemente se reportó que la RC leve (15%) aumentó significativamente la fosforilación de la proteína cinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) y que redujo la fosforilación de la proteína ribosómica (S6) y de PKB/Akt en la neocorteza y en el hipocampo; sugiriendo que la RC leve inhibe las vías de señalización de mTORC1, reportando un efecto de elevación del potencial de umbral de descarga; sugiriendo una acción anticonvulsiva (Phillips *et al.*, 2015).

#### 1.4 Objetivo general.

Caracterización de la expresión de la vía *Wnt*/ $\beta$ -catenina en neuronas de la corteza sensoriomotriz, núcleo ventrolateral del tálamo, hipocampo y cerebelo en ratas con actividad epiléptica inducida por el modelo experimental de epilepsia kindling y sometidas a restricción calórica.

#### 1.5 Objetivos específicos.

- Determinar la expresión de la proteína *Wnt* en el tejido cerebral de corteza sensoriomotriz, núcleo ventrolateral del tálamo, hipocampo y cerebelo de la rata con crisis generalizadas y restricción calórica.
- Determinar la expresión de la proteína  $\beta$ -catenina en el tejido cerebral de corteza sensoriomotriz, núcleo ventrolateral del tálamo, hipocampo y cerebelo de la rata con crisis generalizadas y restricción calórica.
- Determinar la expresión de la proteína  $\beta$ -catenina fosforilada en el tejido cerebral de corteza sensoriomotriz, núcleo ventrolateral del tálamo, hipocampo y cerebelo de la rata con crisis generalizadas y restricción calórica.
- Determinar la expresión de la proteína GSK-3 $\beta$  en el tejido cerebral de corteza sensoriomotriz, núcleo ventrolateral del tálamo, hipocampo y cerebelo de la rata con crisis generalizadas y restricción calórica.
- Determinar la expresión de la proteína *ciclina-D* en el tejido cerebral de corteza sensoriomotriz, núcleo ventrolateral del tálamo, hipocampo y cerebelo de la rata con crisis generalizadas y restricción calórica.

- Determinar la expresión de la proteína *c-Myc* en el tejido cerebral de corteza sensoriomotriz, núcleo ventrolateral del tálamo, hipocampo y cerebelo de la rata con crisis generalizadas y restricción calórica.

## 1.6 Hipótesis.

Se ha reportado que los animales con RC tienen un efecto neuroprotector a las crisis convulsivas al disminuir el sustrato metabólico, entonces en las ratas con crisis epilépticas inducidas por el modelo kindling se observará una modificación en la expresión de la vía *Wnt* /  $\beta$ -catenina.

## 1.7 Metodología.

Se obtuvieron 18 ratas macho de la cepa Wistar posterior al destete que se mantuvieron en condiciones ambientales controladas (20-23 °C y 12/12 luz-oscuridad), agua y alimentación. Los animales se emparejaron por peso y se separaron en tres grupos de la siguiente manera: a) grupo control (CTRL); b) grupo kindling con alimentación ad libitum (ALK); c) grupo kindling con restricción calórica (KRC). Todos los grupos fueron sometidos a ayuno de 4h para asegurar que todos los animales comenzaran en un punto metabólico similar. Posteriormente los animales del grupo KRC tuvieron una restricción de la dieta en un 15% y los animales de los grupos CTRL y ALK fueron alimentados con una dieta ad libitum. Cada rata se alojó por separado bajo condiciones estándar.

La restricción calórica (RC) se hizo alimentando a las ratas con una dieta normal con una cantidad del 85% de la asignación diaria basada en los pesos de las ratas permitidas a la alimentación *ad libitum* (Rogers, 1979). Para obtener la cantidad de alimento administrado se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Peso} \times 0.3 \times \text{Porcentaje de alimento administrado (0.85)} = \text{Cantidad de alimento (g)}$$

3.1

Los animales se mantuvieron con sus respectivas dietas y a las ratas de los grupos ALK y KRC se les realizó cirugía estereotáxica cuando alcanzaron un peso entre 250 y 300 g. Los electrodos utilizados para las cirugías fueron hechos con un cable aislado bipolar (0,005 pulgadas de diámetro) de acero inoxidable y recubierto con teflón, a excepción de las puntas.

Para la realización de cirugías estereotáxicas, las ratas fueron anestesiadas con zoletil (100 mg / kg. IP) y se colocaron en un aparato estereotáxico (David Köpf) para llevar a cabo la colocación de



electrodos bipolares para la estimulación y registro del núcleo basolateral amigdalino (coordenadas anterior 6,2 mm, laterales de 5 mm y de altura de 1,5 mm), utilizando la línea interaural como punto de referencia de acuerdo con el atlas estereotáxico Paxinos y Watson (1986). Un tornillo implantado en el cráneo sirvió como fuente de referencia y otro electrodo fue colocado en la corteza sensoriomotora para registrar la propagación de la actividad electroencefalográfica. Los electrodos fueron unidos a un mini-conector y fijados al cráneo con acrílico dental, posteriormente la piel se suturó alrededor del mini-conector. Una vez terminado el procedimiento quirúrgico se administró vía intramuscular 40u de gentamicina para evitar infecciones y 1 mg/kg de xilacina como analgésico postoperatorio.

Después de diez días de recuperación postoperatoria, las ratas se colocaron en una cámara sonoamortiguada (22.5x30x30) para la realización del modelo kindling. El conector se unió a cables flexibles que se conectan a la rata con el estimulador Grass S88 y un polígrafo digital Stellate System. Las condiciones para utilizar el polígrafo fueron: 50  $\mu$ V de amplificación y un filtro de entre 0.3 a 30 Hz. Las ratas fueron estimuladas todos los días con frecuencias de 60 Hz, pulsos de duración de 1,0 ms y una intensidad de 400  $\mu$ A (Goddard *et al.*, 1969).

Durante cada estimulación se midieron los siguientes parámetros: a) la duración de la posdescarga registrada en la amígdala y la corteza en cada estímulo; b) el número de estímulos necesarios para llegar a cada etapa del modelo kindling; d) la conducta de acuerdo con los parámetros descritos por Racine en 1972.

- Etapa 1: clonus de los músculos faciales, uno o ambos ojos cerrados.
- Etapa 2 (crisis parciales): movimientos oscilatorios de la cabeza.
- Etapa 3 (crisis generalizadas): movimientos mioclónicos en extremidades anteriores.
- Etapa 4 (crisis generalizadas): movimientos mioclónicos de ambas extremidades.
- Etapa 5 (crisis tónico-clónicas generalizadas): crisis tónico-clónica generalizada.

Una vez que los animales completaron el modelo kindling con 10 crisis tónico-clónico generalizadas (etapa 5), se utilizaron 3 animales por grupo para análisis de proteínas por técnica de inmunofluorescencia y las otras 3 se utilizaron para técnica de western blot. Las ratas utilizadas para inmunofluorescencia fueron anestesiadas profundamente para ser sacrificadas por perfusión intracardiaca con solución salina, seguida de paraformaldehído al 4%. Posteriormente se realizó craneotomía para la obtención de los tejidos. Se realizaron cortes seriados de parafina de 5  $\mu$ m en el encéfalo de las ratas. Los cortes se montaron en laminas tratadas previamente con silano, se realizó el desparafinado y posteriormente la hidratación, después se colocaron en PBS y se saturaron con peróxido de hidrógeno. Se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos con albúmina de suero bovino libre de IgG1 (Sigma, St. Louis MO, EE.UU.). Después de lavar cada uno de los portaobjetos, se realizó técnica de inmunofluorescencia para las proteínas de interés.

- $\beta$ -Catenina y *Wnt*: una gota de anticuerpo anti- $\beta$ -Catenina (anticuerpo anti- $\beta$ -Catenina monoclonal de ratón, Sigma St Louis MO, EE.UU.) diluido 1: 500 durante una hora. Posteriormente, se realizó lavado e incubación con anticuerpo conjugado con fluoresceína durante 30 minutos. Finalmente, se colocaron en un medio de montaje para fluorescencia con DAPI (Vector Laboratories, Inc. - Burlingame, CA Estados Unidos). Posteriormente se realizó inmunofluorescencia para *Wnt* con una gota de anticuerpo anti-*Wnt* (anticuerpo anti-*Wnt* monoclonal de ratón, Sigma St Louis MO, EE.UU.) diluido a 1: 500 durante una hora. Posteriormente, se realizó lavado e incubación con anticuerpo conjugado con fluoresceína durante 30 minutos. Finalmente, se colocaron en un medio de montaje para fluorescencia con DAPI (Vector Laboratories, Inc. - Burlingame, CA Estados Unidos).
- c-Myc y ciclina D3: dos anticuerpos primarios compatibles se aplicaron consecutivamente durante toda la noche a 4 ° C. Los siguientes anticuerpos fueron aplicados de la siguiente manera: anticuerpo monoclonal anti-c-Myc de ratón (1: 500, Sigma, EE.UU.), anticuerpo policlonal de conejo policlonal D3 (1: 500, Sigma, EE.UU.). Posteriormente, se realizó lavado e incubación con anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína por 30 minutos. Finalmente, se colocaron sobre un medio de montaje para fluorescencia con DAPI (Vector Laboratories, Inc.- Burlingame, CA, EE.UU.).

Los cortes se analizaron con un programa de imagen adaptado a un microscopio Olympus (1X81F3) y la inmunopositividad se cuantificó mediante análisis de densidad óptica con el software Image-Pro Plus versión 7.0. Las secciones fueron visualizadas con un objetivo 40X en 3 campos por animal.

Para realización de la técnica de western blot se sacrificaron 3 ratas por grupo por decapitación. Los niveles de las proteínas de interés se evaluaron mediante análisis de transferencia western blot. Los tejidos fueron obtenidos y almacenados en nitrógeno líquido y en el revco a -70°C para su conservación. Posteriormente cada muestra fue pesada y homogeneizada para su utilización. Las muestras se mezclaron con tampón de muestra (125 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 20% de glicerol, SDS al 4%, azul de bromofenol al 0,02%, y 2-mercaptoetanol al 10%) en una relación 1:1 y fueron desnaturalizadas en baño de agua hirviendo durante 5 minutos, posteriormente se permitió el enfriamiento de las muestras en hielo durante 5 minutos para su utilización en gel de poliacrilamida SDS al 10% para la electroforesis (PAGE). Se realizó electroforesis en buffer de corrida (25 mM de Tris-HCl, glicina 195 mM, pH 8,3) corriendo las muestras en el gel a 50 volts durante 10 min y posteriormente a 150 volts por 1 hora y media. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF durante 2 horas a 35 mA con transfer buffer (buffer de corrida + 20% metanol). Al terminar la transferencia se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos con solución

TBST (TBS + 0.1% Tween 20) + leche baja en grasa al 5% o BSA (bovine serum albumin) al 5% para las proteínas fosforiladas. Se realizó el bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación leve. Al terminar el bloqueo las membranas fueron incubadas con las proteínas de interés overnight (aprox. 16 hrs) en refrigeración (aprox 4°C) con agitación. Los anticuerpos utilizados fueron diluidos con TBST utilizando las siguientes diluciones:

- Actina (A-2066): 3:100 (ej. 6 µl en 2 ml).
- β-catenina (sc-376841): 1:200 (ej. 10 µl en 2 ml).
- β-catenina fosforilada (sc-57535): 1:200 (ej. 10 µl en 2 ml).
- GSK α/β (sc-7291): 1:200 (ej. 10 µl en 2 ml).
- Wnt3-a (sc-74537): 1:200 (ej. 10 µl en 2 ml).
- C-myc (sc-40): 1:200 (ej. 5 µl en 1 ml).

Posterior a la incubación con anticuerpo primario se realizaron 4 lavados de la membrana con TBST durante 10 min para después incubar con anticuerpo secundario anti-IgG-complejo de peroxidasa de rábano durante 2 horas a temperatura ambiente con las siguientes diluciones:

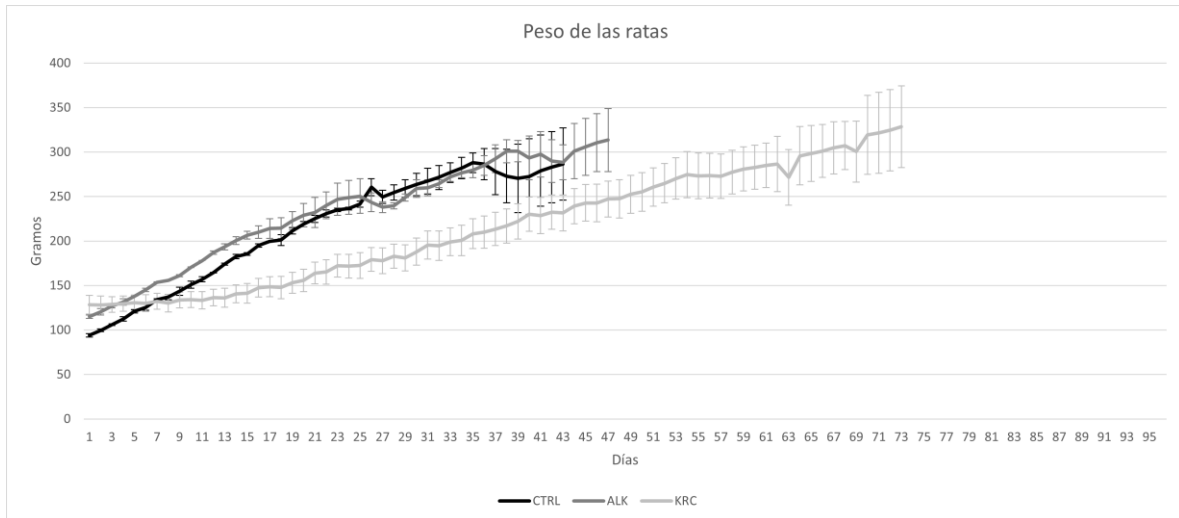
- Anti-rabbit (111-035-003 sigma): 1:20000 (ej. 1 µl en 20 ml).
- Anti-mouse (115-035-003 sigma): 1:20000 (ej. 1 µl en 20 ml).

Posterior a la incubación se realizaron otros 4 lavados con TBST por 10 min para la detección de bandas, para la cual se utilizó luminol WBKLS0500 2 ml por membrana (1 ml de peróxido + 1 ml de luminol) durante 5 min. La membrana se expuso a película de rayos durante 30 minutos y posteriormente se hizo el revelado de la placa con revelador y fijador. Las intensidades de las bandas se cuantificaron con el programa ImageJ y se realizó análisis de las densidades ópticas con una ANOVA de una vía, seguido de un análisis post-hoc de Tukey con el programa Graphpad Prism 9.0, aceptando un nivel nominal de  $p < 0.05$ .

La duración de la actividad electroencefalográfica fue cuantificada por la duración de la actividad epiléptica amigdalina posdescarga después de cada estímulo aplicado en cada rata de los grupos ALK y KRC. Posteriormente se obtuvo el promedio de cada duración y se hizo la comparación entre los grupos ALK y KRC. Los estímulos necesarios para alcanzar cada uno de los estados conductuales del modelo kindling se obtuvieron a través de la asignación de un estado conductual a cada estímulo aplicado, obteniendo el promedio de estímulos necesarios de cada rata para obtener cada uno de los estados conductuales.

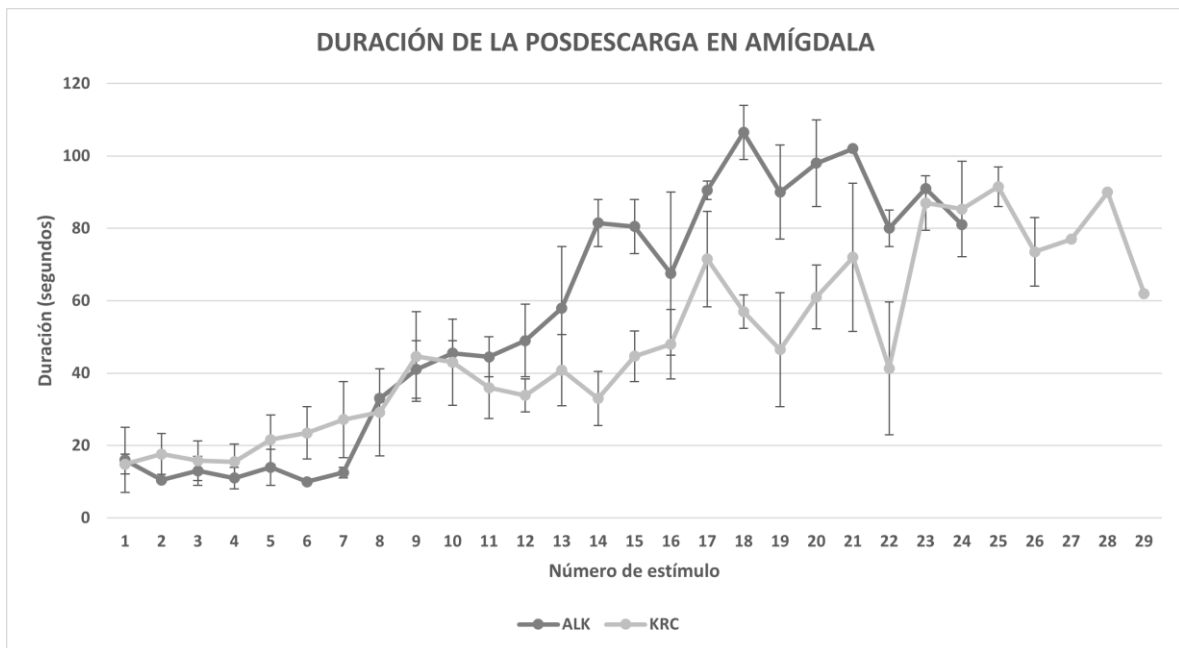
## 1.8 Resultados: cuadros y gráficas

Gráfica 1. Peso de las ratas.



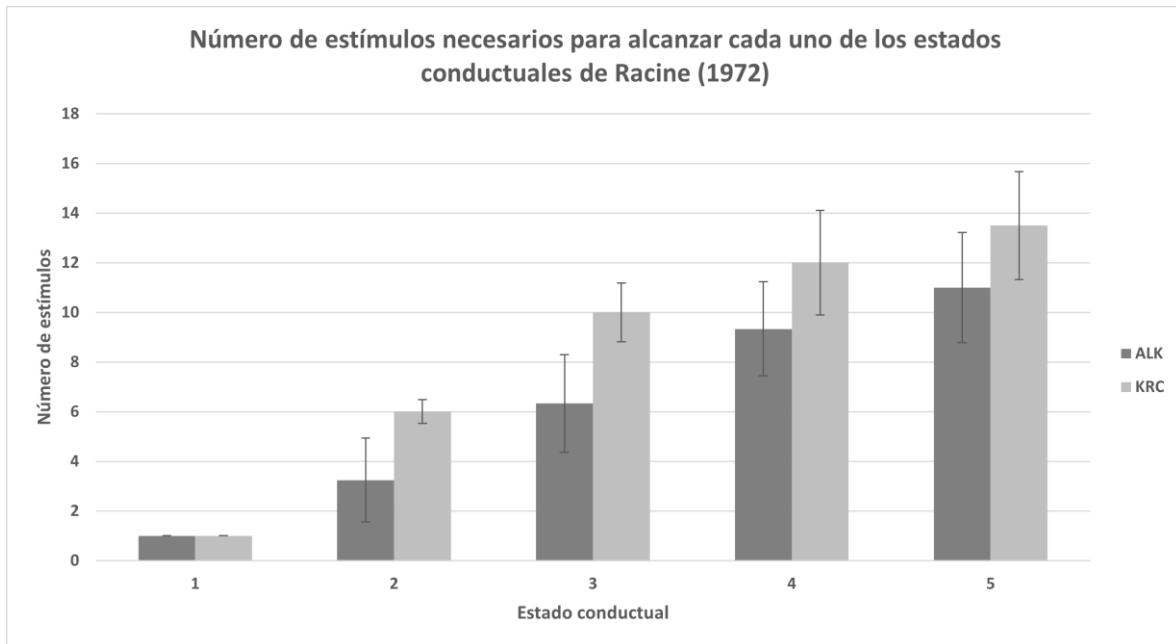
Gráfica 1. Las ratas sometidas a restricción calórica (KRC) aumentaron de peso más lentamente comparadas con aquellas alimentadas ad libitum (CTRL y ALK), requiriendo de más días para alcanzar el peso necesario para la cirugía estereotáxica (250-300g).

Gráfica 2. Duración de la posdescarga amigdalina.



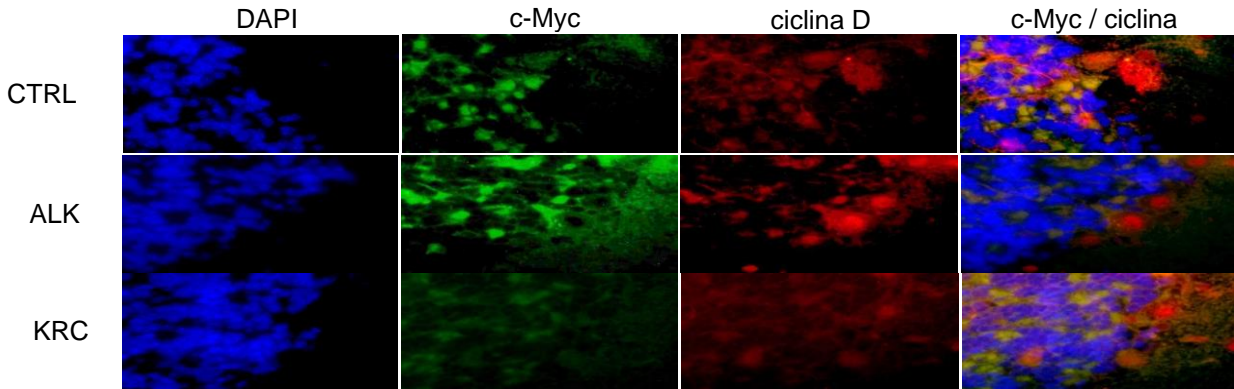
Gráfica 2. Las ratas sometidas a restricción calórica (KRC) tuvieron una menor duración de la posdescarga amigdalina a partir del estímulo número 11, en comparación con las ratas con alimentación ad libitum (ALK).

Gráfica 3. Número de estímulos necesarios para alcanzar cada uno de los estados conductuales descritos por Racine (1972).



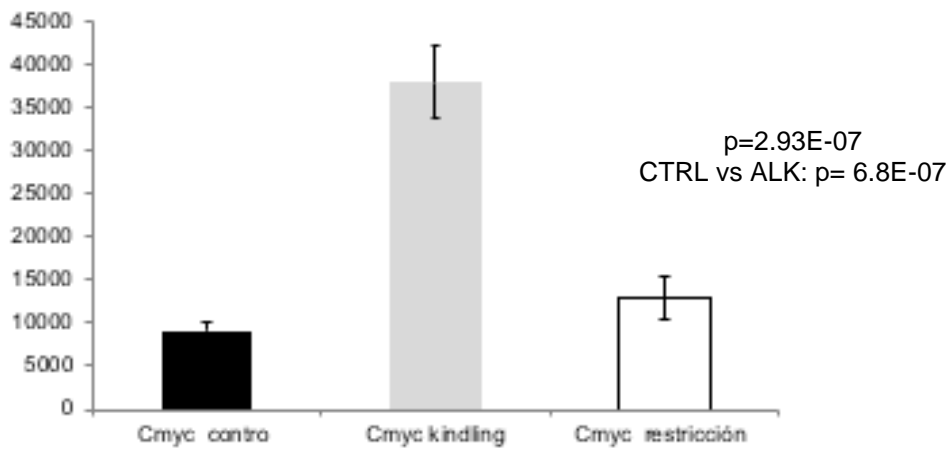
Gráfica 3. Las ratas sometidas a restricción calórica (KRC) requirieron de un mayor número de estímulos para alcanzar cada uno de los estados conductuales en comparación con las ratas alimentadas ad libitum (ALK).

## Resultados inmunofluorescencia



Microfotografías (40x) de una sección sagital del cerebelo (crus 2) de rata, procesadas por IF para c-Myc y ciclina D.

Gráfica 4. Expresión de proteína c-myc en cerebelo por técnica de inmunofluorescencia.



Gráfica 4. Las ratas del grupo ALK mostraron mayor expresión de la proteína c-myc en el cerebelo en comparación con las ratas del grupo CTRL ( $p= 6.8E-07$ ). Las ratas del grupo KRC mostraron una disminución en la expresión de c-Myc en comparación con las ratas del grupo ALK, sin embargo, el resultado no fue significativo ( $p>0.05$ ).

## 1.9 Análisis de resultados

En el presente trabajo se encontró una disminución en la duración de la posdescarga en la amígdala en aquellas ratas sometidas a restricción calórica del 15%, así como la necesidad de un número mayor de estímulos eléctricos para alcanzar cada uno de los estados conductuales del modelo kindling, lo que concuerda con los resultados obtenidos en estudios realizados previamente y mostrando un efecto anticonvulsivo (Phillips-Farfán et al., 2015; Rubio et al., 2018). La gráfica de los pesos de las ratas muestra como las ratas sometidas a restricción calórica fueron aumentando de peso de manera mas lenta comparadas con aquellas ratas con dieta ad libitum.

Por otro lado se encontró por técnica de inmunofluorescencia un aumento significativo en la expresión de la proteína c-Myc en la corteza cerebelosa de ratas con 10 crisis epilépticas tónico-clónico generalizadas inducidas por el modelo kindling de epilepsia, sugiriendo que la expresión de esta proteína está favorecida por la presencia de crisis generalizadas repetidas, como ya se había descrito en estudios previos (Rubio et al., 2017). Así mismo en estudios anteriores nuestro grupo de investigación ha relacionado la presencia de crisis generalizadas inducidas por el modelo kindling con el cerebelo (Paz et al., 1985, 1991; Rubio et al., 2004, 2011, 2019; Rosiles et al., 2016). C-Myc al ser un gen que responde a la unión del ligando *Wnt* a sus receptores en la membrana celular requiere de la expresión de  $\beta$ -catenina para su activación, sin embargo, en este trabajo no encontramos un aumento significativo de  $\beta$ -catenina, a diferencia de estudios precedentes donde su expresión se ha visto aumentada en ratas que fueron estimuladas 45 veces por el modelo kindling (Rubio et al., 2017). Esta discrepancia en los resultados podría estar dada por el número de estímulos aplicados a las ratas, ya que en este trabajo únicamente se estimuló a las ratas hasta que alcanzaran 10 crisis tónico-clónico generalizadas.

## 1.10 Conclusiones de la investigación

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha descrito la participación de la vía *Wnt*/ $\beta$ -catenina en las crisis epilépticas inducidas por modelos animales, sin embargo, este mecanismo no se ha descrito completamente y permanece aún como objeto de investigación. El aumento de c-Myc en el cerebelo de ratas estimuladas sugiere la participación de esta vía que ha sido relacionada con el daño y muerte neuronal provocadas por las crisis epilépticas. Las terapias dietéticas como la dieta cetogénica y la restricción calórica se han implementado como tratamientos alternativos para aquellas personas con crisis epilépticas de difícil control donde el manejo farmacológico y quirúrgico no son suficientes o son inadecuados. La restricción calórica ha mostrado efectos anticonvulsivos en los modelos animales al disminuir la duración de las crisis, sin embargo, no se ha descrito su participación en la modificación de la vía *Wnt*/ $\beta$ -catenina. En el presente estudio no se encontró una disminución significativa en la expresión de las proteínas de

esta vía con una restricción calórica al 15%, sin embargo, se pudo observar una disminución en la duración de la actividad epiléptica llamada posdescarga de las ratas sometidas a restricción calórica, demostrando así sus efectos anticonvulsivos. Una restricción calórica de mayor porcentaje pudiera demostrar una disminución clara de los niveles de las proteínas de la vía *Wnt/β*-catenina y podría ayudar a obtener un mayor conocimiento sobre la implicación de esta vía en la epilepsia y el mecanismo de acción por el cual la restricción calórica ejerce sus efectos anticonvulsivos.



## 1.11 Bibliografía

- 1) Angers, S., & Moon, R. T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(7), 468–477. <https://doi.org/10.1038/nrm2717>
- 2) Arrázola, M. S., Silva-Alvarez, C., & Inestrosa, N. C. (2015). How the Wnt signaling pathway protects from neurodegeneration: the mitochondrial scenario. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 166. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00166>
- 3) Attwell, D., & Laughlin, S. B. (2001). An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(10), 1133–1145. <https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001>
- 4) Azarbar, A., McIntyre, D. C., & Gilby, K. L. (2010). Caloric restriction alters seizure disposition and behavioral profiles in seizure-prone (fast) versus seizure-resistant (slow) rats. *Behavioral neuroscience*, 124(1), 106–114. <https://doi.org/10.1037/a0018307>
- 5) Benzler, J., Andrews, Z. B., Pracht, C., Stöhr, S., Shepherd, P. R., Grattan, D. R., & Tups, A. (2013). Hypothalamic WNT signalling is impaired during obesity and reinstated by leptin treatment in male mice. *Endocrinology*, 154(12), 4737–4745. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1746>
- 6) Benzler, J., Ganjam, G. K., Krüger, M., Pinkenburg, O., Kutschke, M., Stöhr, S., Steger, J., Koch, C. E., Ölkrog, R., Schwartz, M. W., Shepherd, P. R., Grattan, D. R., & Tups, A. (2012). Hypothalamic glycogen synthase kinase 3 $\beta$  has a central role in the regulation of food intake and glucose metabolism. *The Biochemical journal*, 447(1), 175–184. <https://doi.org/10.1042/BJ20120834>
- 7) Bertram E. (2007). The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia*, 48 Suppl 2, 65–74. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01068.x>
- 8) Bough, K. J., Valiyil, R., Han, F. T., & Eagles, D. A. (1999). Seizure resistance is dependent upon age and calorie restriction in rats fed a ketogenic diet. *Epilepsy research*, 35(1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(98\)00125-9](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(98)00125-9)
- 9) Budnik, V., & Salinas, P. C. (2011). Wnt signaling during synaptic development and plasticity. *Current opinion in neurobiology*, 21(1), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.12.002>
- 10) Busceti, C. L., Biagioni, F., Aronica, E., Riozzi, B., Storto, M., Battaglia, G., Giorgi, F. S., Gradini, R., Fornai, F., Caricasole, A., Nicoletti, F., & Bruno, V. (2007). Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 48(4), 694–705. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01055.x>
- 11) Chafey, P., Finzi, L., Boisgard, R., Caüzac, M., Clary, G., Broussard, C., Pégorier, J. P., Guillonneau, F., Mayeux, P., Camoin, L., Tavitian, B., Colnot, S., & Perret, C. (2009).

- Proteomic analysis of beta-catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway. *Proteomics*, 9(15), 3889–3900. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800609>
- 12) Chien, A. J., Conrad, W. H., & Moon, R. T. (2009). A Wnt survival guide: from flies to human disease. *The Journal of investigative dermatology*, 129(7), 1614–1627. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.445>
  - 13) Cisternas, P., Salazar, P., Silva-Álvarez, C., Barros, L. F., & Inestrosa, N. C. (2016). Activation of Wnt Signaling in Cortical Neurons Enhances Glucose Utilization through Glycolysis. *The Journal of biological chemistry*, 291(50), 25950–25964. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.735373>
  - 14) Duan, W., Guo, Z., Jiang, H., Ware, M., Li, X. J., & Mattson, M. P. (2003). Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2911–2916. <https://doi.org/10.1073/pnas.0536856100>
  - 15) Engel, J., Jr, & Pedley, T.A. (1997). Introduction: What is Epilepsy? In *Epilepsy: A Comprehensive Textbook Volume 1*. New York, Lipponcott-Raven; 1-10.
  - 16) Engel, J., Jr, McDermott, M. P., Wiebe, S., Langfitt, J. T., Stern, J. M., Dewar, S., Sperling, M. R., Gardiner, I., Erba, G., Fried, I., Jacobs, M., Vinters, H. V., Mintzer, S., Kieburtz, K., & Early Randomized Surgical Epilepsy Trial (ERSET) Study Group (2012). Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. *JAMA*, 307(9), 922–930. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.220>
  - 17) Goddard, G. V., McIntyre, D. C., & Leech, C. K. (1969). A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Experimental neurology*, 25(3), 295–330. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(69\)90128-9](https://doi.org/10.1016/0014-4886(69)90128-9)
  - 18) Greene, A. E., Todorova, M. T., McGowan, R., & Seyfried, T. N. (2001). Caloric restriction inhibits seizure susceptibility in epileptic EL mice by reducing blood glucose. *Epilepsia*, 42(11), 1371–1378. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.17601.x>
  - 19) Inestrosa, N. C., & Varela-Nallar, L. (2014). Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease. *Journal of molecular cell biology*, 6(1), 64–74. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt051>
  - 20) Inoki, K., Li, Y., Xu, T., & Guan, K. L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development*, 17(15), 1829–1834. <https://doi.org/10.1101/gad.1110003>
  - 21) Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C. Y., He, X., MacDougald, O. A., You, M., Williams, B. O., & Guan, K. L. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated

- phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126(5), 955–968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.055>
- 22) Koeller, H. B., Ross, M. E., & Glickstein, S. B. (2008). Cyclin D1 in excitatory neurons of the adult brain enhances kainate-induced neurotoxicity. *Neurobiology of disease*, 31(2), 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.04.010>
- 23) Kossoff, E. H., & Wang, H. S. (2013). Dietary therapies for epilepsy. *Biomedical journal*, 36(1), 2–8. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.107152>
- 24) Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S., & French, J. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6), 1069–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>
- 25) Kwan, P., & Brodie, M. J. (2006). Refractory epilepsy: mechanisms and solutions. *Expert review of neurotherapeutics*, 6(3), 397–406. <https://doi.org/10.1586/14737175.6.3.397>
- 26) Li, H., Kraus, A., Wu, J., Huguenard, J. R., & Fisher, R. S. (2006). Selective changes in thalamic and cortical GABA<sub>A</sub> receptor subunits in a model of acquired absence epilepsy in the rat. *Neuropharmacology*, 51(1), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.03.003>
- 27) Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 20, 781–810. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>
- 28) MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell*, 17(1), 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- 29) Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences*, 36(10), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001>
- 30) Nishimura, T., Schwarzer, C., Gasser, E., Kato, N., Vezzani, A., & Sperk, G. (2005). Altered expression of GABA(A) and GABA(B) receptor subunit mRNAs in the hippocampus after kindling and electrically induced status epilepticus. *Neuroscience*, 134(2), 691–704. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.04.013>
- 31) Norega M. A. (2013). TCF7L2 and glucose metabolism: time to look beyond the pancreas. *Diabetes*, 62(3), 706–708. <https://doi.org/10.2337/db12-1418>
- 32) Nusse R. (2005). Cell biology: relays at the membrane. *Nature*, 438(7069), 747–749. <https://doi.org/10.1038/438747a>
- 33) Palmer M. (2013). Combination treatment of epilepsy with ketogenic diet and concurrent pharmacological inhibition of cytochrome P450 2E1. *Medical hypotheses*, 80(4), 481–485. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.01.011>

- 34) Paxinos, Y. and Watson, C. (1986) *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Orlando.
- 35) Paz, C., Reygadas, E., & Fernández-Guardiola, A. (1985). Amygdala kindling in totally cerebellectomized cats. *Experimental neurology*, 88(2), 418–424. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(85\)90203-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(85)90203-1)
- 36) Paz, C., Gutiérrez-Baeza, F., & Bazán-Perkins, B. (1991). Transection of the superior cerebellar peduncle interferes with the onset and duration of generalized seizures induced by amygdaloid kindling. *Brain research*, 558(1), 90–92. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90718-b](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90718-b)
- 37) Phillips-Farfán, B. V., Rubio Osornio, M., Custodio Ramírez, V., Paz Tres, C., & Carvajal Aguilera, K. G. (2015). Caloric restriction protects against electrical kindling of the amygdala by inhibiting the mTOR signaling pathway. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 90. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00090>
- 38) Poulter, M. O., Brown, L. A., Tynan, S., Willick, G., William, R., & McIntyre, D. C. (1999). Differential expression of alpha1, alpha2, alpha3, and alpha5 GABAA receptor subunits in seizure-prone and seizure-resistant rat models of temporal lobe epilepsy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(11), 4654–4661. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-11-04654.1999>
- 39) Racine R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 32(3), 281–294. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
- 40) Rogers, A. E. (1979). "Nutrition," in *The Laboratory Rat*, eds H. J. Baker, J. R. Lindsey, and S. H. Weisbroth (Orlando, FL: Academic Press), 123–152. doi: 10.1016/B978-0-12-074901-0.50013-7
- 41) Rosiles, A., Rubio, C., Trejo, C., Gutierrez, J., Hernández, L., & Paz, C. (2016). Commentary: Participation of Sox-1 Expression and Signaling of  $\beta$ -Catenin in the Pathophysiology of Generalized Seizures in Cerebellum of Rat. *CNS & neurological disorders drug targets*, 15(1), 3–6. <https://doi.org/10.2174/1871527314666150821105001>
- 42) Rubio, C., Custodio, V., Juárez, F., & Paz, C. (2004). Stimulation of the superior cerebellar peduncle during the development of amygdaloid kindling in rats. *Brain research*, 1010(1-2), 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.03.015>
- 43) Rubio, C., Custodio, V., González, E., Retana-Márquez, S., López, M., & Paz, C. (2011). Effects of kainic acid lesions of the cerebellar interpositus and dentate nuclei on amygdaloid kindling in rats. *Brain research bulletin*, 85(1-2), 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.02.003>
- 44) Rubio, C., Rosiles-Abonce, A., Trejo-Solis, C., Rubio-Osornio, M., Mendoza, C., Custodio, V., Martínez-Lazcano, J. C., Gonzalez, E., & Paz, C. (2017). Increase Signaling of Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway and Presence of Apoptosis in Cerebellum of Kindled Rats. *CNS &*

*neurological disorders drug targets*, 16(7), 772–780.  
<https://doi.org/10.2174/1871527316666170117114513>

- 45) Rubio Osornio, M., Custodio Ramírez, V., Calderón Gámez, D., Paz Tres, C., Carvajal Aguilera, K. G., & Phillips Farfán, B. V. (2018). Metformin Plus Caloric Restriction Show Anti-epileptic Effects Mediated by mTOR Pathway Inhibition. *Cellular and molecular neurobiology*, 38(7), 1425–1438. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0611-8>
- 46) Rubio, C., Mendoza, C., Trejo, C., Custodio, V., Rubio-Osornio, M., Hernández, L., González, E., & Paz, C. (2019). Activation of the Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways in Cerebellum of Kindled Rats. *Cerebellum (London, England)*, 18(4), 750–760. <https://doi.org/10.1007/s12311-019-01030-8>
- 47) Seyfried T.N., Greene A.E., Todorova M.T. (2004) Caloric Restriction and Epilepsy. In: Stafstrom C.E., Rho J.M. (eds) Epilepsy and the Ketogenic Diet. Nutrition and Health. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-808-3\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-808-3_19)
- 48) Sosa, M. J. (2008). La dieta cetogénica en el manejo de la epilepsia refractaria (Ketogenic diet in the management of uncontrolled epilepsy). *Revista Mexicana de Pediatría*, 75(6), 284-288.
- 49) Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol. Cell*. 2004; 13:149–156.
- 50) Téllez-Zenteno, J. F., & Hernández-Ronquillo, L. (2012). A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research and treatment*, 2012, 630853. <https://doi.org/10.1155/2012/630853>
- 51) Vannucci, R. C., Yager, J. Y., & Vannucci, S. J. (1994). Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 14(2), 279–288. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1994.35>
- 52) Wang, H. S., & Lin, K. L. (2013). Ketogenic diet: an early option for epilepsy treatment, instead of a last choice only. *Biomedical journal*, 36(1), 16–17. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.107155>
- 53) Weindruch, R., Walford, R. L., Fligiel, S., & Guthrie, D. (1986). The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *The Journal of nutrition*, 116(4), 641–654. <https://doi.org/10.1093/jn/116.4.641>
- 54) Williamson, P. D., Engel, J. J., & Munari, C. (1997). Anatomic classification of localization related epilepsies. In: Engel JJ, Pedley TA, editors. Epilepsy: a comprehensive textbook, vol. 24. Philadelphia: Lippincott–Raven; p. 2405–16.
- 55) Wong M. (2013). Mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways in neurological diseases. *Biomedical journal*, 36(2), 40–50. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.110365>

56) Yamada K. A. (2008). Calorie restriction and glucose regulation. *Epilepsia*, 49 Suppl 8, 94–96. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01847.x>

## **CAPITULO II. CONCLUSIONES DEL PASANTE SOBRE SU SERVICIO SOCIAL**

### **5.1 En relación a su formación como persona**

Mi experiencia en el laboratorio de Neurofisiología Experimental fue satisfactoria para desarrollar habilidades personales fundamentadas en el pensamiento crítico, lo cual puede verse reflejado en mi vida diaria al momento de tomar decisiones basadas en el juicio y razonamiento. Asimismo, me ha permitido cuestionar el porqué de diversas situaciones que acontecen en el día a día. Otro aspecto importante que logré desarrollar se relaciona con la situación circunstancial de la pandemia de COVID-19, la cual se presentó como una dificultad tanto en mi entorno familiar como laboral; en esta cuestión encontré las fortalezas que me permitieron la capacidad de adaptación ante situaciones adversas, así como la optimización del tiempo para lograr los objetivos planeados.

### **5.2 En relación a su formación profesional**

El haber realizado mi servicio social en investigación me dio la oportunidad de colaborar con investigadores experimentados de los que aprendí el método científico y los cuales me transmitieron sus técnicas y experiencias en el ámbito de la investigación y que sin duda alguna me servirán en vida profesional como médico. Pude darme cuenta que el aspecto clínico y la investigación van de la mano y que una depende de la otra. Debido a que la línea de investigación del departamento donde realicé el servicio es de epilepsia, durante el servicio adquirí mas conocimientos sobre esta patología y un mayor interés por la etiología y el mecanismo molecular. Así mismo, aprendí a realizar técnicas de laboratorio, preparación de soluciones y manejo de animales de laboratorio, que aunque tal vez no las ocupe en mi vida profesional como médico clínico, me enseñaron el trabajo y procesos que hay detrás de los resultados de pruebas y tratamientos experimentales con los que el médico clínico está en contacto, y poder tener conocimiento de los procesos que se requirieron realizar para los trabajos de investigación.

### 5.3 En relación a su aportación a la comunidad

Durante mi servicio social pude colaborar en varios trabajos relacionados a la epilepsia, cuyos fines es comprender de una manera mas amplia esta patología, para poder descubrir tratamientos efectivos con mayor índice de resolución de los que existen actualmente, ya que a pesar de los avances en la medicina que ha habido en los últimos años, muchos pacientes con epilepsia tienen crisis de difícil control que no resuelven con medicamentos y que no son candidatos a cirugía de epilepsia, la cual también requiere recursos humanos y económicos que no todos los pacientes tienen la oportunidad de obtener. Con los trabajos en los que se me dio la oportunidad de colaborar, mi equipo y yo aportamos conocimiento necesario para el avance científico y el desarrollo del país, así como la inclusión de trabajos realizados en México en revistas internacionales que permiten dar a conocer al mundo que México realiza investigación y que aporta conocimiento para el avance tecnológico y científico de la humanidad.

### 5.4 En relación con su institución educativa

La Universidad Autónoma Metropolitana, da a sus estudiantes de medicina la oportunidad de realizar el servicio social en clínicas de atención primaria o en institutos de tercer nivel en investigación, debido a que la investigación también es parte fundamental del desarrollo de un médico ya que la medicina es una ciencia que siempre se está actualizando y hay muchas patologías que no tienen un tratamiento completamente resolutivo. Debido a esto, la Universidad Autónoma Metropolitana nos da la oportunidad a sus estudiantes de realizar servicio social en investigación para fortalecer esta parte fundamental de nuestra formación, además de involucrarnos en la investigación desde etapas tempranas de la carrera al pedirnos proyectos a entregar como parte de la calificación del trimestre, lo que nos ayuda a familiarizarnos con el método científico y la redacción de las ideas y los resultados.