

**MEJORAMIENTO DEL TRATAMIENTO ACTUAL DE LA EPILEPSIA
EXPERIMENTAL CONSIDERANDO LA NEUROINFLAMACIÓN MEDIADA POR
HEMICANALES**

Tesis entregada a

LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

**en Cumplimiento Parcial de los requisitos para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Neurociencia**

Facultad De Ciencias Por

Claudia García Rodríguez

Noviembre, 2023

Dirigida por: Juan Carlos Sáez

Co-Dirigida por: Álvaro Ardiles

ÍNDICE DE MATERIAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Epilepsia	5
Farmacología actual de la epilepsia	6
Inflamación en la epilepsia	8
Hemicanales implicados en la epilepsia	10
Neuroinflamación a nivel molecular y su implicancia en las convulsiones	12
Bloqueadores de hemicanales	13
Modelos animales de epilepsia	14
Hipótesis	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Materiales y reactivos	17
Cultivo de células HeLa	18
Cultivo de células astrogliales DI TNC1	19
Captación de colorante en células	19
Acoplamiento intercelular a través de canales intercelulares formados por conexina 43	20
Imágenes de señal de calcio intracelular	20
Medición de la liberación de ATP	21
Modelos animales	21
Modelos animales agudos de epilepsia	22
Modelos animales crónicos de epilepsia	24
Captación de colorante e inmunofluorescencia en cortes de cerebro	25
EEG y EMG cuantitativo	26
Aislamiento de ARN y qRT-PCR	27

Estudios de acoplamiento y dinámica moleculares	28
RESULTADOS	30
1. Valproato aumenta la actividad de los hemicanales formados por conexina 43, 30, 26 o panexina 1.	30
El etanol aumenta la actividad de hemicanales formados por conexina 43 o panexina 1.	30
El valproato aumenta la actividad de hemicanales formados por panexina 1.	32
El valproato aumenta la actividad de los hemicanales formados por conexina 43, conexina 30 o conexina 26.	34
El aumento de actividad del valproato sobre hemicanales formados por conexina 43 o panexina 1 no es reversible.	39
2. Efecto anticonvulsivante del D4 en modelos animales agudos y crónicos de epilepsia.	40
D4 previene el aumento de la actividad de los hemicanales inducidos por pentilentetrazol en células del hipocampo.	40
D4 previene el aumento de la actividad de los hemicanales inducida por kainato en astrocitos y microglía hipocampales.	43
Efectos antiepilépticos del D4 sobre el electroencefalograma y electromiograma de ratones epilépticos debido al kainato	47
Efecto protector del D4 en modelo animal crónico inducido con pilocarpina, debido a disminución en la neuroinflamación.	51
El postratamiento con D4 revierte los cambios en los niveles de ARN mensajero de genes neuroinflamatorios y sinápticos en la TLE.	53
3. Efecto de la boldina en un modelo animal agudo de epilepsia inducido por kainato.	55
4. Efecto anticonvulsivante del boldo y valproato sobre el modelo de epilepsia crónico inducido por pentilene tetrazol.	60
Efecto antiepiléptico del boldo y/o valproato en un modelo murino de epilepsia crónica.	60
Efecto de valproato y/o boldo sobre la captación de colorante de astrocitos, microglía y neuronas hipocampales después de la exposición a pentilene tetrazol.	62
Correlación entre severidad de las convulsiones, actividad de los hemicanales presentes en astrocitos, microglía y neuronas, y reactividad de astrocitos y microglía.	71
La apertura de los hemicanales formados por conexina 43 o panexina 1 por parte del valproato se revierte mediante infusión de boldo, la cual no afecta a los canales de <i>gap junctions</i> formados por la conexina 43.	77
5. Estudio de acoplamiento y dinámica molecular del valproato con los hemicanales.	80

Acoplamiento y dinámica molecular del valproato con el hemicanal formado por conexina 43.	80
Acoplamiento molecular del valproato con el hemicanal formado por panexina 1. ..	84
6. Virtual screening de moléculas con posible capacidad antiepiléptica.	86
7. La boldina bloquea blancos moleculares implicados en epilepsia.	91
DISCUSIÓN	95
CONCLUSIONES.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	116

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Definiciones oficiales según la ILAE.....	6
Tabla 2. Valores de cada muestra de la escala de Racine, niveles de fluorescencia y número de células activadas para cada condición.....	72
Tabla 3. Resultados del Virtual Screening de dos bases de datos (diversity 3 y 6) sobre la grilla 6 de la conexina 43.....	87
Tabla 4. Resultados del Virtual Screening de dos bases de datos (Diversity 3 y 6) sobre la grilla 9 de la conexina 43.....	88
Tabla 5. Moléculas de base de datos diversity 3 que realizan docking con conexina 43 y panexina 1.....	89
Tabla 6. Moléculas de base de datos diversity 6 que realizan docking con conexina 43 y panexina 1.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. El etanol aumenta la actividad de los hemicanales formados por conexina 43 o panexina 1.	31
Figura 2. El valproato aumenta la actividad de los hemicanales formados por panexina 1..	33
Figura 3. Captación de colorante a lo largo del tiempo en células HeLa que expresan conexina 43 – EGFP, conexina 30, conexina 26 y parentales knock out para conexina 45...	35
Figura 4. El valproato aumenta la actividad de los hemicanales formados por conexina 43, conexina 30 o conexina 26.....	35
Figura 5. El valproato aumenta la liberación de ATP a través de los hemicanales formados por conexina 43.....	36
Figura 6. La ausencia de Ca^{2+} extracelular potencia el aumento de actividad los hemicanales formados por conexina 43 inducido por valproato.	37
Figura 7. El valproato aumenta la actividad de los hemicanales presentes en astrocitos.	38
Figura 8. Lavados tras aplicar el valproato en hemicanales formados por conexina 43 o panexina 1 no revierten su efecto.....	40
Figura 9. D4 previene el aumento de la actividad de los hemicanales inducida por pentilentetrazol en las células del hipocampo.	42
Figura 10. D4 previene los cambios inducidos por pentilentetrazol en la permeabilidad de la membrana celular.	43
Figura 11. D4 previene el aumento de la captación de etidio por los astrocitos del hipocampo y la activación astrogliar causada por kainato.	45
Figura 12. D4 previene el aumento de la captación de etidio por la microglía del hipocampo y la activación de la microglía causada por kainato.....	46
Figura 13. Efecto antiepiléptico del D4 en el estado epiléptico inducido por ácido kaínico.	48
Figura 14. La acción anticonvulsiva de D4 depende de la gravedad del status epilepticus..	50
Figura 15. El D4 disminuye la activación de astrocitos y microglías en TLE.....	52
Figura 16. El D4 después del status epilepticus rescata los niveles alterados de ARNm de proteínas neuroinflamatorias y sinápticas en el hipocampo.....	55
Figura 17. La boldina previene el aumento en la captación de etidio en astrocitos hipocampales y su activación causada por niveles altos y bajos de kainato.	57
Figura 18. La boldina previene el aumento en la captación de etidio en microglías hipocampales y su activación causada por niveles altos y bajos de kainato.	58
Figura 19. La boldina previene el aumento de la captación de etidio por los astrocitos y la microglía del hipocampo causado por una dosis elevada de kainato.	59
Figura 20. El tratamiento con hojas de boldo y/o valproato reduce la mortalidad y la gravedad de las convulsiones en el modelo murino crónico de epilepsia inducido por pentilentetrazol.....	62
Figura 21. Las hojas de boldo y/o el valproato afectan la captación de colorante de los astrocitos presentes en el giro dentado en ratones epilépticos crónicos.....	64
Figura 22. Medición de la captación de colorante y de la reactividad GFAP de los astrocitos en diferentes condiciones.	65

Figura 23. Las hojas de boldo y/o el valproato afectan la captación de colorante de la microglía presente en el giro dentado en ratones epilépticos crónicos.	67
Figura 24. Captación de colorante y reactividad Iba1 de las microglías en diferentes condiciones.	68
Figura 25. Las hojas de boldo y/o el valproato afectan la captación de colorante de las neuronas presentes en el giro dentado en ratones epilépticos crónicos.....	70
Figura 26. Medición de la captación de colorante de las neuronas en diferentes condiciones.	70
Figura 27. Análisis de correlación entre los valores de escala de Racine obtenidos para ratones epilépticos tratados con boldo, y distintos parámetros medidos en tejido hipocampal de los mismos.....	73
Figura 28. Análisis de correlación entre los valores de escala de Racine obtenidos para ratones epilépticos tratados con valproato, y distintos parámetros medidos en tejido hipocampal de los mismos.	75
Figura 29. Análisis de correlación entre los valores de escala de Racine obtenidos para ratones epilépticos tratados con boldo y valproato, y distintos parámetros medidos en tejido hipocampal de los mismos.	76
Figura 30. El valproato aumenta la captación de colorante de las células HeLa transfectadas con conexina 43-EGFP o panexina 1-EGFP y esto es prevenido o bloqueado por completo con una infusión de boldo.	78
Figura 31. La infusión de boldo no cambia la actividad de canales intercelulares mediados por gap junctions formados por conexina 43.	79
Figura 32. Acoplamiento molecular inicial del valproato con el hemicanal formado por conexina 43.	81
Figura 33. Acoplamiento molecular del valproato con conexina 43.	83
Figura 34. Acoplamiento molecular del valproato con panexina 1.....	85
Figura 35. Efecto de la boldina sobre canales no selectivos implicados en la epilepsia.....	93
Figura 36. Apertura de hemicanales formados por conexina 43 o panexina 1, por derivados de boldina.....	94

Durante años, la búsqueda de nuevos medicamentos para el tratamiento de la epilepsia se ha basado en blancos moleculares presentes en las neuronas. El valproato (VPA), medicamento anticrisis utilizado mundialmente, también ejerce su función sobre las neuronas. Por este motivo no se han considerado otros procesos como la neuroinflamación en el diseño de tratamientos para la epilepsia. Los hemicanales (HCs) presentes en glías y neuronas, son un blanco importante para disminuir la neuroinflamación, ya que su activación aumenta la excitabilidad cerebral, por lo que debería empeorar la epilepsia. Ya que hay poca información acerca del efecto de VPA sobre los HCs, primero se comprobó si VPA afecta la actividad de los HCs formados por conexina 43 (HCs Cx43) (expresados en astrocitos y microglía), Cx30, Cx26 (expresados en astrocitos), y panexina 1 (Panx1; expresados principalmente en neuronas, y también presentes en astrocitos, microglías y oligodendrocitos). Usando células HeLa como modelo de expresión exógena y experimentos de captación de colorante para evaluar el estado funcional de los HCs, descubrimos que VPA aumenta la actividad de los HCs, especialmente cuando se encuentran pre-activados. Para entender mejor el mecanismo de acción del VPA sobre los HCs, se realizaron experimentos de acoplamiento y dinámica molecular, que revelaron que el VPA se une a residuos citoplasmáticos de los HCs Cx43 y HCs Panx1. Además, el lavado con la solución de registro en ausencia del VPA, no revirtió su efecto, lo que confirma que el efecto del VPA es reversible y requiere de HCs activos para su ingreso e interacción con los residuos implicados aumentando de esta manera la actividad de los HCs.

Luego, se estudió si el bloqueo de los HCs tiene efectos anticonvulsivos y antiinflamatorios en distintos modelos animales de epilepsia. Se observó que D4, molécula bloqueadora de HCs Cxs pero no de HCs Panx1, previene el aumento de la actividad de HCs de las glías y neuronas, y la neuroinflamación asociada a la reactividad de astrocitos y microglías en modelos agudos inducidos con pentilinetetrazol (PTZ), o con kainato, y un modelo crónico mediado por pilocarpina. Se observó que el D4 tiene efecto anticonvulsivante y protege de la muerte inducida por convulsiones epilépticas. Además, se observaron disminuciones a nivel de la amplitud y frecuencia de la actividad eléctrica hipocámpal y corteza prefrontal, y un post-tratamiento con D4 recupera, a nivel basal, la expresión de genes implicados con la neuroinflamación, comprobándose así que, el bloqueo de los HCs Cxs es anticonvulsivante y antiinflamatorio en la epilepsia.

Para evitar cumplir con las etapas requeridas por la FDA, quisimos estudiar si el boldo, árbol endémico medicinal chileno, y la boldina, principal alcaloide con características antiinflamatorias y antioxidantes, presentan propiedades similares al D4. Así, se estudió el efecto de la boldina en un modelo animal de epilepsia agudo inducido por kainato. Se comprobó que la boldina previene la activación de los HCs y reactividad de los astrocitos y microglías inducida por PTZ, debido a que bloquea HCs Cx43, Cx30, Cx26, Panx1, y el P2X7R. Por otro lado, se generó un modelo crónico de epilepsia *kindling* con PTZ, y se administró un post-tratamiento de VPA y/o hojas de boldo. Ambos tratamientos redujeron significativamente la mortalidad y la sintomatología de los ratones epilépticos. El tratamiento con hojas de boldo bloqueó los HCs de astrocitos, microglía y neuronas, y además redujo la reactividad de los astrocitos y microglías. En el modelo animal también se comprobó que el VPA por sí solo aumenta la actividad de los HCs. Así, queda demostrado que el VPA aumenta la actividad de los HCs Cxs y HCs Panx1, y por tanto podría favorecer la neuroinflamación. Toda esta evidencia nos muestra además que, la respuesta inflamatoria juega un papel relevante en la sintomatología de la epilepsia y que el uso de boldo, u otros inhibidores de los HCs, reducen la neuroinflamación, por lo que podrían ser considerados como agentes complementarios y efectivos para tratar la epilepsia.