



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA EXCITABILIDAD EN UN MODELO MURINO
DE DISPLASIA CORTICAL**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
ANA ITZEL AQUILES REYES**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS CONCHA LOYOLA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR
DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
ÁREA NEUROCIENCIAS**

**DR. GERARDO ROJAS PILONI
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

QUERÉTARO, MÉXICO 4 DE AGOSTO DE 2023

*A mi padre, quién siempre estuvo y estará detrás de la inspiración por crecer
cerca del conocimiento así como del entusiasmo por él.*

A mi madre, a quién le debo todo.

A mi hermano

Agradecimientos

- A La Universidad Nacional Autónoma de México, al programa de posgrado en Ciencias Biomédicas y al Instituto de Neurobiología.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT (Becaria: 756903, CVU:823795)
- A la Unidad de Enseñanza del Instituto de Neurobiología, por su orientación y apoyo, en especial a Maria del Carmen Mendoza López.
- A la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología, a Elsa Nydia Hernandez Ríos, a la Dra. Ericka A. de los Ríos Arellano y a Ma. Lourdes Palma Tirado, por su apoyo, paciencia y orientación.
- Al Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM) por el soporte en la captura de una parte de los datos de esta tesis.
- Al laboratorio de Neuroendocrinología comparada, en la Facultad de Ciencias, por el soporte en la captura de datos empleados en este tesis.
- A mi tutor principal, al Dr. Luis Concha y a los miembros del comité tutor, Dr. Gerardo Rojas Piloni y Dr. José Bargas Díaz, por la orientación, consejos y guía durante mi formación como doctora en Ciencias, Gracias.
- Al Dr. José Bargas Díaz, por creer en mi y en mi trabajo. Gracias.
- Al Dr. Luis Concha, por la diligencia que desarrollé bajo tu tutoría. Gracias, Luis.
- A la Dra. Tatiana Fiordelisio, por continuar guiándome, apoyándome y creyendo en mí. Muchas gracias, Tat.
- Al Dr. Román Rossi Pool, por todo el apoyo al final de mi formación, por las charlas sobre ciencia, la guía que me diste y por regresarme las ganas de seguir en este camino. Gracias.
- A la M en C. Mirelta Regalado, por toda su atención, cariño y tiempo. Gracias, Mire.
- A las Dras. C. Alejandra Rodríguez-Arzate, Marianne L. Martínez-Mendoza y a Gabriela B. Gómez-Gonzáles. por darme sus consejos y enseñanzas, tanto en el ámbito académico como en la vida. ¡Muchas gracias!

Agradecimientos

Agradezco a todas y todos mis compañeros del Instituto, por hacer más ameno el posgrado sobre todo a los que me ayudaron a seguir cuando no sabía que quería seguir, en especial a Ricardo Ríos, Mildred Salgado, Paulina Villaseñor, Alfonso Fajardo, David Cortés, Annie Luma, Alejandra López, Itzamná Sánchez. ¡Gracias por todo!

A Sergio Parra, Ian Belaustegui y Balam Ishiwara, de quienes aprendí mucho los últimos meses del posgrado. Gracias por todas las risas y charlas científicas.

A Eduardo Chorenño, Maru Bernal y Alan Valdéz, quiénes siempre me recuerdan lo grande que es ser Biólogo@, por su confianza e impulso, los admiro mucho a cada uno de ustedes.

A Juan, Natalia, Leo, Lore, Suemy y Alex, por su amistad y cariño en todo momento.

Prefacio

... I seem, then, in just this little thing to be wiser
than this man at any rate, that what I do not know
I do not think I know either.- **Sócrates**
[from the Henry Cary literal translation of 1897]

"Nothing in biology makes sense except in the light of evolution" ... Fueron las palabras con las que inicié mi primer día como estudiante de Biología. La primera clase era, Historia y filosofía de la ciencia y evidentemente no entendía la importancia de ella y mucho menos veía venir las numerosas ocasiones en la que otros profesores y profesoras iban a recordármela o que incluso yo misma jugaría con ella y que ahora haga apertura de esta tesis con las palabras de Theodosius Dobzhansky [1]. Me permito retomarlas, para darle un sentido *especial* o más bien, *legítimo* a este proyecto de investigación que a continuación encontrarás. En su ensayo, Dobzhansky inicia con la anécdota de cómo el jeque Abd el Aziz bin Baz, en 1966, pedía al rey de Arabia Saudita, que detuviera la herejía que se esparcía en su pueblo debido a que las ideas de Copérnico habían llegado a los habitantes y el rumor de que la tierra no era plana y que giraba al rededor del sol, eran muy fuertes. En algo tenía razón, Abd el Aziz, no podrían basarse sólo en una teoría, hacía falta hechos, o pruebas que permitieran su credibilidad. Lamentablemente lo que Abd el Aziz ignoraba era que en esa época las exploraciones espaciales ya habían comenzado, y ya existían pruebas de que la tierra no era redonda y que giraba al rededor del Sol. Esta incredulidad que exponían el jeque Abd, era muy similar ante las ideas de la teorías sobre la evolución, muchos naturalistas y biólogos posteriores, carecían de pruebas que sostuvieran esa idea. Afortunadamente años más tarde avances en biología molecular y genética fueron contribuyendo más y más a las evidencias de que cada organismo se adapta a su entorno y eso implica que existan cambios morfológicos que permitan la adecuación de los mismos, al entorno, generando variedades de formas y tamaños, pero así mismo compartiendo algunas similitudes como las que se comparten durante el desarrollo de cada uno, por ejemplo, durante el desarrollo

embrionario de vertebrados. Esta idea es antigua en el pensamiento evolutivo, desde el siglo XIX muchos naturalistas empezaban a plantearse la posibilidad de que tuvieramos similitudes entre seres vivos. Richard Owen [2], fue uno de ellos, quién adjudicaba esta similitud a una fuerza natural que moldeaba de manera distinta la morfología de cada vertebrado; se refería a una *fuerza adaptativa* que acomodaba a las estructuras a cumplir con su propósito adaptativo (1849).

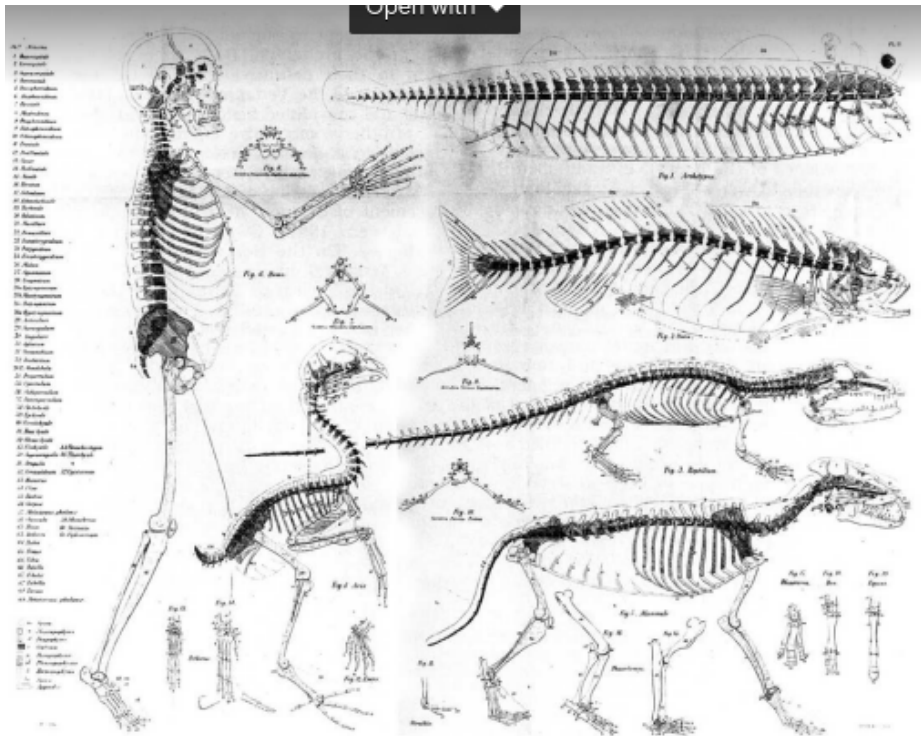


Figura 1: Esquema de Richard Owen 1849 en *On the nature of the limbs*. Recopilado del *Jano de la Morfología*, 2017. Ana Barahona y Carlos Ochoa

Esta idea fue posteriormente retomada y replanteada con el *Origen de las especies*, 1859 [3] donde se plantea que las especies cambian a lo largo del tiempo dando origen a nuevas especies y compartiendo un ancestro común, o en otras palabras, que las características morfológicas y funcionales no son estáticas, si no que están en constante cambio y algunos de estos cambios pueden dar origen a nuevos organismos que provienen de un mismo origen. Estos cambios generalmente toman una cantidad de tiempo considerable en la que pueden pasar millones de años antes de que surja una nueva especie. No obstante durante ese tiempo también pueden ocurrir cambios que afecten la adaptación de los seres

vivos, como se ha propuesto que sucede con la evolución humana. Algunos autores sugieren que dado a nuestro corto periodo de vida en la tierra, hemos acelerado nuestra adaptación provocando varios cambios en nuestros genes, muchos de ellos debido a nuestros hábitos en la vida diaria. Wilton M. Krogman, en su ensayo *Scars of human evolution*[4], menciona que nuestra evolución no ha sido del todo exitosa, muchas *cicatrices* son consecuencia del bipedismo que ahora poseemos; originalmente nuestro esqueleto fue diseñado para adaptaciones en cuatro patas, como aún son nuestros ancestros más cercanos, pero al tener esta modificación muchas cosas cambiaron, para bien y para mal, las buenas yo sé que las conoces y que una de ellas es que ahora escribo el inicio de esta tesis y tú puedes comprenderme, pero las malas son bastante interesantes, desde mi punto de vista. Krogman enfatiza en su revisión, que estas cicatrices evolutivas,

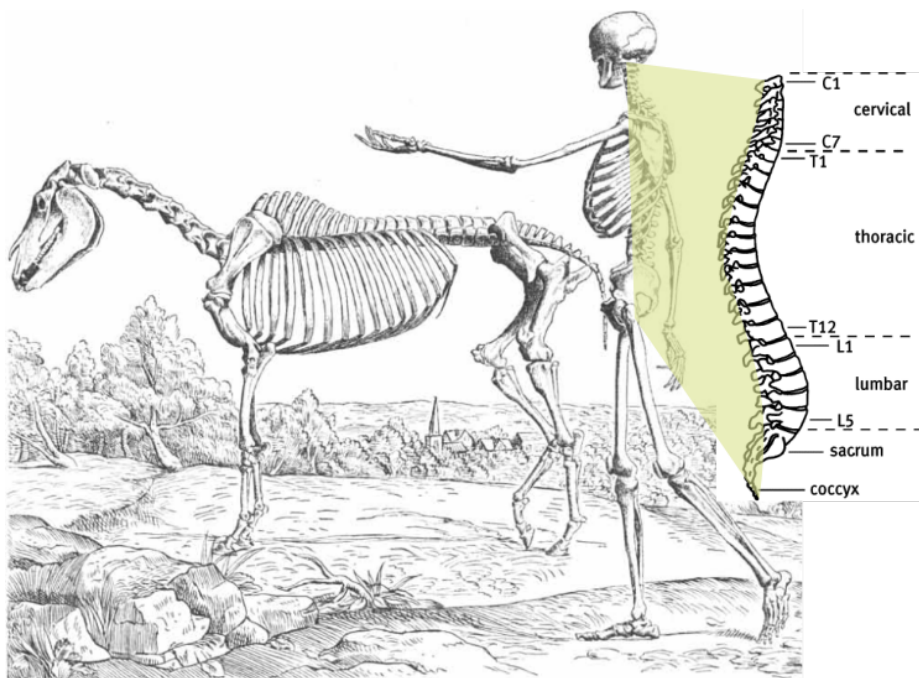


Figura 2: Modificación de la columna vertebral en cuadrúpedos y bípedos. Adaptado de: Wilton, M. Krogman 1951

son distintas a los vestigios evolutivos que aún prevalecen en nuestro organismo, pero que ya no son funcionales, o no tienen la misma importancia de antes, como la cola remanente que está en la base de la espina dorsal (el coxis), o el apéndice, etc... Dentro de los cambios más obvios está la reestructuración de la columna vertebral, que antes estaba ligeramente arqueada y ahora al ser bípedos, la columna se arquea de manera similar a una "s", teniendo un balance mecánico poco favorable. Es increíble el hecho de que nazcamos con una columna vertebral arqueada de manera similar a nuestros ancestros cuadrúpedos

Fig.2, pero conforme se da nuestro desarrollo post-natal, comienza a arquearse a la forma que nos permite caminar en dos patas. Debido a este cambio en la estructura columnar, existen modificaciones en los discos vertebrales, que permiten este arqueado. El talón de Aquiles de toda esta modificación está en las lumbares, justo donde es más pronunciado el arqueamiento y por lo mismo, más inestable. Esta cicatriz evolutiva comienza a marcarnos a muchos, cerca los 30's o, si no tienes mucha suerte, mucho antes. Otra modificación con cicatriz, reside en el eje de nuestro sistema óseo, que es la pelvis (Ilión, Isquion, Pubis). Al caminar erguidos, el sistema gastrointestinal y urogenital, se encuentran sostenidos principalmente por musculatura que se ancla a estos huesos, por lo que algunas modificaciones morfológicas tuvieron que suceder en este proceso, uno de los males fue la consecuencia del peso que ahora contribuyen al dolor de espalda baja, y a la propensión de padecer de la ciática. Como estas cicatrices se describen otras en la revisión de Krogman, que prefiero en esta ocasión incitarlos a que lean su escrito, sobre todo si se han preguntado en algún momento sobre el origen de las muelas de juicio o las hernias; para este fin lo que busco es sembrar una semilla de curiosidad sobre estos procesos evolutivos y cuestionar la información que hemos aprendido sobre ellos, por ejemplo cuestionar la idea del pico de la evolutivo en el que supuestamente se encuentra el ser humano, principalmente por características como un cerebro con neocorteza, que para llegar a las características que hoy en día posee la neocorteza de primates humanos, pasaron apenas 25 millones de años, es decir, es demasiado reciente, en tiempos evolutivos esto puede considerarse apenas unas cuantas horas. Sin embargo tuvo su origen hace aprox. hace 100 millones de años en mamíferos pequeños similares a los roedores, por lo que las características que tenemos hoy día pueden ser propensas al cambio aún, seguir evolucionando, y algunos de esos cambios también concebirán errores, quizás hasta cicatrices evolutivas. Entender el proceso de la formación cortical, es importante en para cuestionar sus procesos y fallas, de manera introductoria esta formación inicialmente conllevó una serie de cambios en el desarrollo que involucraban regulación de muerte celular, de crecimiento y división y así mismo de proliferación. Por su puesto que todo lo anterior orquestado por una maquinaria compleja y ordenada que paso a paso daba lugar a un peldaño más de la neocorteza.

La hipótesis de su formación más aceptada y posteriormente comprobada fue la de la edificación radial (*Rakic 1978*), esta proponía su origen a través de células que están orientadas de manera vertical y originadas en el sitio de la zona ventral, que es la zona de proliferación celular Fig.3. Estas células estarían regulados por factores anti-apoptóticos y pro-apoptóticos, que regularan principalmente la primera división celular (simétrica) que dará paso eventualmente a las divisiones asimétricas que formaran las distintas capas y columnas corticales [5]. Esta hipótesis posteriormente sería confirmada y detallada principalmente por el trabajo de Chen & Walsh [6] 20 años más tarde.

En la tesis que tienes en tus manos, o más real a mi época de titulación, en tu pantalla encontrarás el trabajo de investigación que me tomó 5 años, no 1 ni 2 como yo creía que podría llevarme, claramente a mis 22 años, subestimaba los tiempos de la ciencia y de montar un proyecto desde su raíz, proponer

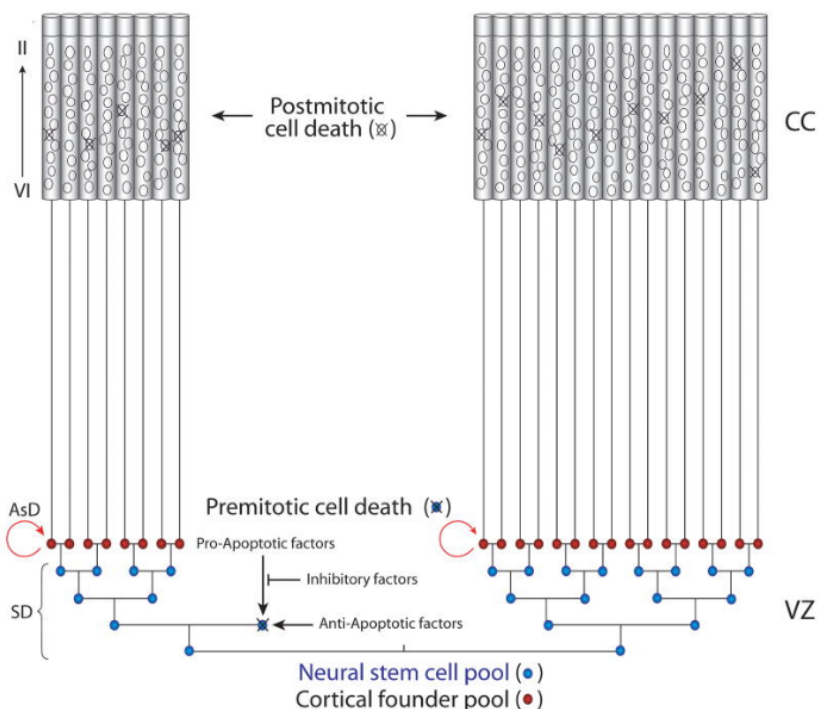


Figura 3: Esquema de la Hipótesis de la unidad radial, propuesta por Rakic, 1978. Adaptado de: Rakic, 2009

ideas y comprobarlas. Si continúas con la lectura notarás que el proyecto en cuestión aborda alteraciones funcionales de una malformación cortical (displasias corticales), que al parecer sigue siendo única de humanos, y cuya función alterada repercute en la epilepsia, aunque no en todos los casos. Las ideas propuestas se comprobaron en cortezas de roedores, con organización cortical similar, muy similar a la nuestra y más primitiva inclusive. Así mismo encontrarás la descripción de cómo se lleva a cabo esta formación cortical, y las posibles causas de las malformaciones. Los puntos abordados en este prefacio fueron algunos de los varios que me surgieron como ideas desde los orígenes de este proyecto, cuando apenas comenzaba a estudiar el problema de las malformaciones corticales en las que nos enfocamos, empecé a preguntarme si estas malformaciones podrían ser consecuencia de una cicatriz, diminuta, pero al final cicatriz evolutiva, debido a la complejidad en la regulación de muchísimas más células y divisiones que las que existían antes; esta idea o perspectiva es el deslance de mi trabajo, la cual encontrarás en la tercera parte de este escrito, aunque quiero aclarar desde ahora que es sólo una perspectiva y que por su puesto falta evidencia antes de poder decir algo más al respecto.

Prefacio

Si llegaste al final de este prefacio y no eres parte de mi comité evaluador, te dejo mi correo por si te surge alguna pregunta o discusión sobre este trabajo:
anaaquiles@ciencias.unam.mx

Índice general

Agradecimientos	iii	
Prefacio	v	
Índice general	xi	
Índice de figuras	xiii	
Índice de cuadros	xv	
1	Introducción	1
1.1	Corteza cerebral: <i>desarrollo cortical</i>	1
1.2	Etapas del desarrollo cortical (<i>prenatal</i>), en roedores y su similitud en humanos	2
1.3	Malformaciones corticales: <i>lo que sabemos de ellas</i>	3
1.4	Contenido	6
I	Primera Parte, <i>Displasias Corticales</i>	8
2	Displasias Corticales Focales (epidemiología)	9
2.1	Displasias Tipo II y la generación de epilepsia	11
2.2	Neuroimagen de Displasias Corticales	11
2.3	Características genéticas de las displasias corticales	14
3	Modelos experimentales de las displasias corticales	18
3.1	Modelos animales de Displasias corticales por agentes químicos	18
3.2	BCNU o carmustina (1,3-bis(2-cloroetil)nitrosurea)	20
3.3	Modelo de displasias por BCNU	21
4	Epileptogénesis	25
4.1	Características clínicas y modelos experimentales	25
4.2	Cascada epileptógena <i>mecanismos involucrados</i>	29
4.3	Estudio de epileptogénesis con actividad de calcio intracelular	30
II	Segunda parte, <i>Marco teórico</i>	33
5	Marco Teórico	34
5.1	Antecedentes	34

5.2	Problema y justificación	35
5.3	Hipótesis	35
5.4	Objetivo General	35
5.5	Objetivos Particulares	35
6	Métodos y resultados	36
6.1	Inducción del modelo de displasia por BCNU	36
6.2	Caracterización macro y micro-estructural	36
6.3	Inmunofluorescencia con marcaje específico a capas IV,VI y NeuN (neuronas)	37
6.4	Evaluación de la actividad neuronal individual y por conectividad. Registros de $[Ca^{2+}]_i$	38
6.5	Resultados	41
7	Discusión y conclusión	50
7.1	Conclusión	52
III	Tercera parte, <i>Epílogo</i>	53
8	Perspectiva	54
A	Apéndice I	62
A.1	Sincronía por oscilaciones de señales periódicas	62
A.2	Osciladores: espacio fase	63
A.3	Osciladores con pulsos acoplados: contribuciones Charles S. Peskin	64
A.4	Ruptura de simetría	65
B	Apéndice II	67
B.1	Sincronía desde la perspectiva de redes neuronales	67
C	Artículos derivados de este proyecto de investigación	68
	Referencias	71

Índice de figuras

1	Esquema de Richard Owen 1849	VI
2	Modificación de la columna vertebral en cuadrúpedos y bípedos. Adaptado de: <i>Wilton, M. Krogman 1951</i>	VII
3	Esquema de la Hipótesis de la unidad radial, propuesta por Rakic, 1978. Adaptado de: <i>Rakic, 2009</i>	IX
1.1	Diferenciación glial	2
1.2	Desarrollo cortical (<i>roedores</i>)	4
1.3	Desarrollo cortical, y malformaciones corticales (<i>humanos</i>)	5
2.1	Displasias Corticales, primeras evidencias	10
2.2	Displasias Corticales citoarquitectura (Tipo I, II)	12
2.3	Imágenes por resonancia magnética de displasia tipo II a y b	14
2.4	Imágenes por resonancia magnética de displasia tipo IIb	15
2.5	Cascada de señalización de la vía mTOR	16
2.6	Alteraciones en la vía mTOR en Displasias Focales	17
3.1	Mecanismo de acción de agentes alquilantes	20
3.2	Modelo de displasia por BCNU. Evidencias	22
3.3	Alteraciones histológicas de displasia por BCNU	23
3.4	Alteración en la prolongación axonal por el modelo BCNU	24
4.1	Eventos del desarrollo cerebral en la niñez	26
4.2	Esquema de la cascada epileptógena	27
4.3	Actividad hiperexcitable por pilocarpina <i>in vitro</i>	29
4.4	Señalización de calcio intracelular	30
4.5	Actividad de calcio en células epilépticas	32
6.1	Registro de actividad neuronal	39
6.2	Características macroestructurales de cerebros P30, Controles y BCNU	41
6.3	Características microestructurales de cerebros P30, Controles y BCNU	43
6.4	Características morfológicas neuronales	44
6.5	Marcadores específicos a capa	45
6.6	Marcadores específicos a GFAP, astrocitos	46
6.7	Valores de potencia durante la actividad basal y posterior al estímulo de Pilocarpina	47
6.8	Comunicación neuronal antes, durante y después del estímulo hiperexcitable	49

8.1	Esquema de la Hipótesis de la unidad radial, propuesta por <i>Rakic, 1978</i>	55
8.2	Esquema de la relación filogenética de los saurópsidos y los sinápsidos (mamíferos extintos y terápsidos (incluyen a los reptiles-mamíferos)), ambos amniotas.	56
8.3	Co-expresión de genes en aves y mamíferos	57
8.4	Homología de áreas corticales entre reptiles y mamíferos	58
8.5	Hipótesis del origen de las capas corticales superiores	59
8.6	Proporción de modelos animales más usados y descritos en la neurobiología	60
A.1	Péndulos de reloj inventados por Christiaan Huygens. Adaptado de: <i>Strogarts & Stewart, 1993</i>	62
A.2	Péndulos de reloj y su espacio fase.	63
A.3	Ejemplos de posibilidades de sincronía en el acoplamiento de 2 o más osciladores	66

Índice de cuadros

1.1	Eventos principales durante el desarrollo cortical	3
1.2	Malformaciones corticales	7
2.1	Clasificación de Displasias Corticales	13
3.1	Modelos animales de Displasias Corticales	19
4.1	Factores que contribuyen a la epileptogénesis y su temporalidad	28

Capítulo 1

Introducción

1.1. Corteza cerebral: *desarrollo cortical*

Antes de comenzar el desarrollo de antecedentes de la base del problema de estudio de este trabajo, es pertinente ubicarnos en la noción del proceso de desarrollo de la corteza cerebral de los mamíferos. Esta se encuentra distribuida en capas corticales, las cuales se diferencian unas de otras gracias a la diversidad de morfologías que contienen, así como también por la distinción de zonas corticales dentro de la misma, por el arreglo estructurado que presenta [7]. En todos los mamíferos la neocorteza se forma en la superficie de la vesícula cerebral embrionaria, en el lado rostral terminal del tubo neural, gracias a la migración y proliferación de neuronas primitivas a esta región [8]. Se encuentra poblada principalmente por dos clases de neuronas, las interneuronas y las neuronas que proyectan. Las interneuronas se conectan localmente dentro de la neocorteza y son en su mayoría de actividad inhibitoria; las neuronas que proyectan envían axones a las zonas más distantes en el cerebro, siendo gran parte de ellas de actividad excitatoria [8]. Ambas son generadas en las zonas ventricular (VZ) y supraventricular (SVZ) de la corteza, adyacente a los ventrículos laterales del cerebro [9]. Generalmente en estas formaciones intervienen otros tipos de mecanismos, anteriormente mencionados que es el de la regulación de su formación mediante la migración de otro tipo celular y la glía radial [9, 10] ya que funcionan como guía. Formalmente la glía radial no representa un tipo celular neuronal, aunque es considerado como uno de los tipos celulares precursores a las neuronas, Fig 1.1. Además de facilitar la migración neuronal Fig 1.3, la glía radial también favorece la regionalización de la neocorteza, ya que funciona como límite en la migración neuronal también [10]. En roedores las dos principales clases de neuronas de actividad excitatoria se generan a partir de la glía radial en la región dorsal VZ, o bien pueden derivarse de progenitores intermedios que se encuentran en la zona SVZ; mientras que en humanos, la glía radial genera subpoblaciones de células progenitoras que se movilizan principalmente en la SVZ. Existen algunas otras variaciones entre especies de mamíferos, relacionadas al tamaño del cerebro y a la temporalidad en la que ocurren los procesos de diferenciación, proliferación y migración, involucrados en la formación de las capas y zonas corticales, por no adentrarse en la especificidad genética que presenta cada mamífero en esta organización, aunque también existen vías de señalización muy conservadas que se comparten como se describirá más adelante [5]. Estos procesos celulares están direccionados por otras señales internas que tienen su propio orden, ya sea expresión de genes o de proteínas que organizan en tiempo y espacio la proliferación, migración y diferenciación. Siendo un número vasto de expresiones genéticas involucradas en este proceso, cualquier alteración o modificación que

1. Introducción

ocurra a este nivel, repercute en la migración y diferenciación de cada célula, abriendo paso a las posibilidad de una mala migración neuronal, que repercuten en muchas ocasiones en enfermedades (NMDs, por sus siglas en inglés Neuronal Migration Disorders), las cuales forman parte de las Malformaciones Corticales (MCD's, por sus siglas en inglés Malformation of Cortical development), que suelen ser muy heterogéneas y complejas, así como también un verdadero reto al momento de su estudio y caracterización [9]. Previo a la descripción de estas malformaciones, se describirán a continuación las etapas del desarrollo cortical, correspondientes a los principales eventos y sus temporalidades, en humanos y su comparación con roedores, información que será relevante para el entendimiento de las mismas y del Capítulo 3.

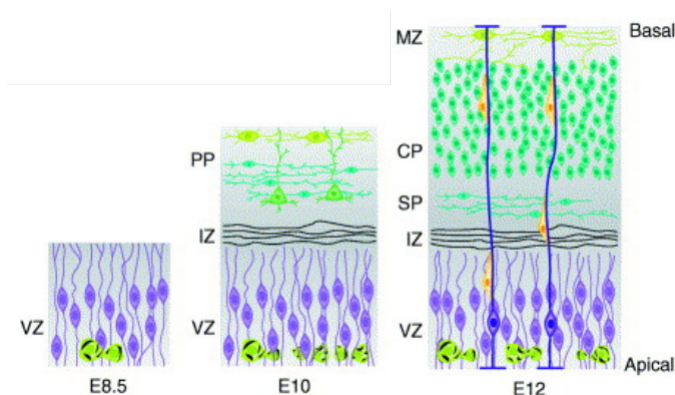


Figura 1.1: **Diferenciación glial durante E8.5,10 y 12(E, embrionic day o día de gestación).** Tres diferentes etapas del desarrollo, al día 8.5 de gestación 10 y 12. EN las tres fases se muestra la división de células primitivas, en verde; en morado, el proceso de maduración de las mismas, a células gliales. En la etapa E8.5, las células primitivas se localizan en lo que se denomina zona ventricular (VZ), posteriormente en la etapa E10 y E12, se empiezan a desarrollar otras regiones como la zona intermedia (IZ), la preplaca (PP), que después se dividirá en subplaca y placa cortical (SP, PC, respectivamente) y la zona marginal (MZ). Modificado de: [8]

1.2. Etapas del desarrollo cortical (*prenatal*), en roedores y su similitud en humanos

Partiendo de la base de que los mamíferos compartimos varias secuencias de eventos durante el desarrollo embrionario, no es de sorprendernos que roedores y humanos compartamos etapas del desarrollo cortical durante la gestación (prenatal) y después del nacimiento (postnatal), diferenciándonos en este sentido, esencialmente por la duración de cada una de ellas. [11-16]. Teniendo en cuenta que la gestación en humanos (40 semanas) es más larga que en roedores (21 días), los procesos de desarrollo son más cortos en roedores; en la tabla 1.2 se resumen los principales eventos de desarrollo prenatales y su temporalidad en humanos y roedores,

Humano	Roedor	Evento cortical
semana 4- 12 de gesta- ción	<E11	Proliferación de células precursoras y Pico de neurogénesis.
semana 14-28 de gesta- ción	E11 - 16	Gliogénesis, diferenciación y migración celular. (Arreglo cortical)
semana 28-40 de gesta- ción	PN 0-14	Crecimiento de volumen cerebral, diferen- ciación glial, sinaptogénesis y mielinización <i>de novo</i>

Cuadro 1.1: Resumen de los principales eventos del desarrollo cortical, con su temporalidad en humanos y roedores. Abreviaciones, PN (postnatal day o día postnatal). [12, 16, 17]

La corticogénesis en mamíferos como los roedores inicia entre los días 9 -10 de gestación, mientras que en los humanos, empieza a partir de la cuarta semana, este inicio implica proliferación de celular progenitoras, o neuroepiteliales que son las se diferenciarian eventualmente en los distintos tipos celulares que constituirán a la corteza, incluyendo a la glía. Como se mencionó antes la diferenciación de la glía es vital en la ejecución de este proceso, ya que funcionará como guía de migración celular e incluso de diferenciación a partir del segundo trimestre en humanos y del día de gestación 11-16 en roedores, como lo muestra la Fig 1.2 y 1.3, posterior a esta etapa la migración celular continúa así mismo como la organización laminar de la corteza cerebral y a su vez empiezan a generarse las primeras comunicaciones neuronales en el tercer trimestre en humanos y en roedores esto no ocurre si no hasta los primeros días post nacimiento [12, 16, 17]. La importancia de esclarecer la temporalidad de estos eventos durante el desarrollo cortical en humanos y roedores radica en la comprensión de las malformaciones que pueden generarse a lo largo del mismo, y extrapolarlo a la implementación de modelos animales que ayuden a la descripción de características intrínsecas de las patologías que conllevan, como se describe más adelante en el Capítulo 3.

1.3. Malformaciones corticales: *lo que sabemos de ellas*

La presencia de MCD’s afecta la estructura y la función de la región cerebral en donde se encuentren, provocando diversas alteraciones. De hecho se sabe que las MCD’s en humanos son causa de un retraso en el desarrollo embrionario, capacidades intelectuales distintas e incluso epilepsia, incluso se ha descrito que puede afectar hasta un 40 % de los casos pediátricos con crisis refractarias [9, 17].

Recientes estudios han demostrado que estas malformaciones suelen ser heterogéneas a distintos niveles, genético, morfológico y fisiológico y algunas de las razones de su variabilidad son las diversas variaciones genéticas y mutaciones que pueden estar involucradas en diferentes etapas del desarrollo cortical [17].

1. Introducción

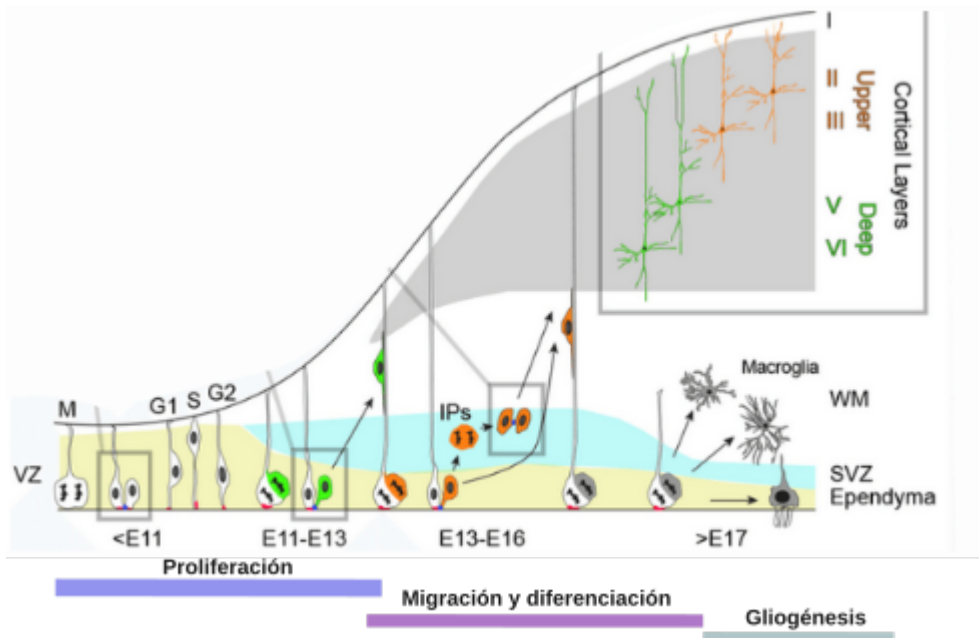


Figura 1.2: **Esquema del desarrollo cortical en roedores.** Desarrollo espacio temporal de la corteza en roedores. En los primeros días, ocurre la división de células progenitoras (proliferación celular). Las células verde y naranja, representan las futuras neuronas corticales de las capas inferiores y superiores, respectivamente, y debajo del esquema se señala el o los procesos principales que están ocurriendo en cada etapa del desarrollo. En azul, se representa la proliferación, en morado la migración y diferenciación y en gris, la gliogénesis, que ocurre al final de la organización laminar de la corteza. Modificado de [12]

Fig1.3Tabla1.3.

Diversas mutaciones provocan distintos fenotipos de arreglos alterados, sin embargo una de las sugerencias que se han encontrado que convergen en las malformaciones corticales focales es la activación de la vía mTOR por sus siglas en inglés (mammalian Target Of Rapamycin), que se encuentra mejor descrita en el capítulo 2. De manera general, se encarga de modular la proliferación, crecimiento, movilidad, migración y muerte de las células. Esta vía juega un rol muy importante durante el desarrollo embrionario, en la formación del cerebro y también en la etapa adulta, ya que permanece activa y ayuda a mantener el metabolismo y la reorganización de sinapsis en el cerebro. La función de esta vía depende de dos complejo heteroméricos, mTORC1 y mTORC2. mTORC1 es modulado por las proteínas TSC1 Y TSC2, las cuales se saben que se encuentran con mutaciones en la esclerosis tuberosa. Pero otras lesiones muy frecuentes y provocadas por alteraciones en esta vía, más específicamente con la alteración de la proteína DEPDC5, son las displasias corticales focales (FCD, Focal Cortical Dysplasia por sus siglas en inglés) cuya repercusión morfológica por su alteración cortical puede llegar a desarrollar epilepsia en humanos [9, 18]

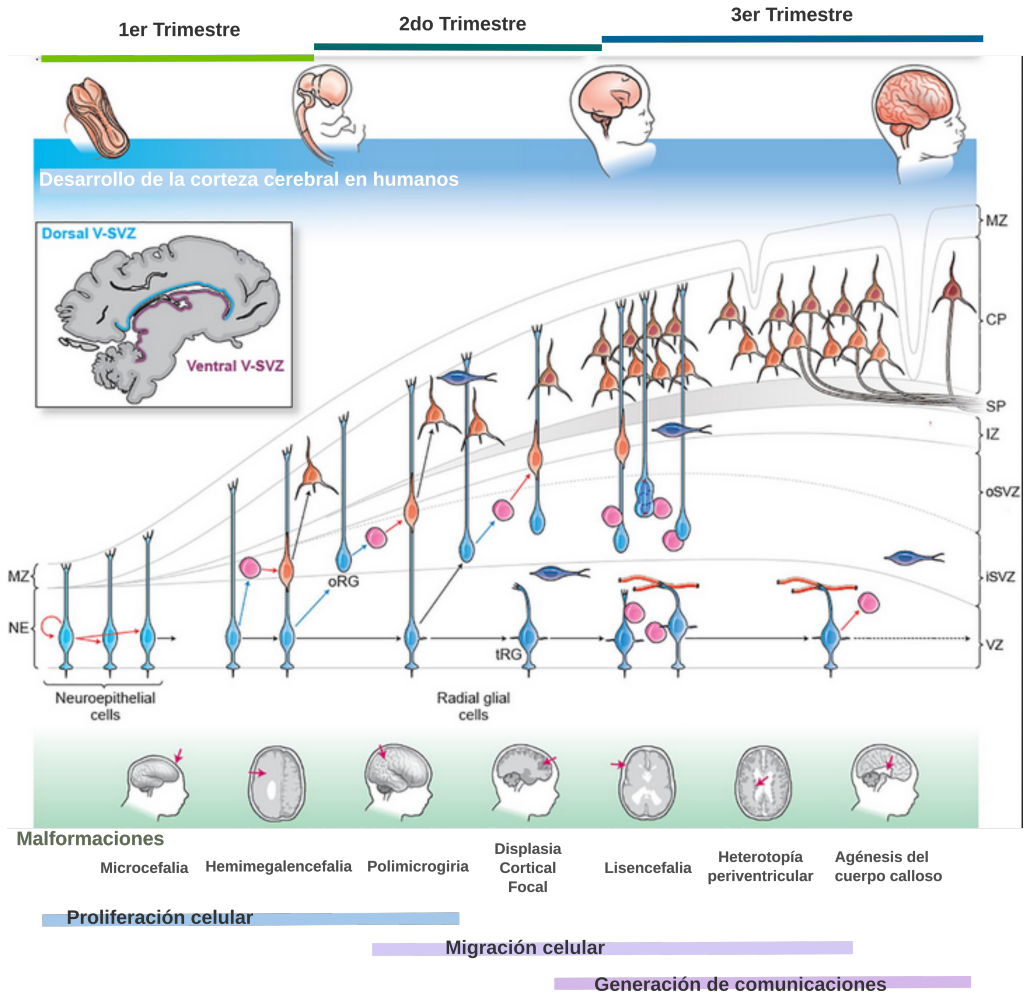


Figura 1.3: Esquema de diferenciación neuronal a lo largo del desarrollo embrionario de humanos. En azul, se encuentra temporalmente el desarrollo trimestral y debajo el proceso esquematizado de proliferación, migración, diferenciación celular y generación de comunicaciones. En la parte sombreada verde se encuentran los tipos de malformaciones que ocurren bajo las alteraciones que se llevan a cabo durante generación. Modificado de [17]

1.4. Contenido

El resto de la tesis tiene una intención meramente descriptiva de la investigación en la que fue basada este estudio, terminando con los resultados y los hallazgos que están centralizados a sólo una de las malformaciones corticales descritas en este Capítulo, las displasias corticales, como se resume en las siguientes líneas:

Primera Parte

Capítulo 2 Descripción específica de la epidemiología y biología de las displasias corticales, iniciando desde el contexto histórico, hasta los hallazgos que existen hasta el momento de los procesos que las generan.

Capítulo 3 Aproximaciones de estudio en modelos experimentales. Cómo funciona el modelo de estudio de displasia por BCNU y fisiología celular de la aproximación desde este modelo.

Capítulo 4 Primeros acercamientos de la epileptogénesis en torno a estas malformaciones así como las propuestas fisiológicas que hasta ahora describen este proceso de generación de la epilepsia. Orígenes de la sincronía, ¿Por qué las cosas se sincronizan en sistemas biológicos?

Segunda Parte

Capítulo 5 Antecedentes del proyecto de investigación, problemática y justificación con los objetivos e hipótesis correspondientes.

Capítulo 6 Desarrollo de la metodología empleada en la evaluación y descripción de los resultados obtenidos.

Capítulo 7 Discusión de los resultados de la investigación así como conclusiones y preámbulo de la perspectiva.

Tercera Parte: Epílogo

Capítulo 8 Visión evolutiva de estas malformaciones.

Apéndices

Apéndice A Descripción de sincronía en términos de oscilación y coherencia de fase.

Apéndice B Descripción de sincronía desde la perspectiva de redes neuronales.

Apéndice C Artículos producto de el trabajo de investigación de la presente tesis.

Proceso celular afectado	Malformación resultante	Características generales
Proliferación celular y apoptosis	Microcefalia, Macroencefalia, Hemimegalencefalia	Tamaño cerebral anormal, sobrecrecimiento de alguno de los hemisferios, o parte de ellos.
Migración neuronal	Displasias Corticales Focales, Lisenencefalia Tipo I, Heterotopía Periventricular, Heterotopía subcortical de la banda	Deslaminación cortical y células amorfas, ausencia o no de pliegues, posición de neuronas ectópicas, banda de la materia gris posicionada de manera anormal.
Organización neuronal	Lisencefalia de empedrado, Polimicrogiria, Esquizencefalia	Sobremigración de neuronas posicionadas en la superficie cerebral, reducción de pliegues o demasiados y amorfos,

Cuadro 1.2: Clasificación de las malformaciones corticales considerando el proceso celular afectado durante el desarrollo, el nombre de la malformación de producen y un breve descripción de ellas. Modificado de: [9]

Parte I

Primera Parte, *Displasias Corticales*

Capítulo 2

Displasias Corticales Focales (epidemiología)

Taylor, D.C. en 1971 [19] y su grupo de investigación médica de Reino Unido, se percataron de anomalías celulares que presentaban algunos tejidos extraídos de diferentes regiones del cerebro de pacientes jóvenes y adultos Fig.2.1 diagnosticados con epilepsia intratable, es decir resistente a fármacos. Posterior a evaluaciones histológicas de los tejidos extraídos, se dieron cuenta de que en cada caso persistían anomalías en la morfología celular cortical, poblaciones de células con morfología anormal, cuyas consecuencias fisiológicas involucraron deterioro cognitivo y crisis epilépticas espontáneas recurrentes (CEER) de forma variada entre ellos. En su investigación comparan a estos tejidos con otras lesiones previamente descritas como lo es la esclerosis tuberosa característica por generar una estructura cortical anormal en arreglos tubulares Fig2.1c, sin embargo las lesiones que ellos evaluaban no se parecían en lo absoluto, y no obstante tenían un desarreglo cortical, así que por primera vez describen a las displasias corticales como alteraciones variables que tienen un arreglo laminar alterado, con células con morfología aberrante que incluso a veces se llegaban a encontrar en materia blanca [19]. Posteriormente y con más evidencia histológica, estas lesiones fueron descritas como parte del grupo de las malformaciones corticales, que se caracterizan de forma general por la presencia de alteraciones en la distribución laminar cortical, así como también aberraciones en la morfología celular que conforman a la corteza, en donde están comprometidos los procesos de maduración y migración, involucrando a las células gliales, también presentan alteraciones en la mieloarquitectura e incluso, disminución de la barrera entre la materia gris y blanca [20]. Estas alteraciones se han evidenciado con marcajes citoplasmáticos que resaltan un fallo, alteración o detención en la diferenciación celular, consecuencia de la inmadurez celular que presentan estas lesiones. Uno de los tipos celulares más frecuentes en ciertos grados de desarreglo son las células en forma de globo, que son prácticamente células no diferenciadas muy alteradas estructuralmente. Las alteraciones en el proceso de migración, están involucradas en la desorganización entre capas corticales a lo largo de la placa cortical [21]. Desde inicios del siglo XXI se encuentran clasificadas en tres grupos principales de acuerdo al grado de lesión que pueden presentar, Tipo I,II,III [22] Cuadro.2.1, sin embargo, actualmente se sabe que cada grupo contiene un subgrupo que puntualiza las variaciones que se pueden presentar dentro de cada tipo, según la última clasificación de ILAE por sus siglas en inglés (International League Against Epilepsy)[23]. Estas malformaciones siguen siendo un problema de salud a nivel epidemiológico ya que los casos de estudio de los cuales se ha llegado a describirlas y clasificarlas han sido posterior a la evocación de epilepsia.

2. Displasias Corticales Focales (epidemiología)

Sin embargo como se mencionó en el capítulo 1, y como se retoma en unas líneas posteriores en este, la generación de las mismas sucede en el desarrollo embrionario, principalmente se sugiere que es por la activación de la vía mTOR. No obstante los factores ambientales que llevan a la activación de esta vía, aún no son claros [24], algunas evidencias demuestran que esto podría ser una consecuencia a la infección de las madres por el virus del papiloma humano, HPV16, para ello 50 muestras de la lesión de sujetos con displasia tipo II, fueron analizados a nivel genético y coincidía con la presencia de la oncoproteína E6 relacionada con la presencia del virus [25, 26], pero desafortunadamente este hallazgo no pudo replicarse en dos estudios subsecuentes de individuos diferentes [27, 28]. Por otro lado, gracias a exploraciones de estas lesiones mediante el uso de modelos animales que se describen en el capítulo 3 se ha logrado entender que dependiendo el grado de la activación de la vía mTOR y las mutaciones que se originen, es lo que hace que una displasia genere o no epilepsia [29].

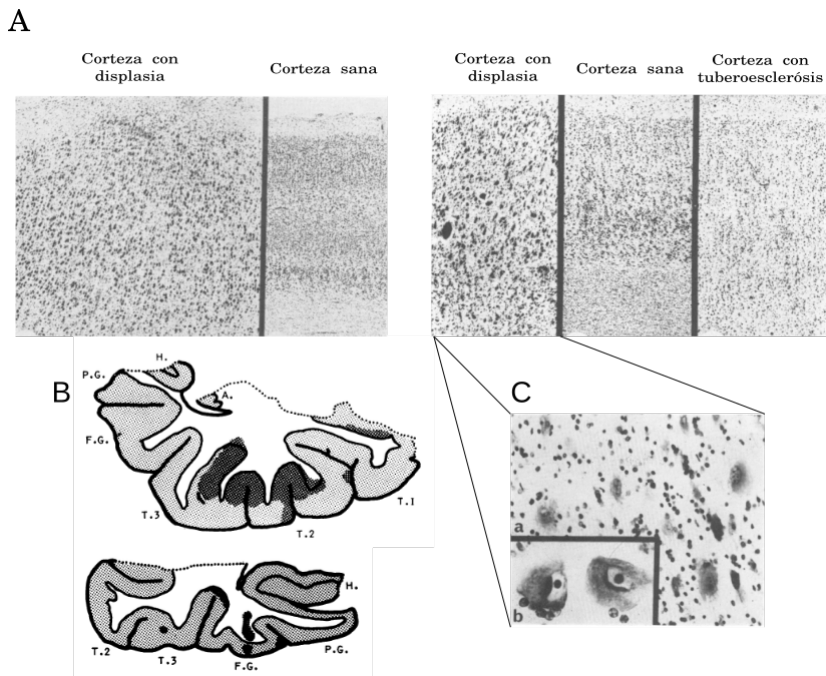


Figura 2.1: **Primeras descripciones de cortezas deslaminadas.** En el panel A, observamos la histología de regiones de la corteza lesionada y su comparación con un tejido sano, de dos pacientes (izq, der). En el panel derecho se compara a la displasia cortical con una corteza con esclerósia tuberosa. Panel B, esquema de la variabilidad en extensión y regionalización de las displasias evaluadas. La lesión representada por el gris oscuro en cada esquema. C, un acercamiento a una zona con displasia evidenciando la morfología celular alterada, y la evidencia de las células globo. Modificado de: [19]

2.1. Displasias Tipo II y la generación de epilepsia

Dentro de la clasificación antes descrita en la tabla 2.1 Fig 2.2, las displasias tipo II son las más comunes en el diagnóstico del síndrome de epilepsia refractaria con resistencia a fármacos, además de la epilepsia del lóbulo temporal. Siendo que las FCD tienen una incidencia del 20-25 % en pacientes diagnosticados con este tipo de epilepsia. Entre estos se han encontrado a las FCD tipo II en un 29-39 % en aquellos pacientes tratados quirúrgicamente con una mayoría de pacientes pediátricos. No obstante este sigue siendo un estimado ya que en su mayor parte los pacientes suelen diagnosticarse bajo el criterio de epilepsia refractaria resistente a fármacos, únicamente [30].

La prevalencia o semiología de epilepsia en estos pacientes varía, es decir pueden existir casos en los que los pacientes presentaron CEER una o dos veces en alguna etapa de su vida, pero después no tienen ninguna, o por el contrario, nunca presentar y en la etapa adulta evocar la primera, esto puede deberse al compromiso o riesgo que se adopta a lo largo del desarrollo y también a la región cerebral en donde se encuentre la lesión, generalmente aquellas crisis que se presentan en una etapa temprana, puede llegar a considerarse como un indicio de desarrollo de CEER frecuentes, así como también una posible extensión de la lesión que comprometa a todo un lóbulo cerebral. Se ha descrito también que las crisis pueden ser severas dependiendo de la edad, en niños se suelen observar con mayor frecuencia lo que se le conoce como espasmos infantiles, mientras que los pacientes adultos llegan a desarrollar CEER locales [30]. Para la evaluación y caracterización de los tipos de crisis epilépticas que pueden desencadenar se suele usar registros de actividad eléctrica, mediante electroencefalogramas (EEG), pero también resultan ser muy variables entre pacientes con caracterizados dentro del tipo II. Pueden presentar grandes amplitudes de respuesta, actividad con múltiples espigas neuronales (poly spike), variaciones en el cambio de atenuación de actividad entre bajos y altos valores de amplitud de la señal, entre otras similares a actividades epilépticas generadas por otras causas [30, 32]. A pesar de que las FCD's son las lesiones congénitas más comunes que se han registrado con un tratamiento quirúrgico en pacientes con epilepsia fármaco resistente [33], la gran variabilidad que presentan no sólo a nivel morfológico sino fisiológico también hace muy complicado diagnosticar y caracterizarlas únicamente mediante estudios de EEG, principalmente porque no todos los pacientes con displasias presentan crisis epilépticas [32].

2.2. Neuroimagen de Displasias Corticales

Una de las técnicas utilizadas en el estudio de anomalías y anatomía cerebral son, por ser otro método no invasivo, las imágenes por resonancia magnética, las cuales han sido ampliamente usadas para la detección de enfermedades del sistema nervioso ya que con ellas se puede obtener mucha información, desde el volumen relativo de estructuras cerebrales, hasta la detección específica de áreas cerebrales alteradas ([34]. Entre estas alteraciones están las malformaciones

2. Displasias Corticales Focales (epidemiología)

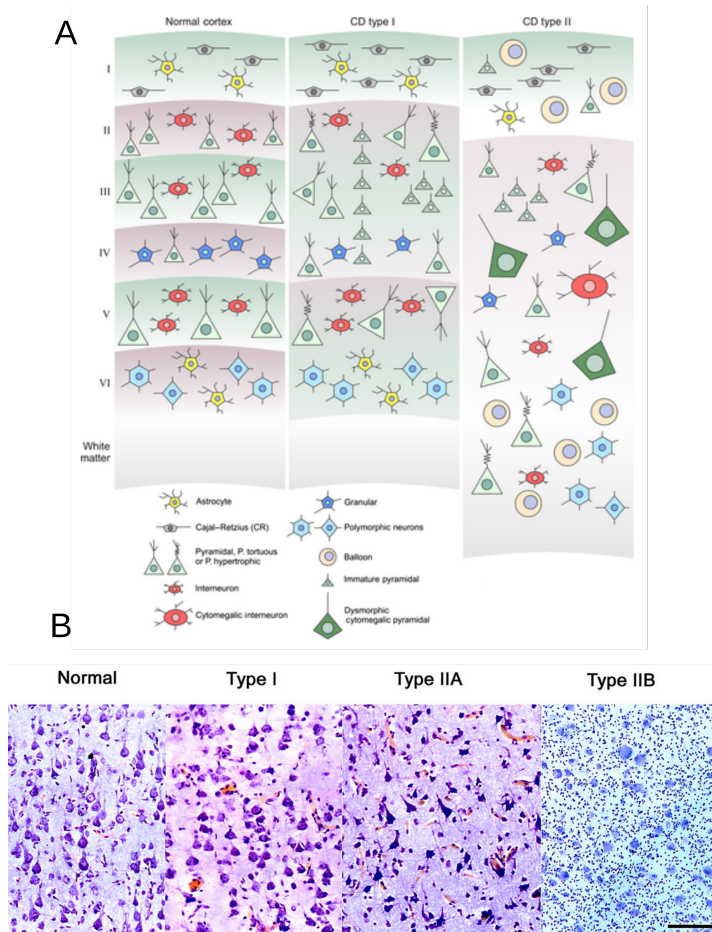


Figura 2.2: Citoarquitectura de Displasias Tipo I y II A. Representación esquemática del arreglo en capas corticales en una corteza normal, otra con Displasia Tipo I, en donde existe una alteración en la morfología celular, así como en el arreglo laminar, y la de Tipo II, en donde existe una completa deslaminación, células globo, y pérdida de la barrera entre materia gris y blanca. B. Arreglo citoarquitectónico (tinción azul de toluidina) de una región cortical humana, normal y con displasia tipo I, IIA y IIB. Modificado de: [31], [22]

corticales, como las FCDs Fig. 2.3. De hecho algunos autores sugieren que esta técnica ha revolucionado su diagnóstico y manejo, ya que favorece su localización que en la mayoría de los casos se relaciona con la región epileptogénica, es por esto que en muchos estudios médicos se suele recurrir a esta técnica previamente a un tratamiento quirúrgico y una reevaluación posterior al mismo. No obstante, la variabilidad en extensión y lesión de estas malformaciones complica en casi un 50 % su localización Fig. 2.3 y 2.4, ya que en ocasiones pueden presentarse de manera sutil en alguna región cortical. Es por esta última razón que se les ha llegado a considerar dentro de la clasificación de epilepsia criptogénica, por la

Displasia Tipo I	Laminación cortical anormal, radial Tipo Ia.	Laminación tangencial anormal Tipo Ib. , Laminación cortical anormal tangencial y radial Tipo Ic.
Displasia Tipo II	Displasia con células dismórficas Tipo IIa.	Displasia con células dismórficas y células globo Tipo IIb.
Displasia Tipo III	Anormalidades en la laminación del lóbulo temporal asociada con esclerosis hipocampal Tipo IIIa.	Laminación cortical anormal adyacente a tumores gliales o glioneurales Tipo IIIb. Displasia con malformaciones vasculares Tipo IIIc. Displasias adyacentes a otra lesión adquirida en el desarrollo (isquemia, trauma o encefalitis) Tipo IIId.

Cuadro 2.1: Clasificación de las displasias corticales considerando las características sobresalientes de cada subtipo. Modificado de: [23]

dificultad de su localización en muchos de estos casos [35]. La exploración de nuevos contrastes de imagen y aumento de calidad en su adquisición, son retos que no sólo involucran la posibilidad de encontrar biomarcadores a través de esta técnica si no su prognosis temprana también. Dentro de las características estructurales, que se han encontrado con imágenes anatómicas por resonancia magnética, están el adelgazamiento de la corteza cerebral (50-92 % de los casos), difuminación del límite entre la materia gris y blanca (60-80 %), hipointensidad en el contraste entre materia gris y blanca (42-47 %) o bien hiperintensidad de la materia gris (46-92 %) en regiones puntuales de la corteza [36-38]. Los porcentajes de detección de estas características varían de acuerdo al tipo de displasia que se encuentre 2.1 y al contraste de imagen que se use[35]Fig 2.4. A pesar de que los esfuerzos por mejorar la calidad de las imágenes continúan y que sin lugar a dudas esto abriría oportunidades para su diagnóstico temprano, aún resulta complicado comprender y caracterizar a estas lesiones sobre todo por existen muchas preguntas en torno a su funcionalidad, ya que poseen todas presentan epileptogénesis y no siempre se desarrolla esta alteración funcional en la misma etapa del desarrollo.

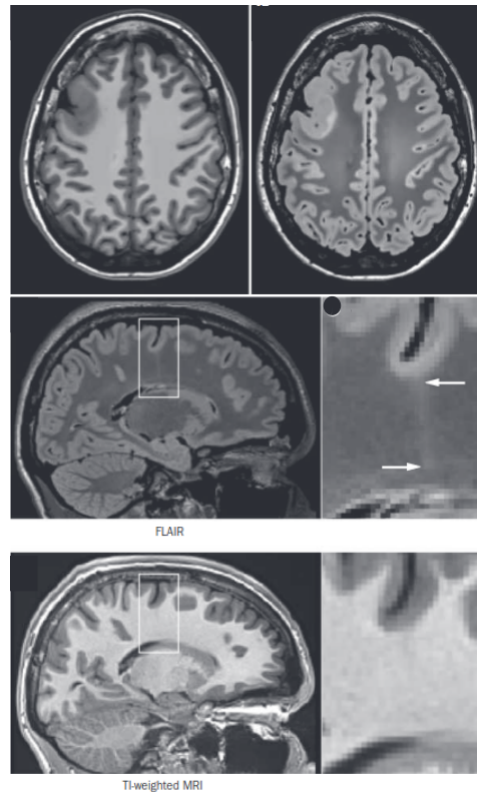


Figura 2.3: Imágenes de alta resolución 3T mostrando dos variedades de displasia tipo II. El Panel de arriba muestra un ejemplo de Displasia Tipo IIb, con dos distintos contrastes de imagen, pesadas a T1, izq. FLAIR, der. La lesión se muestra en el lóbulo frontal evidenciado por un engrosamiento de la corteza cerebral. En el panel de abajo se muestra un ejemplo de displasia tipo IIa, usando los mismos contrastes de imagen, FLAIR y pesadas a T1. Lesión evidenciada por las flechas. Modificado de: [35]

2.3. Características genéticas de las displasias corticales

Además del desarrollo de herramientas que ayuden a su detección y diagnóstico temprano, también se han llevado a cabo estudios de los principales factores genéticos que dan lugar a las displasias corticales. Como se mencionó en la introducción, (capítulo 1), estas malformaciones involucran alteraciones en el ciclo celular, específicamente de procesos de proliferación y migración (bushmann y capello). Al hablar de alteraciones en estos procesos, es inevitable trasladar el estudio a un nivel más micro (nivel genético) en donde la vía mTOR por sus siglas en inglés (mammalian target of rapamycin) es la vía protagónica de su regulación. Fue descubierta y descrita a partir de los años 70's, en donde se le empezó a comprender gracias a su rol en la regulación del desarrollo celular, así como también del desarrollo del tamaño de cada organismo [39, 40]. De manera

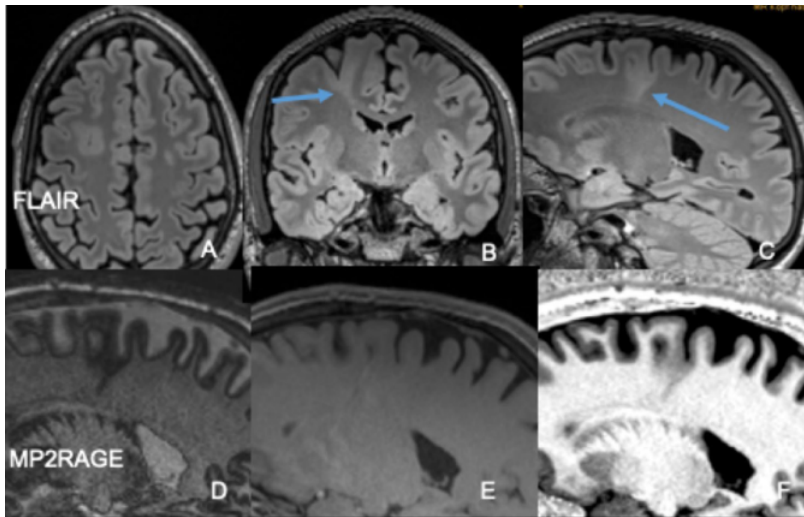


Figura 2.4: **Displasia Tipo IIb, resaltada por dos distintos contrastes de imagen.** Corte axial, coronal y sagital de una displasia Tipo IIb en contraste FLAIR (A,B,C). MP2-RAGE (D,E,F) contraste de displasia tipo IIb a diferentes tiempos invertidos. Modificado de: [37]

general podemos entender la relevancia de esta vía, como un orquestador de la asimilación de nutrientes, regulación de factores de crecimiento, lo que la involucra en procesos como la autofagia, biogénesis ribosomal y metabolismo. Esta vía consiste en dos multi-complejos protéicos, es decir dos conjuntos de proteínas, de las cuales sólo uno reacciona con rapamicina. La principal diferencia entre ambos es su conformación, ya que una contiene proteínas Raptor, cuya actividad cinasa se inhibe con rapamicina y la otra contiene proteínas Rictor, que en algunos casos puede bloquear la inhibición del complejo que contiene a las Raptor [41]. La regulación del crecimiento celular ocurre gracias al complejo de las proteínas Raptor, ya que activa la traducción de ARN mensajeros, a través de la activación de proteínas de la misma cascada de señalización, como la cinasa KS61 y 4E-BP1. Por otro lado el complejo de proteínas Rictor, se especializa en la señalización celular involucrada en la proliferación, metabolismo, supervivencia y formación del citoesqueleto Fig 2.5

2.3.1. Alteraciones en la vía mTOR asociadas a enfermedades

En los recientes años se ha llegado a describir que alteraciones en la activación y regulación de la vía mTOR es de enfermedades congénitas y también neurodegenerativas y cáncer, hipertrófica cardíaca e incluso el desarrollo de diabetes tipo II [42]. Recientes estudios han descrito que alteraciones como mutaciones somáticas, es decir, mutaciones no heredables pero que pueden ocurrir en la traducción de información de cualquier proceso celular, en este caso en la vía P1K3/Akt/mTOR, están involucradas también en la generación de

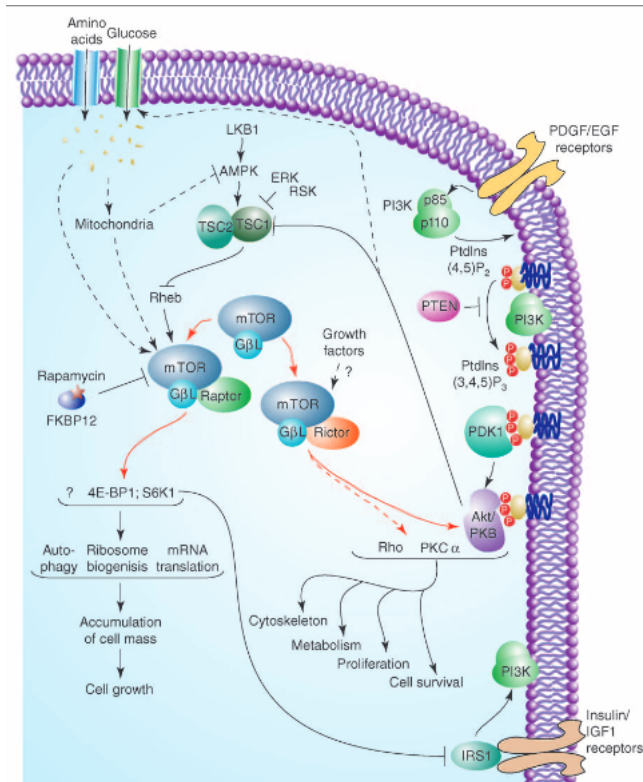


Figura 2.5: **Modelo de la cascada de señalización la vía mTOR** En el centro del esquema se encuentran esquematizados los dos complejos protéicos de mTOR asociado a proteínas Raptor, cuya regulación se da por FKBP12-rapamicina, y cuya activación está asociada a procesos como autofagia, biogénesis ribosomal y traducción de ARN mensajeros, que en conjunto regulan el crecimiento celular. El segundo complejo asociado a las proteínas Rictor activan la señalización de regulación y formación del citoesqueleto, metabolismo, proliferación y supervivencia. Ambos complejos se encuentran implicados en la activación de la vía de las cinasas P13K/Akt, que ayudan de igual manera al crecimiento celular y proliferación. Modificado de: [41]

malformaciones corticales; tal es el caso del estudio de [43], en donde se realizaron estudios genéticos de sangre y tejido cerebral de pacientes diagnosticados con Displasia Cortical Focal I, IIa y IIb. Lograron identificar lesiones específicas por mutaciones en la vía mTOR en el 46 % de las muestras de individuos analizadas, todas correspondientes a displasia del Tipo IIb, en donde encontraron una elevación de la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (marcador celular de la activación de la vía mTOR) en el tejido cerebral previamente evaluado y con positivos en mutaciones de la vía mTOR. Todos los individuos con alteraciones en esta vía, presentaban células globo en las muestras de tejido cerebral, de las cuales sugieren que es una consecuencia de esta hiperactividad de la vía mTOR, dada por mutaciones en su regulación. De forma paralela a esta evaluación [29]

evaluaron muestras de sangre y tejido cerebral de pacientes con displasia Tipo II en donde observaron en el 15.6 % de las muestras evaluadas, la existencia de mutaciones somáticas que inducían la hiperactividad cinasa de la vía mTOR, así mismo corroboraron que estas mutaciones inducían malformaciones y alteración funcional (crisis epilépticas) en modelo murino y efectivamente ambas alteraciones surgían.

A pesar de que estos hallazgos brindan un buen acercamiento al entendimiento del origen de estas lesiones, aún queda poco claro porqué estas mutaciones sólo se encuentran sólo una proporción de los pacientes, qué distingue o hace poco prevalente la explicación del origen de estas malformaciones mediante la vía mTOR y así mismo, qué las hace epileptogénicas.

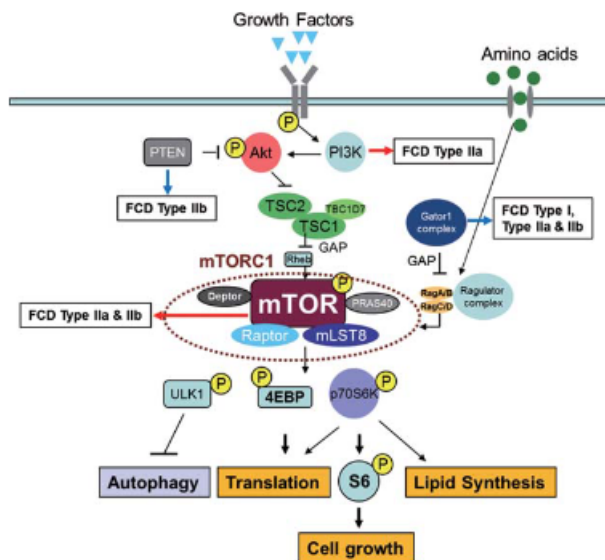


Figura 2.6: **Alteraciones en la vía mTOR que causan Displasias Corticales Focales**
Representación esquemática de la vía de señalización del complejo mTORC1 (mTOR + proteínas Raptor) En donde después de la estimulación de esta vía por factores de crecimiento (PI3K, Akt, TSC1/2 y Rheb) PTEN inactiva a Akt. Por otro lado, la vía de regulación del complejo Rag, se activa por la entrada de aminoácidos. Gator1 suprime la actividad de mTORC1 y a su vez su activación es capaz de fosforilar directamente a enzimas como 4EBP, p70S6K, y ULK1. Las displasias corticales focales son causadas por ganancia de funcionalidad por mutaciones en diferentes estados de esta señalización (marcadas con flechas rojas) o bien por mutaciones que disminuyen la función de la misma (marcadas con flechas azules). Modificado de: [43]

Capítulo 3

Modelos experimentales de las displasias corticales

En el capítulo 2 se describieron las características principales del origen y clasificación de las displasias corticales, todas ellas evaluadas en humanos, sin embargo aún quedan varias integrantes alrededor de estas malformaciones que obligan su simulación e investigación en otros modelos animales, como los roedores. Antes de describir algunos de los más usados y descritos para la descripción de las malformaciones en cuestión, considero necesario puntualizar su importancia y así mismo, sus limitaciones generales. De acuerdo con la revisión de Michael Wong [44], sobre el progreso de modelos animales para el estudio de displasias corticales focales y esclerosis tuberosa, la importancia de evaluar malformaciones corticales de esta índole mediante el uso de modelo animal se divide en dos, la primera es que a través de ellos podemos entender los mecanismos básicos de la patofisiología de las mismas, mediante evaluaciones experimentales más específicas que a la fecha son imposibles de implementar en humanos por cuestiones éticas; la segunda, es que también usando modelos animales es posible realizar pruebas preclínicas para estudiar la eficacia y seguridad de nuevos tratamientos. Dentro de las limitaciones que su uso podría tener, está el hecho de que hay características biológicas irreproducibles en los modelos animales, pero aún así algunos aspectos se comparten cuando hablamos de describir enfermedades, como procesos, bioquímicos, moleculares, genéticos y fisiológicos que describen a una patología. Para considerar a un modelo animal, un buen modelo es importante tener en cuenta las características fehacientes que constituyen a la patología humana en el caso de la epileptogénesis dada por displasias corticales focales, es posible enfocarnos en una de las dos vías, la simulación de la malformación cortical, o bien, la simulación de los mecanismos celulares que generar la epilepsia. Actualmente existen ambos modelos animales, los que simulan la malformación a nivel morfológico, y los que simulan ambas partes como se resume en la Tabla, algunos son mediante el uso de agentes físicos como al radiación *in utero* y la lesión por congelamiento, otros por agentes químicos como es uso de MAM y BCNU *in utero* o bien mediante la modificación genética y focalizada como lo hace la electroporación *in utero* como se resume en la tabla 3.

3.1. Modelos animales de Displasias corticales por agentes químicos

Existen diversos modelos de inducción por vía química como MAM (metilazoxymetanol), BCNU (1,3-Bis,2-chloroetil-1-nitrosurea) además de ambos

Modelo animal	Características de la patología	Epilepsia e hiperexcitabilidad
Radiación <i>in utero</i>	Laminación cortical anormal, Neuronas heterotípicas y dismórficas	<20 % de actividad epiléptica espontánea
MAM (metilazoxymetanol) <i>in utero</i>	Laminación cortical anormal, Neuronas heterotípicas	<20 % de actividad epiléptica espontánea
BCNU (carmustina) <i>in utero</i>	Laminación cortical anormal, Neuronas dismórficas	Hiperexcitabilidad <i>in vitro</i>
Ibotenato neonatal, focal	Laminación cortical anormal, neuronas heterotípicas	Hiperexcitabilidad <i>in vitro</i>
Lesión por congelamiento, prenatal	Laminación cortical anormal	Espigas interictales y susceptibilidad a kindling
Electroporación <i>in utero</i>	Laminación cortical anormal, Neuronas heterotípicas y dismórficas	Actividad espontánea y crisis generalizadas

Cuadro 3.1: Modelos animales descriptivos de las displasias corticales en roedores. Modificado de: [44]

inducir morfológicamente características similares a las displasias tipo II, tienen en común el que ambos sean agentes alquilantes del ADN, eso quiere decir que poseen la capacidad de interrumpir la correcta replicación del mismo, provocando mutaciones; no presentan alteración funcional como crisis espontáneas, pero sí hiperexcitabilidad *in vitro*, o al menos no a etapas tempranas del desarrollo [45]; el método de inducción que se usa en cada uno es muy similar también, ya que se inyecta vía intraperitoneal en roedores gestantes, principalmente ratas, a cierta etapa del gestación, en MAM pasando el día de gestación (>E17), y en BCNU en una etapa más temprana, al día (E13-15), véase Fig 1.2 [46], [47], [48], [49]. Dentro de sus diferencias están los efectos fenotípicos que se expresan en las camadas afectadas, por un lado MAM, ha sido ampliamente descrito por [46, 47], como un buen modelo que simula el desarreglo cortical que se puede esperar en los diferentes tipos de displasia, especialmente la Tipo II. Sin embargo los efectos de su alteración son limitados a nivel morfológico, excluyendo a la glia [47], ya que actúa principalmente sobre las células neuroepiteliales, provocando heterotopías, alteración en la laminación cortical y disminución neuronal, principalmente, estas características se han descrito tanto en corteza y en estructuras internas como el hipocampo [50]. Las características de BCNU se describen ampliamente en la siguientes secciones, así como sus ventajas y fortalezas a nivel de simulación de displasias, que la diferencia de MAM.

3.2. BCNU o carmustina (1,3-bis(2-cloroetil)nitrosurea)

BCNU o comúnmente conocido como carmustina forma parte de los fármacos antitumorales del tipo nitrosurea, característicos por su función alquilante en el ADN. Ha sido empleado desde finales de los años 70 's, en enfermedades como Hodgkin, tumores cerebrales y otros linfomas y mielomas. Una de las principales diferencias que lo destacan entre otras drogas citostáticas es que no tiene los efectos secundarios de las drogas que usualmente se ocupan en las quimioterapias, como vómitos y mielosupresión. Dentro de sus características químicas está su solubilidad en lípidos y bajo peso molecular, las cuales favorecen en la permeabilidad en órganos como el cerebro [51]. Los efectos secundarios que pueden presentarse son a nivel de ADN, ARN y síntesis de proteínas, ya que puede intervenir en la síntesis de purinas. Aunque las nitrosoureas son monofuncionales pueden llegar a causar cruce en los enlaces de las bases nitrogenadas del ADN, provocando diferentes efectos, como se muestra en la Fig.3.1. Este proceso puede ocurrir mediante dos pasos: 1) La cloroetilación de sitios nucleofílicos en una de las hebras del DNA y 2) el desplazamiento del ión Cl⁻ hacia la siguiente hebra, impidiendo el relajamiento de la doble hélice, lo cual puede provocar mutaciones o letalidad en la información que contiene ese fragmento [51].

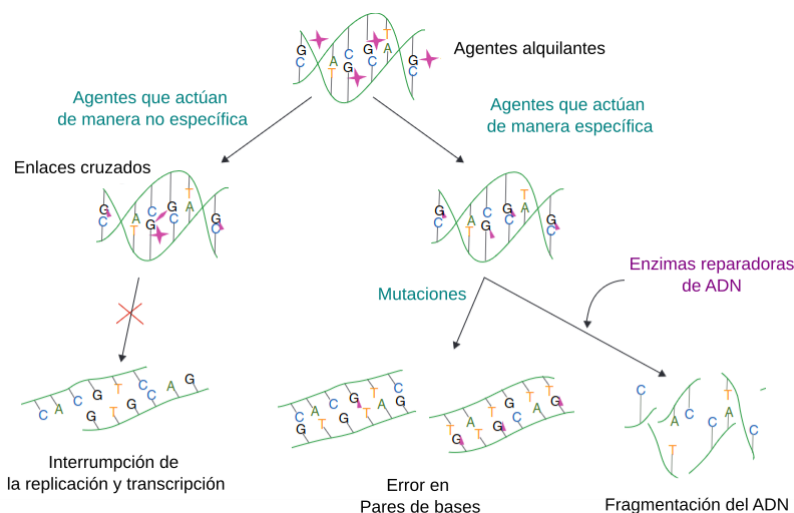


Figura 3.1: **Mecanismo de acción de agentes alquilantes** Los agentes alquilantes pueden actuar de manera específica sobre bases nitrogenadas específicas o no específica, provocando así diferentes efectos, como la interrupción de la replicación y transcripción del ADN, como también mutaciones o bien fragmentación del material genético. Modificado de: [52]

El tiempo de vida de estas drogas dentro del organismo es muy corto. Se ha descrito que sus efectos tienen dos fases, la primera ocurre a los 5 min de la inducción y la segunda después de 1 hora. La degradación de este fármaco se realiza en los riñones y sucede aproximadamente después de 24 hrs en especies pequeñas como roedores y en 72 hrs en humanos [53]. Dentro de los estudios

que han usado a las nitrosureas como principal insulto para simular a las displasias, están los del grupo de Moroni [49], quiénes han logrado describir morfológicamente más detalles sobre las displasias en roedores adultos y más recientemente también han contribuido a su caracterización de actividad eléctrica con un estímulo externo y en su ausencia pero en edades más adultas, como se describe en la siguiente sección [45, 48, 49, 54-56]

3.3. Modelo de displasias por BCNU

Benardete y Kriegstein en el 2002, fueron los primeros en aprovechar el mecanismo de acción de las nitrosureas en la simulación de malformaciones corticales como las displasias [48], en su modelo usan una dosis de 20 mg/kg, que inyectan vía intraperitoneal al día E15, es decir, durante el proceso de migración celular, en ratas gestantes. Los resultados que reportaron fue a nivel morfológico y funcional. Morfológicamente observaron una alteración en el arreglo laminar en dos etapas del desarrollo en P0 (día post-natal 0/ neonatos) y a P60 (adulto), cuando el cerebro ya estaba desarrollado, encontrando heterotopías en la corteza (grupos neuronales localizados de forma anormal en la corteza), así como alteraciones en la laminación cortical. También observaron alteraciones en las fibras de la glia radial, en ambas etapas, neonatos y adultos, pero por otro lado, ninguna diferencia en poblaciones de neuronas inhibitorias (parvalbúmina-PV y calbindina-CB) Fig.3.2.

Las características funcionales que describen son de índole electrofisiológico en cortezas de cerebro adulto ($\sim$ P60); usaron varias técnicas que les permitieron evaluar la actividad de célula normal y poblacional *in vitro*. Respecto a la actividad poblacional se enfocaron a la población de neuronas inhibitorias de cortezas adultas, evaluaron la actividad local de campo en actividad basal, observando grandes amplitudes en la actividad de cortezas con BCNU en comparación con las controles ante la estimulación externa de un bloqueador del receptor de $GABA_A$, observando incremento mayor, en la amplitud del potencial de campo de cortezas tratadas por BCNU comparadas con las controles, indicando susceptibilidad a tener actividad excitable. Por otro lado también evaluaron la alteración de la actividad eléctrica en célula única, específicamente de las interneuronas, en ambos casos, control y con BCNU ante estímulos con diferente concentración de GABA, encontrando que la corriente que mostraban las interneuronas alteradas por BCNU, eran más grandes y aumentaban conforme al incremento de concentración del estímulo, comparada con la que presentaban las interneuronas control. Sorprendentemente, las características eléctricas de interneuronas malformadas por BCNU no mostraron diferencias ante las controles. Todas estas evidencias y descripciones permitieron a los autores sugerir a este fármaco como un buen modelo de la lesión a nivel morfológico, ya que es capaz de simular la deslaminación cortical, heterotopías, células dismórficas, alteración glial y a sí mismo, ante estimulación externa, es capaz de mostrar características hiperexcitables. Siguiendo el trabajo de Bernadete y Kriegstein, el equipo de estudio de Moroni, F., continuó con la descripción de este modelo, en ratas [49, 54,

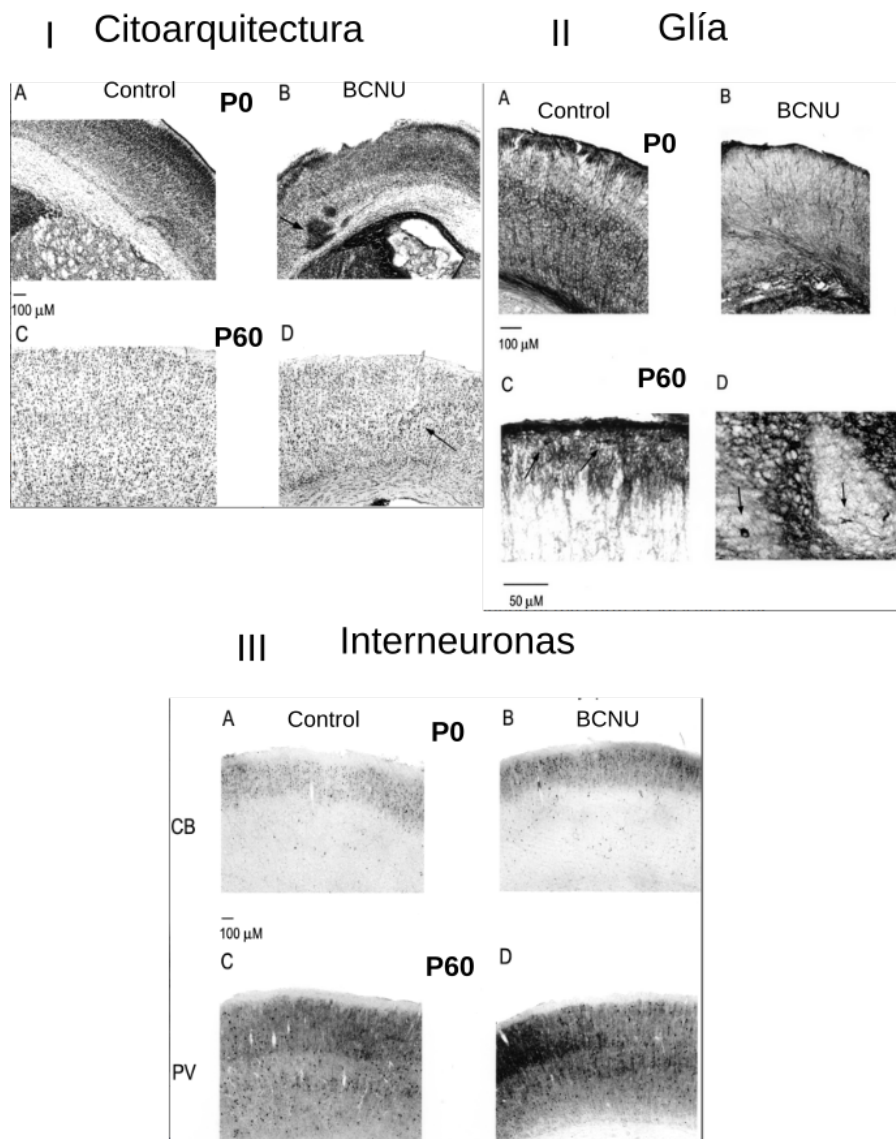


Figura 3.2: Evidencias histológicas de los efectos de BCNU en ratas neonatos y adultos En cada evaluación (I,II,III) se muestran ejemplos control (A,C) de neonatos y adultos, respectivamente y de BCNU (B,D). I. Muestra la citoarquitectura de una región cortical, usando tinción Nissl, en donde se observan grupos neuronales heteróticos en B y deslaminación en D. II. Evidencias de la malformación en fibras gliales en ambas etapas de desarrollo en BCNU (B,D). III. Dos tipos de poblaciones de interneuronas, CB(calbidina) y PV (palvarbulmina), en las dos etapas de desarrollo. Modificado de: [48]

55], no sólo corroborando sus resultados, si no incluso describiendo que bajo este modelo, la morfología que se logra simular, es muy similar a las alteraciones que se presentan en las displasias Tipo II e inclusive alteraciones en otras estructuras cerebrales, como el hipocampo Fig 3.3 [49]. Además de las confirmaciones de las alteraciones morfológicas del modelo, Moroni y colaboradores, en 2013 evaluaron la manera en la que se ve afectada la migración celular por BCNU, encontrando que efectivamente el efecto alquilante de este fármaco comenzaba a tener efecto desde el día de gestación 18, mostrando dentro de los resultados descritos, dos particulares, la mala migración neuronal a la zona superficial, presentando un retraso en la misma presentando así neuronas que deberían organizarse superficialmente, en la zona intermedia de la corteza, también encontraron que aquellas neuronas que alcanzaban llegar a la posición correcta después de su migración, no lograban prolongar sus axones a través del cuerpo calloso Fig 3.4.

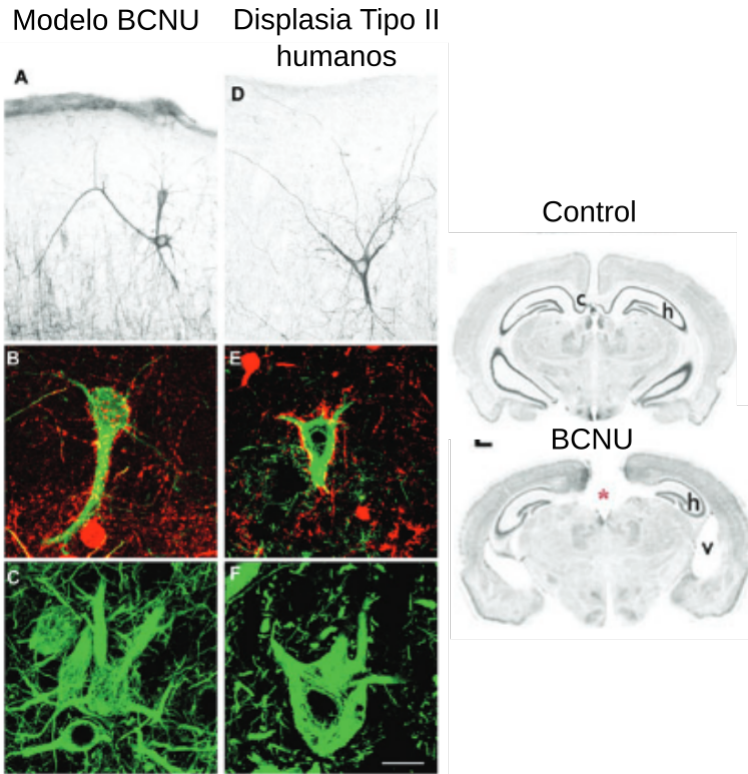


Figura 3.3: Características del modelo de displasia por BCNU Comparación morfológica de neuronas ectópicas y dismórficas piramidales, panel derecho; panel izquierdo, evidencia histológica de la lesión por displasia en otras estructuras como en el hipocampo .Modificado de: [49]

Otra de las características que lograron describir colaboradores de Moroni, fue el que el modelo de displasia por BCNU, no sólo tiene muchas ventajas

3. Modelos experimentales de las displasias corticales

en su simulación morfológica y susceptibilidad de actividad hiperexcitable *in vitro*, si no que a etapas más tardías del desarrollo, en días post-natales >90d, los animales sí pueden llegar a presentar actividad espontánea similar a las crisis epilépticas [45], esto mediante la implantación de electrodos y registro en movimiento libre de animales tratados por BCNU. Lo que sugiere que el modelo puede ser interesante en su evaluación longitudinal para seguir el deterioro que provoca esta malformación en el desarrollo.

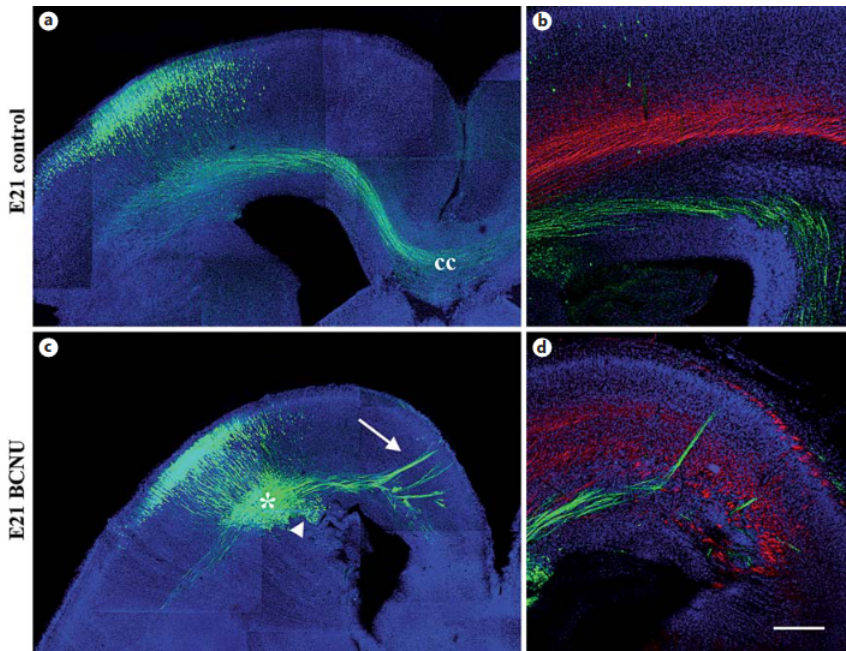


Figura 3.4: **Alteración en la prolongación axonal por el modelo BCNU** Neuronas progenitoras mapeadas con GFP, que lograron migrar correctamente a la región cortical correspondiente, en cortezas tratadas con BCNU muestran una limitación en su proyección axonal (evidenciado por la flecha blanca), comparado con la corteza control, cuyos axones sí logran llegar al cuerpo calloso, de manera normal (a,c), y un acercamiento de la misma región en (b,d). Modificado de: [57]

Capítulo 4

Epileptogénesis

A pesar de las amplias descripciones que se han llevado a cabo con ayuda del modelo BCNU, para el entendimiento de la malformación cortical de displasias, sigue siendo imperativo ahondar en la investigación del origen de la epilepsia en ellas, ya que como se describía en el Capítulo 2, las causas de esta hiperactividad son poco comprendidas e incluso especulativas. Para poder abordar las posibles causas en estas malformaciones es necesario describir al proceso de la epileptogénesis, que de manera general podemos entenderlo como el conjunto de mecanismos involucrados en el desarrollo de epilepsia. Algunos autores sugieren que en este proceso pueden interactuar diversos niveles de organización, desde el molecular, celular hasta el de conectividad provocando así la evocación de actividad hiperexcitable manifestándose en crisis epilépticas. La frecuencia de estas crisis comienzan a provocar otros daños en la estructura cerebral que favorece a este proceso para convertirse en una enfermedad crónica [58]. Cada uno de estos procesos dependen de una temporalidad que puede ser corta o larga, es decir pueden suceder en minutos o bien en semanas. Gracias a la contribución del estudio de este proceso a nivel experimental en modelos animales, se ha logrado describir que uno de los principales mecanismos implicados en él, es la alteración en la actividad de canales iónicos, cambios postranscripcionales de proteínas de señalización, como receptores de neurotransmisores y también activación de vías génicas, cada uno con una implicación temporal de minutos. Seguido por un periodo que puede durar horas o días, en el que se encuentran involucrados mecanismos como la alteración de factores de transcripción, muerte neuronal e inflamación celular. En la suma de los dos anteriores, la consecuencia crónica que fomentarán serían alteraciones anatómicas en la neurogénesis, gliosis, desarreglo de fibras y así mismo reorganización de la red de conectividad celular, los cuales se pueden observar semanas después del primer insulto epiléptico [58, 59].

4.1. Características clínicas y modelos experimentales

La epileptogénesis se suele documentar clínicamente como el proceso que causa epilepsia, y esta puede originarse por una diversidad de factores a lo largo del desarrollo. En adultos entre la más común es a causa de factores genéticos que pueden ocasionar epilepsia del lóbulo temporal TLE (Temporal Lobe Epilepsy), por una lesión cerebral traumática, TBI (Traumatic Brain Injury) [58, 59], o por una malformación cortical [17]. En la niñez, es más común que se genere epilepsia como consecuencia a otros factores como una encefalopatías, fiebres, hipoxia o la más frecuente por una malformación cortical [17]. Al tratarse de otra etapa del desarrollo en donde aún no se ha terminado de madurar el cerebro,

4. Epileptogénesis

el estudio de la epileptogénesis durante esta, resulta relevante por la variedad de mecanismos que pueden diferenciarse en comparación con el origen de epilepsia en adultos, cuando el cerebro ya es considerado maduro, o desarrollado, además de la alta prevalencia que tiene en la población infantil, como se mencionó en el Capítulo 2.

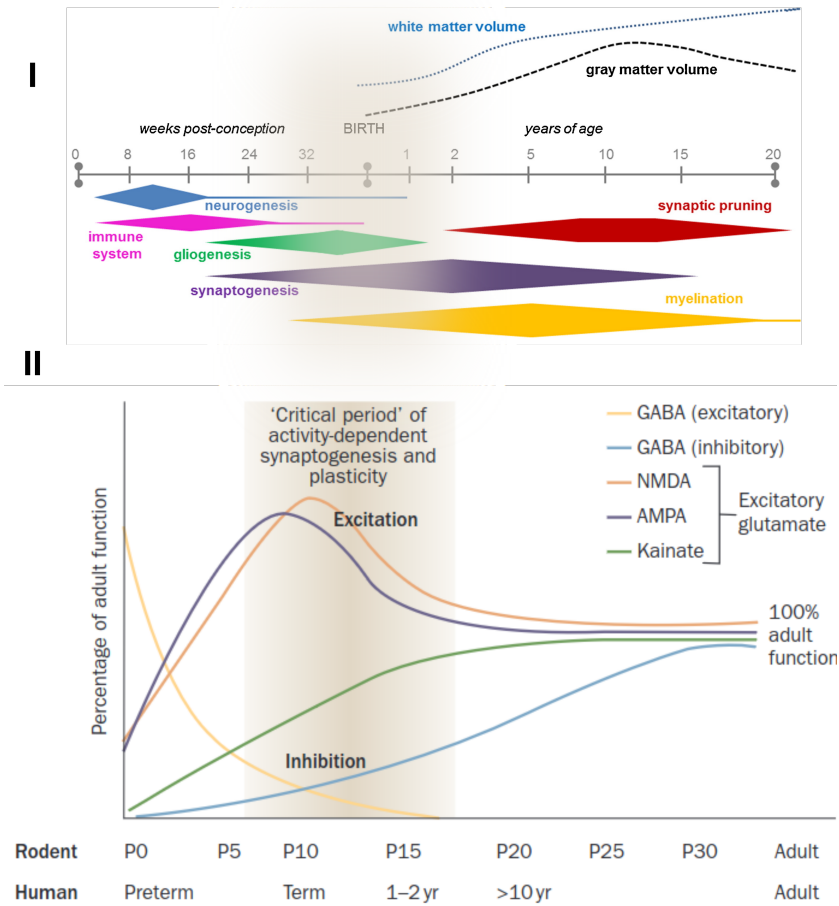


Figura 4.1: **Eventos del desarrollo cerebral durante la niñez** Principales eventos del desarrollo cerebral post-natal, en I, se muestran el desarrollo cortical en humanos, desde las semanas de gestación hasta la etapa adulta. arriba de la línea temporal se representa el aumento en volúmen de materia gris y blanca, y debajo, con colores se representan los distintos eventos del desarrollo, resaltando en la sombra morada el periodo crítico de actividad dependiente a la sinaptogénesis y plasticidad que muestra el esquema en II. II, Presenta la evolución temporal de los cambios en los receptores Glutamato y GABA, a lo largo del desarrollo en humanos y roedores, así como también de la presencia de los subtipos de receptores excitatorios. El eje y, en la gráfica muestra el porcentaje de la función en el cerebro maduro y en el eje x, las etapas del desarrollo en roedores y humanos. Modificado de: [12, 58]

Durante el desarrollo post-natal en humanos y roedores siguen ocurriendo procesos como sinaptogénesis, mielogénesis y optimización de la conectividad o (synaptic pruning) hasta aproximadamente la etapa adulta ~20 años en humanos, y P60 en roedores Fig.4.1. Estos eventos llevan consigo adaptaciones moleculares y de comunicación, como la producción de canales excitatorios y transportadores, así mismo como los inhibitorios, que alcanzan su máxima función hasta la etapa adulta.

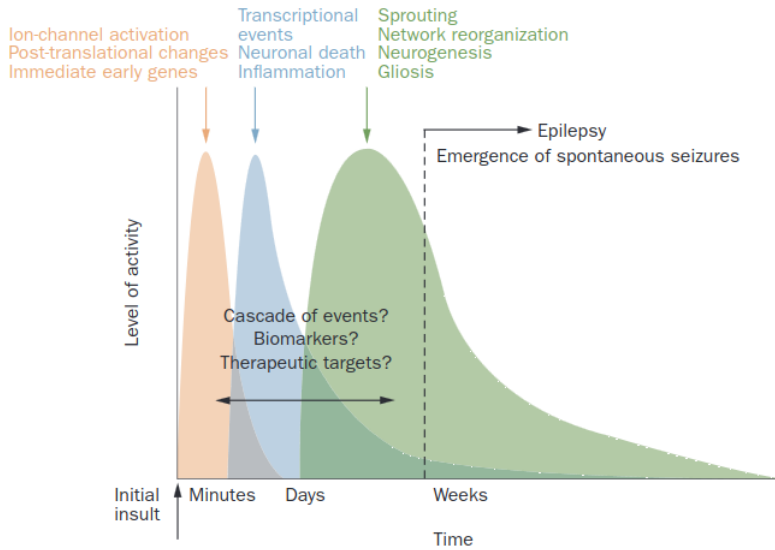


Figura 4.2: **Cascada epileptógena** Procesos involucrados y la sugerencia de escala temporal que pueden llegar a seguir después del primer insulto, en donde durante el periodo latente o anterior a la generación de crisis epilépticas, pueden ocurrir procesos a diferentes escalas y con distinta duración. Modificado de: [58]

Uno de los neurotransmisores más abundantes e importantes en comunicación celular es el Glutamato, por ser uno de los responsable de la excitación celular, cuyos receptores (GluRs) se expresan en neuronas y células gliales; existen también receptores ionotrópicos de glutamato, (iGluRs), que están regulados por un ión, ya sea Na, K o Ca. Los iGluRs más importantes son los receptores, NMDA, AMPA y cainato [58, 60]. Por otro lado el neurotransmisor que regula la inhibición de la actividad neuronal es el ácido γ -aminobutírico, o GABA, que a diferencia de glutamato, sus receptores se encuentra muy bajos durante el desarrollo, y también alcanzan su máxima función en la etapa adulta [58, 61]. El uso de modelos de epileptogénesis en etapas tempranas del desarrollo ha ayudado a contribuir al entendimiento de cómo podrían evolucionar esta alteración funcional cuando aún sigue en proceso de maduración la conectividad celular en el cerebro; dentro los más comunes está el uso de baja oxigenación, o hipoxia [62], o bien mediante farmacos que induzcan a la hiperexcitabilidad como la toxina tetánica [63], pilocarpina [64] o ácido cáinico [65]. A continuación

4. Epileptogénesis

se describirá los mecanismos involucrados en dos de los modelos más relevantes para el estudio del proyecto de investigación de esta tesis, cuyos métodos y resultados se describen en el Capítulo 6

4.1.1. Hiperexcitabilidad por Pilocarpina

El modelo de inducción de epilepsia crónica por pilocarpina ha sido ampliamente usado desde 1983. Descrito por primera vez por Turski, quién aprovechó las características químicas y farmacéuticas de este compuesto proveniente de *Pilocarpus jaborandi*, planta nativa del centro-este de Brasil, cuyos efectos sistémicos involucran al tratamiento de sequedad, ya que aumenta la lubricación en ojos y boca, por sus efectos en el sistema nervioso periférico activándolo gracias a sus propiedades agonistas colinérgicas [66]. En su trabajo, describe que la administración sistémica de este compuesto, es capaz de generar cambios en la actividad eléctrica que desembocan en la generación de crisis epilépticas espontáneas recurrente (CEER), cosencuentes de un estado epiléptico previo a ellas (SE, *Status Epilepticus*) [67, 68]. Este mismo modelo fue aportando más conocimiento en su función, logrando identificar que a nivel sistémico es muy importante considerar varios factores como el sexo, la dosis, la variabilidad y la mortalidad [69]. Un punto importante a resaltar de este método de inducción

Cambios observados	Duración
Inducción temprana de genes	Horas
Cambios post-transcripcionales de receptores de neurotransmisores (GABA, AMPAR, NMDAR)	Horas a Días
Muerte neuronal	Días
Factores neurotróficos	Días
Inflamación	Días
Expresión de receptores de neurotransmisores y canales iónicos	Días
Nuevos brotes de fibras neuronales	Días y semanas
Neurogénesis y gliosis	Semanas y Meses

Cuadro 4.1: Resumen de los procesos temporales que ocurren contribuyen al desarrollo de epilepsia en etapas tempranas del desarrollo. Modificado de: [58]

de excitabilidad, es que se ha explorado a diferentes escalas, la sistémica e *in vivo*, en donde la dosis de pilocarpina es suministrada vía intraperitoneal (i.p.), cuya repercusión principal es el desarrollo del SE, característico por simular crisis epilépticas espontáneas [70, 71]. También se ha empleado la estimulación de manera local e *in vitro* en rebanadas de tejido, principalmente en hipocampo,

en donde se han descrito también que puede provocar mayor frecuencia de potenciales de acción, así como aumento en la amplitud de la actividad eléctrica, esto siempre y cuando se emplee concentraciones adecuadas para alterar la actividad eléctrica neuronal [72].

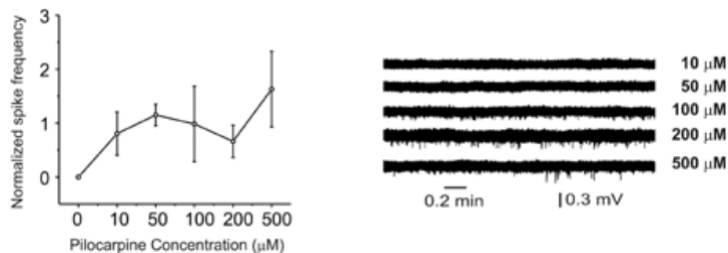


Figura 4.3: **Actividad hiperexcitable por pilocarpina *in vitro*** El panel derecho se muestra la curva dosis respuesta sobre la frecuencia de potenciales de acción debido a una estimulación de pilocarpina, en rebanadas de hipocampo, y en el lado izquierdo 5 ejemplos de las señales eléctricas bajo diferentes concentraciones de estímulo. Modificado de: [72]

Entender los mecanismos mediante los cuales la pilocarpina logra alterar la actividad eléctrica en el modelo animal, parte de los receptores metabotrópicos como los de glutamato, mGlu1, que se especializan en la potenciación de la excitación y mGlu4, que la contrarresta. La regulación de los receptores de glutamato, provoca que bajo las condiciones de pilocarpina se genere susceptibilidad a generar excitabilidad al tejido cerebral. Estos hallazgos han sido descritos, principalmente en el hipocampo [73]. Por otro lado otro de los receptores involucrados en su metabolismo, son los receptores muscarínicos M_1 que son metabotrópicos también, al igual que lo mGluR [74, 75]. Estos receptores se encuentran distribuidos principalmente en las neuronas excitatorias, por lo que su hiperactivación ante pilocarpina, puede generar repercusiones graves, como el incremento de actividad eléctrica y el inicio de otros procesos de la cascada epileptógena, los cuales se describen a en la siguiente sección.

4.2. Cascada epileptógena *mecanismos involucrados*

Comprender a los procesos de la epileptogénesis implica entender que involucran varias escalas espaciales y temporales, por ello opto por nombrarla como cascada epileptógena como lo hacen en su revisión [58]. Nuevamente los modelos experimentales han ayudado a la aproximación de los procesos temporales que desarrollan la epilepsia. Los más inmediatos ocurren en minutos, que pueden ser la actividad de canales iónicos y señalización celular, así como cambios post-transcripcionales como por ejemplo, en la síntesis de nuevos canales y receptores y activación de genes, también. Si estos cambios prevalecen, pueden llegar a repercutir en días, procesos inflamatorios, muerte neuronal, y así mismo cambios transcripcionales, que dan lugar a cambios crónicos en semanas o meses,

4. Epileptogénesis

como alteraciones en la neurogénesis, reorganización de la red y gliosis como lo muestra la Fig. 4.2 y la tabla 4.1.1

4.3. Estudio de epileptogénesis con actividad de calcio intracelular

Las cascadas moleculares que están implicadas en los primeros mecanismos de la epileptogénesis traen como consecuencia alteraciones en la actividad de canales iónicos. Siendo que las células nerviosas son excitables y dicha excitabilidad depende de la actividad de esos canales iónicos, es de importancia resaltar que una de las principales vías de señalización intracelular que se ve afectada es la del flujo del calcio, ya que es el responsable de activar a otras cascadas de señalización como el de las cinasas que fosforilan factores de transcripción como la proteína de unión a elementos de respuesta de cAMP (Adenosín Monofosfato Cíclico) (CREB) y la proteína de unión de CREB (CBP). Así como también el $[Ca^{2+}]$ está involucrado en la señalización neuronal metabotrópica, ya que es una de las vías importantes para la secreción de neurotransmisores y recepción de los mismos, de una célula a otra y también en regulación de activación e inhibición de sus propios canales [58, 76-78], Fig 4.4

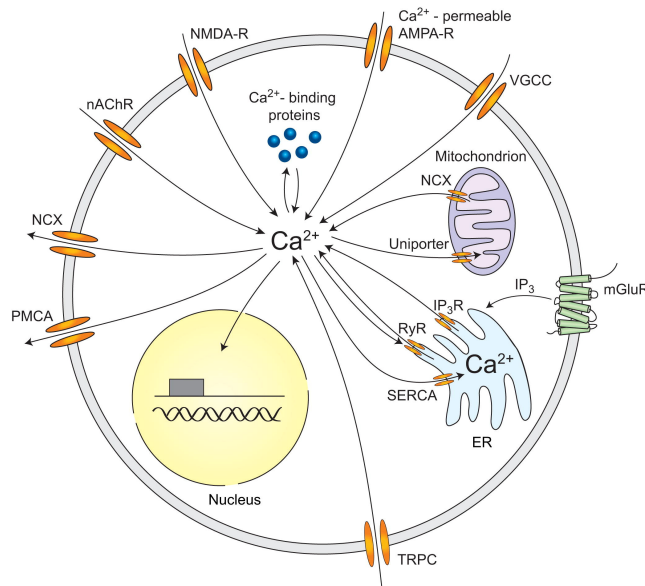


Figura 4.4: **Señalización de calcio intracelular** Flujo de calcio intracelular en neuronas por la activación de receptores transmembrana como AMPA, NMDA, voltaje dependientes VGCC, acetilcolina nAChR, o receptores tipo C TRPC. El flujo de calcio intracelular es regulado por receptores de inositol trifosfato IP₃R y rianodina. El inositol trifosfato puede ser regulado a su vez por receptores transmembrana como los mGluR. La salida de calcio es mediado por PMCA, proteína transmembranal, por los canales de sodio y calcio, NCX y por la ATPasa del retículo sarcoplásmico. Modificado de: [78]

Algunos estudios *ex vivo* en modelo animal, se observó la respuesta de calcio en cultivo celulares de la región del hipocampo del cerebro, observaron que durante la epileptogénesis se producían alteraciones permanentes en la homeostasis del Calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, manifestándose de diferentes formas, incrementando crónicamente los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ y disminuyendo la capacidad de las células para almacenarlo Fig 4.5, dejando aún más limitada la disponibilidad de éste dentro de las células. Sugiriendo que estos cambios crónicos propician a largo plazo un daño irremediable en la comunicación y homeostasis de las células, alterando por completo su señalización [77].

La importancia de este ión en la señalización neuronal en condiciones normales y en patológicas como durante el proceso de la epileptogénesis, no ayudaría a comprender la funcionalidad de celular desde otra perspectiva, cercana a la actividad eléctrica que es comúnmente preferida cuando se trata de describir procesos epileptogénicos y como se ha hecho ampliamente en la evaluación de modelos de malformaciones corticales como el de BCNU [45, 54, 56]. Además de poder describir otras características de la funcionalidad neuronal, mediante la medición de $[Ca^{2+}]_i$ se obtiene otra ventaja que es la noción del número de células que se están activando, ya que los fluoróforos sensiométricos que se emplean para la evaluación de la misma, se une a cada ión de $[Ca^{2+}]$ que se encuentre en la célula, permitiendo distinguir la actividad individual y poblacional en un registro. En el presente trabajo está enfocado a la descripción de la actividad hiperexcitable mediante el registro de $[Ca^{2+}]_i$, en cortezas normales y tratadas con el modelo BCNU en una etapa temprana del desarrollo; los detalles del mismo se describen en los próximos capítulos, así como los resultados y conclusiones que se obtuvieron en él. La perspectiva que se empleó al describir los resultados de la actividad de $[Ca^{2+}]_i$, fue la de conectividad celular, ya que como se describió en este capítulo, la epileptogénesis repercute en un cambio en la conectividad neuronal que al final de la cascada, genera las crisis epilépticas. Los detalles de cómo este aspecto se relaciona a la sincronía y consecuente hiperexcitabilidad se describen con más detalle en el Apéndice A, los cuales recomiendo revisar para la mejor comprensión de los resultados de este trabajo.

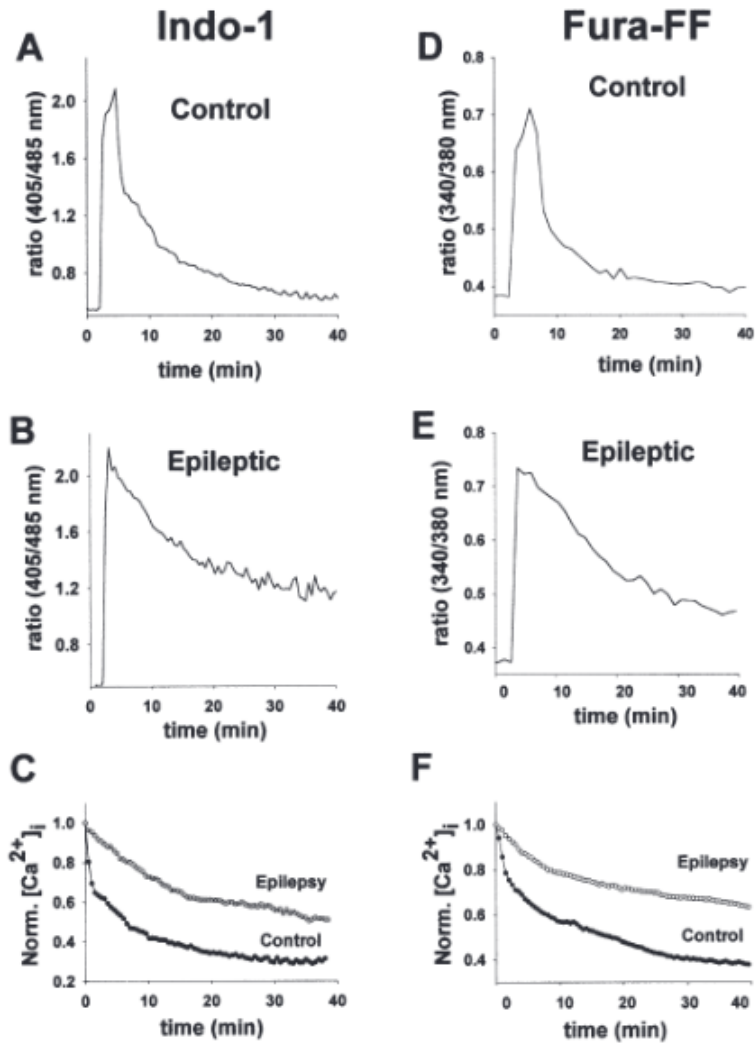


Figura 4.5: Actividad de calcio intracelular en células individuales. Actividad de calcio intracelular de celular hipocampales control y epilépticas, usando dos distintos fluoróforos sensiométricos de calcio, ante el estímulo de Glutamato $50 \mu\text{M}$. Con ambos fluoróforos se observa que en la células epilépticas hay un retraso en el decaimiento de la señal, además de una fluctuación de la actividad durante la misma (B,E), características que no se observan en las células control (A,D). C y F, muestra este retraso en el decaimiento de la señal en ambas actividades. Modificado de: [77]

Parte II

Segunda parte, *Marco teórico*

Capítulo 5

Marco Teórico

5.1. Antecedentes

Las displasias corticales son un tipo de malformaciones que ocurren durante el desarrollo embrionario. Son consideradas como una de las principales causas de epilepsia refractaria en la población infantil y la segunda o tercera de la epilepsia resistente a fármacos en adultos [79]. Estas lesiones se caracterizan por una desorganización en la estructura de la corteza cerebral, en donde se pierde la definición de las capas corticales al igual que de la barrera entre la materia gris y blanca, consecuencia de la hipomielinización de la materia blanca además de una serie de malformaciones celulares como neuronas piramidales con hipertrofia, neuronas dismórficas, microglia activada, gliosis excesiva y células balonadas [30]. Gracias a los estudios morfológicos por histología se han descrito 3 tipos de displasias corticales, de acuerdo al grado de malformación que presentan. Sin embargo, la variabilidad en su morfología y extensión complica su detección incluso con técnicas de neuroimagen de alta resolución, lo que dificulta o imposibilita el tratamiento quirúrgico [33]. Considerando que cerca del 27 % de niños con displasia cortical tipo II, desarrolla epilepsia y deficiencia cognitiva como consecuencia de la lesión [58] y que existen casos además, en donde estas lesiones no tienen ninguna repercusión neuropatológica a lo largo de la vida de los individuos, diversos han sido los estudios que han descrito estructuralmente a estas lesiones con la finalidad de conocer el origen de la epileptogénesis [20, 30, 80]. Sin embargo, partiendo de la definición de epileptogénesis como el resultado de micro-procesos en donde están involucrados canales iónicos y factores de transmisión que resultan en el cambio de la estructura de la red neuronal y por lo tanto en el desarrollo de Crisis Epilépticas Espontáneas Recurrentes (CEER) [58], se ha considerado necesaria la caracterización funcional a partir de la estructura de las células y de su interacción en la red neuronal. Debido a que los estudios de la actividad funcional en humanos son limitados y aún más cuando se trata de neuropatologías, se han logrado simular estas lesiones en modelos animales mediante diferentes métodos [49]. En este proyecto se usa como modelo de esta lesión el efecto de agentes antineoplásicos como BCNU (carmustina), que interfiere en la replicación del material genético teniendo un efecto mutagénico [81] y que se ha descrito como uno de los mejores agentes en la simulación de displasias corticales por su parecido en las morfologías neuronales con displasias tipo II [49]. No obstante, este fármaco sólo simula la lesión de las displasias estructuralmente, por lo que es necesario en este modelo, emplear un estímulo externo que altere la actividad neuronal para lograr caracterizar funcionalmente esta lesión. Para ello se ha acoplado la inducción del Status Epilepticus (SE) siguiendo el modelo de pilocarpina [68, 82]. Teniendo como finalidad resolver las

siguientes preguntas de investigación ¿Cuáles son las características estructurales y funcionales de las displasias corticales inducidas por BCNU que las hacen epileptogénicas? ¿Qué características se presentan en la red neuronal de cortezas con la lesión de displasia? ¿Cuáles son los cambios estructurales y funcionales en la red neuronal de las cortezas sanas y lesionadas y cómo responden ante un factor externo?

5.2. Problema y justificación

Las displasias corticales son malformaciones congénitas que años después del nacimiento pueden desarrollar epilepsia y se desconocen aún las causas de la epileptogénesis en estos casos, dificultando así su prevención, diagnóstico y tratamiento. La comprensión del proceso epileptogénico, podría favorecer el desarrollo de biomarcadores y/o tratamientos anti-epileptógenos.

5.3. Hipótesis

La citoarquitectura de la corteza primaria motora, en presencia de displasia, determinará una red funcional cortical aberrante y susceptible en la generación de actividad neuronal anormal ante un factor excitatorio externo.

5.4. Objetivo General

Caracterizar las displasias corticales inducidas por el modelo BCNU a nivel estructural y funcional antes y después de un estímulo hiperexcitable externo en una etapa juvenil del desarrollo.

5.5. Objetivos Particulares

- Identificar los cambios estructurales que se presentan en las displasias corticales.
- Analizar longitudinalmente las características macro- y micro-estructurales de la corteza durante el desarrollo de la displasia cortical.
- Evaluar el efecto de la displasia cortical a nivel fisiológico, analizando la actividad de calcio intracelular antes y después de un estímulo externo.

Capítulo 6

Métodos y resultados

6.1. Inducción del modelo de displasia por BCNU

El protocolo experimental (111A) realizado y descrito a continuación fue revisado y aprobado por el comité de ética del Instituto de Neurobiología, UNAM, en el cual se describe el uso de ratas hembra de 2 meses de edad (Sprague Dawley) que fueron inyectadas vía intraperitoneal al día 15 de gestación (E15), con 2 mL de solución salina, para el grupo control y 20 mg/kg de BCNU + 5 % de glucosa, para el grupo lesionado. Las camadas resultantes de cada grupo se alojaron en bioterio con agua y alimento *ad libitum* y el ciclo de luz y oscuridad regulado, de acuerdo a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999.

6.2. Caracterización macro y micro-estructural

Se realizaron imágenes estructurales pesadas a T2, de machos $n = 10$, de las camadas de los grupos Control y Tratamiento (BCNU) a los 30 días post natales. En cada adquisición los animales fueron anestesiados con Isoflurano al 4 % manteniendo la oxigenación de cada uno en una proporción 80/20 % aire/O₂ y su temperatura corporal en 37°C y la oxigenación y frecuencia cardiaca fueron monitoreados con ayuda de un sensor de pulso y oxigenación (Pulse oximeter sensor, SA Instruments Inc). La adquisición de las imágenes anatómicas se realizó en el LANIREM, empleando el Resonador BRUKER, 7T, siguiendo la siguiente secuencia: TR= 200 ms; TE=35ms grosor de rebanada de 80 μm ; resolución de 67 μm . Grupos ($n=10$) de ratas por cada ventana temporal posterior a la inicial, P30, fueron evaluados longitudinalmente mediante el mismo método de IRM 7,14,21 días posteriores a la primera resonancia.

6.2.1. Medición del grosor cortical

Las imágenes estructurales de resonancia fueron normalizadas basándonos en un registro lineal al atlas de roedores (Waxholm Space Atlas of Sprague Dawley Rat Brain) [83]. A partir de las imágenes preprocesadas, se midió el grosor cortical de la corteza motora con ayuda del software FIJI imageJ [84], mediante el cual se trazó una línea vertical en la región de interés (M1, Br = 0.20 mm, In = 9.20 mm) con 90° al cíngulo. Los valores resultantes de esta medición fueron normalizados a la escala de transformación de cada cerebro analizado, producida durante el registro lineal.

6.3. Inmunofluorescencia con marcaje específico a capas IV,VI y NeuN (neuronas)

Se perfundieron vía intracardiaca con PFA 4 % una n=3 de machos en P30, de ambos grupos, de los cuales posteriormente fue extraído el cerebro. Cada uno de estos se mantuvo en PFA 4 % durante una noche. Posteriormente se cambiaron a una solución de sacarosa al 20 % hasta que cada cerebro se precipitara; se continuó con el cambio de solución a sacarosa al 30 % esperando su precipitación, de igual manera, para lograr la crioprotección del tejido. La congelación de cada cerebro se realizó de la siguiente manera; En un vaso de precipitados de 500 mL se hizo una mezcla de nitrógeno líquido (100 mL) y de etanol puro (50 mL) hasta lograr formar una pasta suave, la cuál ayudaría a congelar de manera inmediata los cerebros; sobre dicha mezcla se colocó un vaso de precipitados de 100 mL, dentro del cual se colocó uno a uno, los cerebros, hasta que logaran el congelamiento total y fueron almacenados a -20°C. De cada muestra se realizaron cortes coronales de 20 μ m en una región cercana a la posición Bregma (9.20-0.20 mm); cada corte fue preservado en PBS 1x hasta el momento del ensayo de inmunofluorescencia. Los anticuerpos que se utilizaron fueron específicos a dos capas corticales (IV: NBP1-84004-Necab1, V: FoxP2, Novus Biologicals) y a neuronas (ab104224-NeuN, Abcam). Se realizaron dobles o triples marcas en cada rebanada del ensayo de acuerdo al siguiente procedimiento; se realizaron lavados de 5 x 10 min de (PBS 1x + Tween 20 [0.3 %]), posteriormente se incubó durante 45 min en solución de bloqueo (BSA 2 % + Triton x 100 0.3 %) a 4°C en agitación. Transcurrido este tiempo se incubó con el anticuerpo primario, hechos en conejo (NBP1-86671- FoxP2 1:2000, Necab1 1:1500, Novus Biologicals) y ratón NeuN (1:350, Abcam) 24 hrs, a 4°C en agitación. Se realizaron lavados 5x10min con (PBS 1x + Tween 20 [0.3 %]) y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente a cada primario, utilizado con las siguientes longitudes de emisión (Alexa -488, 555, 647, 1:500). Se realizaron lavados 5x10 min (PBS 1x) y finalmente se realizó el montaje de cada muestra utilizando el medio Mowiol y sellando los bordes de cada laminilla. La adquisición de imagen de cada ensayo se realizó escaneando la región de interés a 40x en tres direcciones, x,y,z, o bien a lo largo, ancho y en la profundidad de la región de interés (850 x 1700 x 10 μ m) , mediante microscopía confocal, empleando el equipo ZEISS LSM 780 DUO, de la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología.

6.3.1. Segmentación de las regiones de interés en la imágenes de inmunofluorescencia de anti-NeuN

Cada imagen adquirida se orientó de acuerdo a la posición anatómica de una vista coronal de la región estudiada y se homogeneizó el tamaño de cada adquisición a una columna de 1600-600 píxeles, cada una. Se realizó la cuantificación de las neuronas, usando el software Image J (FIJI)[84] manualmente, dibujando cada neurona, para cada grupo. Posteriormente se calcularon las coordenadas, área y forma (redondez) de cada ROI dibujado

manualmente con el mismo software y se analizaron estadísticamente con una prueba t de student, con Python Scipy [85].

6.4. Evaluación de la actividad neuronal individual y por conectividad. Registros de $[Ca^{2+}]_i$

En una $n=5$ CTRL y $n=8$ BCNU de 30 días postnatales, por cada grupo, se realizaron registros de imagenología de calcio, con el siguiente procedimiento: En una cámara de registro se colocó una capa de Poli-L-lysina 30 % y se dejó secar durante 2 hrs. Se sacrificó cada rata de ambos grupos con Pentobarbital (30 mg/kg). Posteriormente se disecó el cerebro y se colocaron inmediatamente en ACSF 1X al punto de congelación (4°C); en seguida se colocaron sobre la base de la platina de corte del vibratomo y se realizaron rebanadas coronales de $250\ \mu\text{m}$ de grosor, a la altura de la corteza M1 medial. Dicha rebanada se permeabilizó con un fluoróforo sensométrico de Ca^{2+} Fluo 4AM [$22\ \mu\text{M}$], durante 60 min., a 37° , humidificado 95 % O_2 , 5 % CO_2 . Transcurrido ese tiempo, se colocó la rebanada en la cámara de registro previamente tratada y se conectó a un sistema de perfusión, el cual contenía las tres soluciones que se suministraron a lo largo del registro (ACSF 1X + Carbógeno, Pilocarpina $300\ \mu\text{M}$, KCl $140\ \mu\text{M}$). Se registró la actividad de $[Ca^{2+}]_i$ con ayuda de un microscopio estereoscópico (Leica M205 FCA) de fluorescencia acoplado a una cámara CCD. La adquisición del total de imágenes se realizó cada 300 ms con la siguiente cronología: 1) 3 min de actividad Basal (actividad espontánea) sólo con ACSF 1X + Carbógeno. 2) 10 segundos de actividad Basal, seguidos de 30 segundos de Pilocarpina $300\ \mu\text{M}$, y 14 min de actividad basal. 3) 10 minutos de descanso, sin estimulación de luz y con perfusión constante de ACSF 1x + Carbógeno. 4) 10 segundos de actividad Basal, seguidos de 30 segundos de KCl $140\ \text{mM}$ y 14 min de actividad basal.

6.4.1. Análisis de las transitorias de Ca^{2+}

Por cada registro realizado se seleccionaron las regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés), manualmente con ayuda del software Image J-FIJI [84]; se extrajeron los promedios de cada valor de fluorescencia en cada cuadro capturado (Total = 3000). Posteriormente se normalizaron los valores de fluorescencia al mínimo de cada célula $\Delta F/F_{min}$ y se corrigió el decaimiento de la señal a consecuencia del fotoblanqueo. También se le aplicó un filtro Bessel del tipo pasa bajas, de tercer orden. Finalmente, se continuó con los siguientes procedimientos, todo esto con ayuda de la paquetería de Scipy [85]. La ejemplificación de la región cortical registrada así como la oscilación obtenida, se muestra en la Fig. 6.1

6.4.2. Evaluación de la oscilación por frecuencias y potencias

Identificamos la frecuencia y la potencia en cada caso, en la actividad basal y después del estímulo de pilocarpina por el método de Welch implementado en

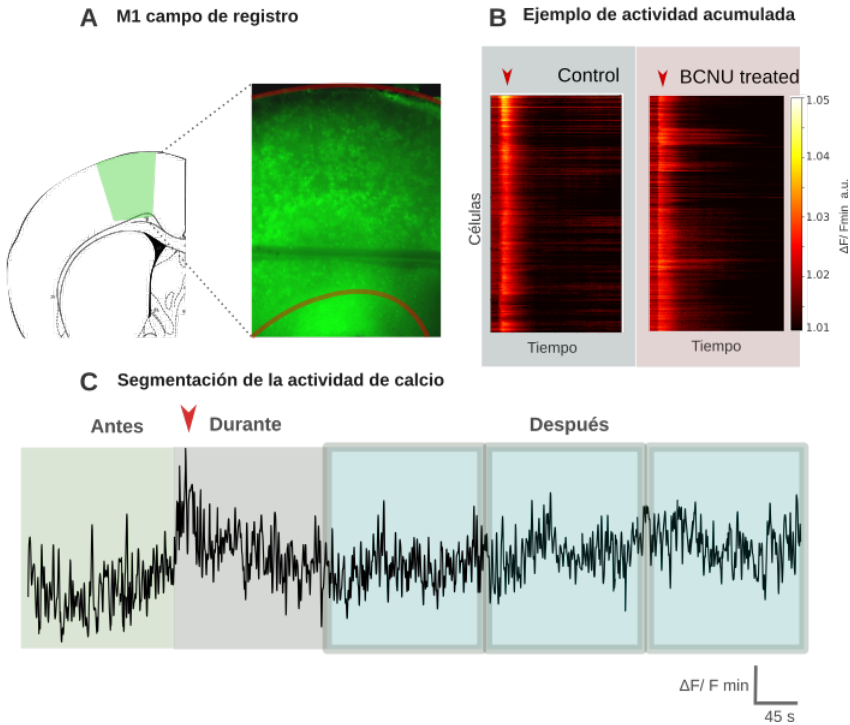


Figura 6.1: **Registro de actividad neuronal** A: Ejemplo del gran campo de visión para el registro de la señal $[Ca^{2+}]_i$ (que abarca todas las capas corticales), superpuesto en el atlas de Paxinos y Watson (2006) como referencia. Las líneas rojas representan el límite pial (arriba) y la interfaz gris-materia blanca (abajo) B: Actividad de la población de un animal de control y otro experimental, con cada fila indicando la amplitud de la señal codificada por colores de cada neurona ($\Delta F/F_{min}$) a lo largo del tiempo. Las puntas de flecha indican el estímulo de pilocarpina. C Vista ampliada de un ejemplo de señal de $[Ca^{2+}]_i$ para un animal de control que indica las ventanas temporales seleccionadas antes, durante y después de la estimulación con pilocarpina (punta de flecha) consideradas para los análisis de red.

Pauli V. et al., 2020. Comparamos la distribución de valores de cada grupo por la probabilidad de ocurrencia de cada uno en cada posición celular, evaluada con su profundidad en la corteza. Para la normalización de la profundidad, consideramos la fracción de coordenadas reales de la longitud total de cada corteza obteniendo valores de 0 a 1, donde 0 está cerca del cíngulo en la sustancia blanca, y 1 en la superficie cortical, adyacente a la pía).

6.4.3. Selección de señales representativas para el análisis de conectividad

De los valores de potencia durante el estímulo de 30 seg. De Pilocarpina $[300 \mu M]$, se realizó una distribución en cada registro y de esta se seleccionaron

aquellos que estuvieran a 2 S.D. debajo del valor máximo. Eliminando así las señales que tuvieran poca respuesta a la actividad durante el estímulo.

6.4.4. Conectividad celular y evaluación en ventanas temporales

La inferencia de conectividad celular se realizó siguiendo el principio de correlación cruzada entre células. Para verificar que las posibles correlaciones fueran no azarosas, se construyó por cada registro un nuevo set de datos de series temporales simuladas 1000 veces, la cuales también fueron correlacionadas y estos valores sustitutos de correlación facilitaron la creación de una distribución de valores por célula para seleccionar aquellas correlaciones no azarosas en cada registro (>2 S.D.). Dado el gran número de correlaciones realizadas, se minimizaron las correlaciones espurias mediante el método False Discovery Rate. Para lograr evaluar este método en diferentes ventanas temporales, se determinó en cada correlación, 5 ventanas de 150 s cada una (Antes 0-150s, durante(150-300s), después (300-450s, 450-600s, 600-750s)), basada en la cronología de la adquisición del registro y para lograr observar el antes, durante y después del estímulo hiperexcitable a nivel de conectividad. A partir de estas matrices de adyacencia dependientes del tiempo derivamos métricas de red: eficiencia de la comunicación, coeficiente de conglomerados y valores de asortatividad, utilizando NetworkX [86], y R versión 4.2.2 [87]. Se utilizaron efectos lineales mixtos, implementados en lme4 [88], para evaluar la relación entre las métricas de red, el grupo experimental y el tiempo. El grupo y el tiempo se introdujeron en el modelo como efectos fijos, mientras que los sujetos se introdujeron como efectos aleatorios. La significación estadística se evaluó con valores p obtenidos mediante pruebas de cociente de verosimilitud del modelo completo con el efecto en cuestión frente al modelo sin el efecto en cuestión.

6.4.5. Reducción de dimensiones para la evaluación de interacciones dentro de la corteza

De las matrices de correlación obtenidas previamente, se localizaron espacialmente a cada una de las neuronas involucradas en la conectividad y se ordenó la matriz de adyacencia con la posición de cada una y con la cantidad de conexiones que presentaron. Así logramos obtener la totalidad de la conectividad por posición. Cada valor fue normalizado por grupo y posteriormente comparamos estadísticamente, primero usando prueba t de student, y eliminando falsos positivos, con permutaciones. De las interacciones que sobrevivieron a estos análisis se les calculó el tamaño del efecto, calculando la medida d de Cohen [89] en cada ventana temporal analizada.

6.5. Resultados

6.5.1. Caracterización de la macro y microestructura

La caracterización de macroestructura se realizó en diferentes etapas del desarrollo de ratas Sprague Dawley, iniciando en el día postnatal 30 (P30) y dando seguimiento 7, 14 y 21 días posteriores, en una $n=10$ (7 machos, 3 hembras, de 3 camadas diferentes), en ambos grupos de estudio. En cada etapa mencionada, se adquirieron imágenes pesadas a T2, por el resonador Bruker 7T, del Laboratorio Nacional de Resonancia Magnética (LANIREM), mediante las cuales se midió el grosor cortical de sólo una región de la corteza M1, como ejemplifica el esquema de la Fig 6.2, panel Der; se trazó una línea de 90°C, que inicia en el pico del cíngulo, en la región medial de la M1 y termina en el límite pial. Los resultados de esta medición partieron de la premisa de que bajo este modelo de lesión, las cortezas en los animales tratados con BCNU tendían a mostrar cualitativamente una reducción en su grosor cortical [56] sobre todo en una etapa adulta del desarrollo. En este caso se recurrió a extender esta medición a etapas más tempranas, encontrando que el grosor no es diferente entre grupos, al inicio de la evaluación (P30). Sin embargo, conforme va avanzando el desarrollo, comienzan a ser distintas, teniendo mayor grosor las cortezas control, desde los 7 días posteriores al inicio.

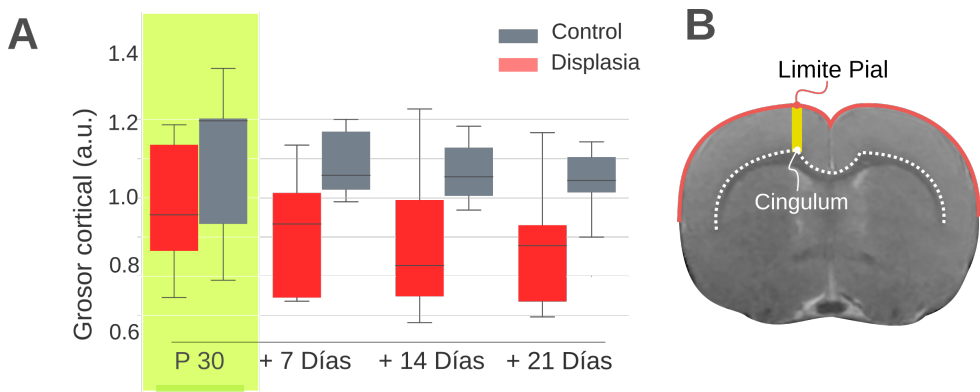


Figura 6.2: Características macroestructurales de cerebros P30, Controles y BCNU. A. Espesor cortical de M1 a lo largo del desarrollo. El grosor cortical (longitud entre la interfaz materia gris/blanca y el límite pial) se reduce en los animales experimentales a los 7, 14 y 21 días después de la exploración inicial (*: $p < 0,05$). B. Esquema de la zona de interés que fue medida. La región resaltada en verde, representa la etapa de desarrollo que fue descrita en toda nuestra metodología.

Para corroborar que durante p30 los animales de interés mostraban anomalías en la corteza cerebral, recurrimos a evaluar la micro-estructura, mediante un marcador específico a neuronas (anti-Neun), con el cual se analizaron diferentes aspectos del arreglo neuronal en esta región, como la densidad poblacional a lo largo de la corteza con el fin de identificar alteraciones en

esta distribución al comparar con las cortezas lesionadas, como muestra el panel de la Fig 6.3A; en este aspecto no encontramos diferencias entre distribuciones neuronales, pero observamos que la morfología neuronal presentaba tamaños y formas diferenciadas, específicamente en la posición de una corteza control, correspondiente a la capa II-III y a la V, Fig 6.3B. Estas observaciones fueron confirmadas en un análisis de medición de área y forma neuronal, comparando estas características entre grupos específicamente a las profundidades que corresponden a las capas II-III y V Fig 6.4. Los resultados demuestran que a estas profundidades las neuronas se encuentran más grandes en las cortezas displásicas que en las control. Mientras que la forma sólo se encontró distinta en las profundidades correspondientes a la capa II-III, siendo más redondas en las cortezas displásicas. Estas características confirman desde una perspectiva morfológica y cuantitativa la alteración neuronal en etapas tempranas del desarrollo, bajo la lesión de BCNU. Aún sin tener una macroestructura visiblemente alterada.

6.5.2. Evaluación de la laminación cortical mediante marcadores específicos

Anteriores estudios sobre la descripción de displasias corticales en modelo de roedor han mencionado alteraciones en la distribución de neuronas específicas a capas corticales, mediante hibridación in situ de mRNAs específicos a capas, en donde encontraron que en algunos casos en edades (p40-50), la expresión de estos mRNAs se veía disminuida o bien presente ectópicamente, representando así la presencia de heterotopias bajo la lesión por BCNU [54]. De acuerdo con Hevner, R.F [90], la expresión específica a capas corticales se mantiene a pesar de la alteración congénita que involucra el desarrollo de displasias, en este caso la alteración que estas provocan se refleja en la migración principalmente, así que con esto como evidencia podríamos usar a los marcadores específicos a capa como evidencia de una malformación cortical, como lo son las displasias corticales. En este caso usamos dos marcadores específicos, *Necab1* - capa IV y *FoxP2* - capa VI. En animales control y displásicos bajo el modelo BCNU a P30.

En controles la marca *Necab1* se observa homogénea y delimitada a la región que le corresponde Fig 6.5 Izq. En las cortezas displásicas podemos observar que la limitación de esta marca es menos específica, además de que podemos observar un aumento de la señal *Necab1* en las capas II-III. Por otro lado *FoxP2* marca específicamente neuronas de la capa VI, como se observa en el ejemplo control del panel B en la Fig 6.5, mientras que en displasias, las neuronas que expresan *FoxP2* se encuentran dispersas y poco delimitadas a la capa VI así como también, existen casos en donde observamos cúmulos ectópicos, cómo señala la flecha blanca en la (Fig 6.5 Der.)

6.5.3. Activación glial en modelo de BCNU

Otra de las características observadas a nivel micro-estructural y que van acorde a las observadas en las displasias tipo II, es la activación glial. En este

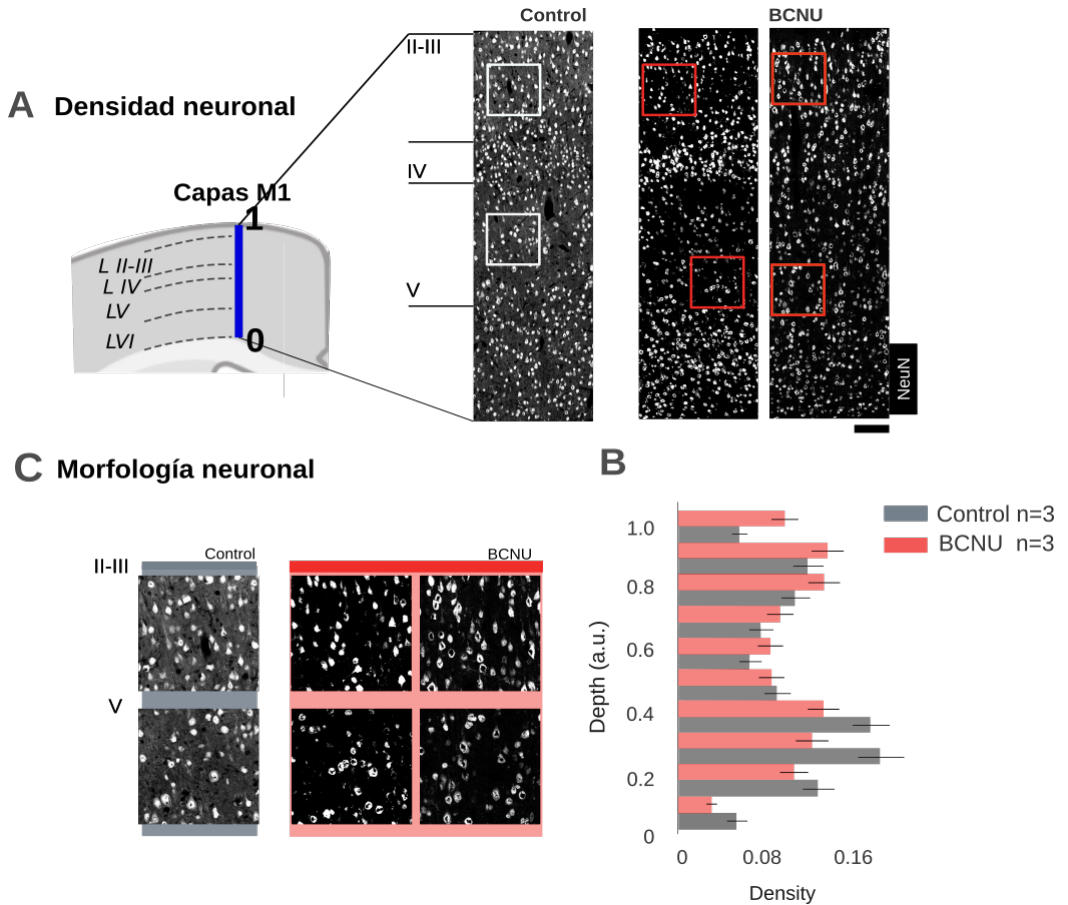


Figura 6.3: Características microestructurales de cerebros P30, Controles y BCNU
 A,B. Densidad neuronal a lo largo de la corteza M1. La profundidad cortical fue normalizada (0: porción más profunda a 1: límite pial), mostrada como una línea azul, con líneas discontinuas que muestran las posiciones aproximadas de las capas. La marca NeuN se utilizó para estimar manualmente la densidad neuronal. El panel derecho muestra un control y dos animales experimentales (barra de escala: 200 μm .), con histogramas de resumen mostrados en la parte inferior izquierda. Los cuadrados de color son los ampliados (250 μm .) en C.

caso usamos el marcador específico a Proteína Glial Fibrilal, GFAP, en la misma región de interés descrita en 6.3 y 6.4, y observamos que en al menos dos regiones de la corteza existían cambios cualitativos como se muestra en la Fig 6.6

6.5.4. Descripción de la oscilación de calcio en actividad basal y posterior a un estímulo externo

Algunos trabajos exploratorios sobre displasias cortical en humanos, han descrito que no necesariamente la actividad eléctrica aberrante, es decir

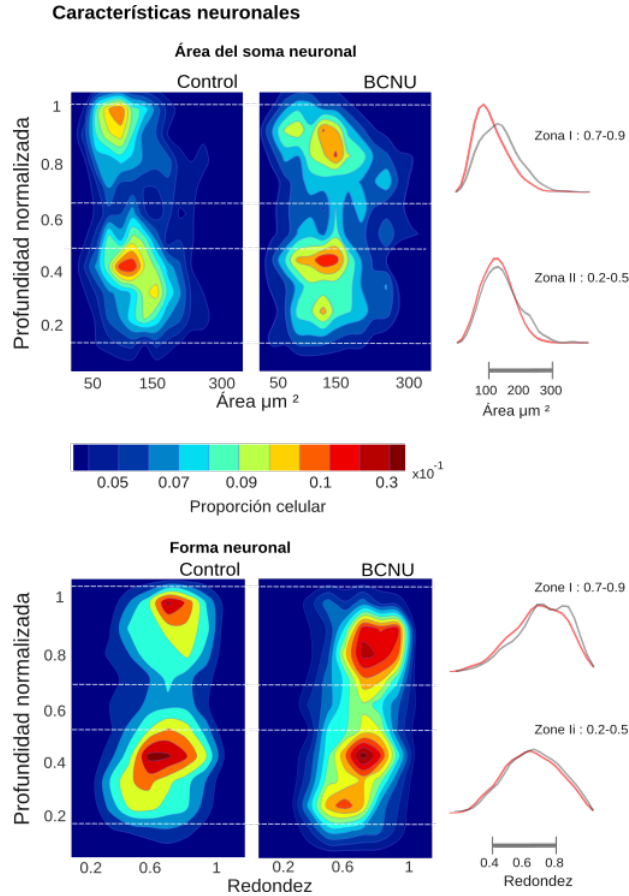


Figura 6.4: **Características morfológicas neuronales** Descriptores morfológicos, área del soma y redondez, en función de la profundidad. Los histogramas ilustran las profundidades que corresponden aproximadamente a la Capa II/III [0,9-0,7] con área y redondez ampliadas, y a la Capa V [0,5-0,2] que muestra un área aumentada.

aquella que es característica de actividad epileptogénica con altas amplitudes y frecuencias, se origina en los sitios en dónde existe la malformación cortical [80]. Por lo que ha generado una serie de preguntas en torno a cómo es la actividad celular de estas neuronas. Algunos estudios descriptivos de modelos de displasia en roedores en etapa adulta, como el inducido el de BCNU, han explorado de manera ex vivo a estas malformaciones encontrando que la actividad eléctrica provenientes de registros de campo, en estas cortezas tienen amplitudes y frecuencias mayores a la actividad de cortezas control [48]). En este caso nos interesó describir cómo era la actividad cortical, basal y posterior a un estímulo hiperexcitable. Siguiendo la premisa de que nuestros resultados morfológicos confirman un desarreglo cortical, buscamos relacionar una de las características de la señal, la potencia de la señal de calcio, a la posición cortical de cada célula registrada, a partir del registro de 5

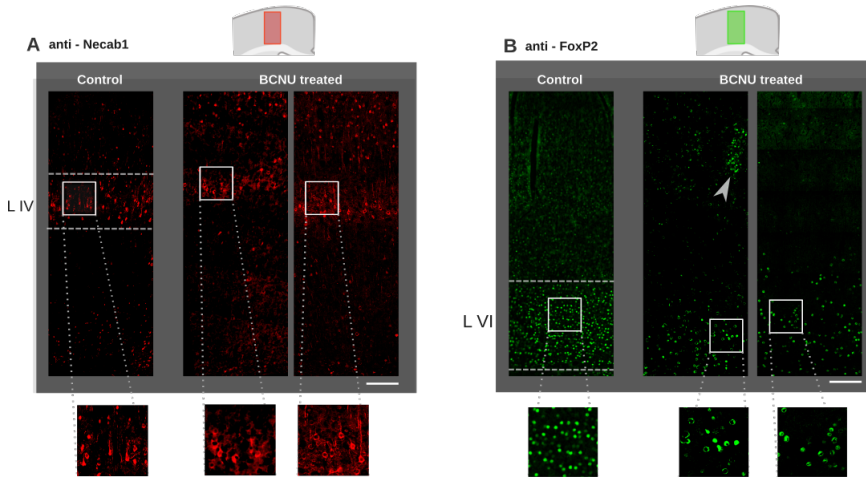


Figura 6.5: **Marcadores específicos a capa** Inmunofluorescencia específica de capa en M1. A: En los animales de control, Necab1 delimita claramente la capa IV (líneas discontinuas), con muy poca expresión en capas más superficiales. Dos animales experimentales muestran desorganización de la capa IV y más expresión en las capas II a III. B: FoxP2 se expresa normalmente en la capa VI, que muestra un límite superior nítido en los animales de control (línea discontinua). Los animales experimentales muestran un desdibujamiento del límite de la capa VI y grupos de neuronas heterotópicas en las capas superficiales (punta de flecha gris). Barra de escala y ejemplos de zoom: 200 μ m. Ambas representaciones esquemáticas de la corteza hacen referencia a la localización y extensión de las imágenes.

rebanadas Control, y 8 con lesión de displasia, como representan los histogramas 2D de la Fig 6.7Izq, en donde logramos observar que en cortezas control, las células en actividad basal, presentan valores de Potencia de los 10-30 dB, siendo más recurrentes las células con potencia de 10 dB y podemos encontrar a estas células a lo largo de la corteza M1. Mientras que en las cortezas con displasia presentan una especie de dicotomía en función a los valores de poder de su actividad celular basal (8-12 dB), encontrándose distribuidas principalmente en la región medial de estas cortezas. Por otro lado, en la actividad posterior al estímulo de Pilocarpina [300 μ M], las células en corteza Control mantienen dos rangos de potencia, uno bajo (8-15 dB), distribuido a lo largo de la corteza y otro de valores altos (15-50 dB) posicionados en las zonas más profundas de la corteza, que corresponden a las capas V-VI. Las cortezas con malformación de displasia, mantienen el mismo patrón dicotómico a lo largo de la corteza. Las distribuciones acumuladas del panel A, lado derecho, ayudan a visualizar la proporción de estos valores entre grupos y condiciones.

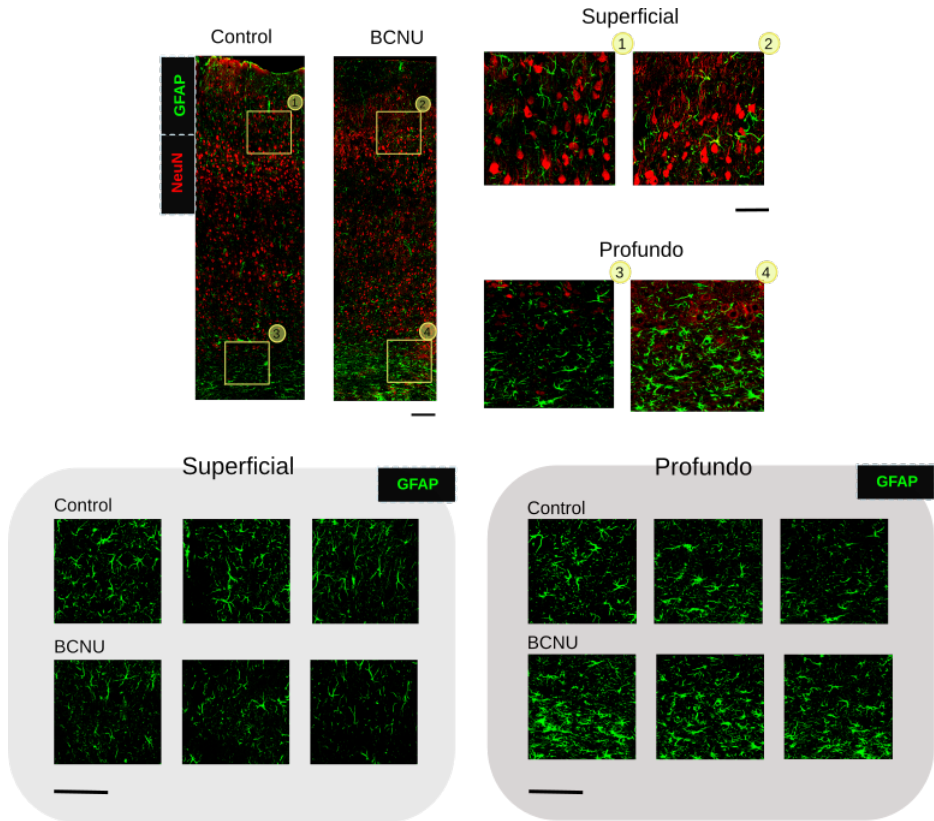


Figura 6.6: **Marcadores específicos a GFAP, astrocitos** Evaluación cualitativa de GFAP en M1. El panel superior muestra dos ejemplos representativos, con inmunomarcadores para NeuN (rojo) y GFAP (verde), en un animal Control (izquierda) y otro tratado con BCNU (derecha); barra de escala = 150 μ m. Los paneles de la derecha muestran vistas ampliadas de regiones corticales superficiales y profundas etiquetadas con números correspondientes al área y al grupo (Control 1,3; tratado con BCNU 2,4); barra de escala = 50 μ m. Los paneles inferiores muestran tres especímenes diferentes por grupo, con vistas ampliadas de aproximadamente las mismas localizaciones que en los paneles superiores derechos, inmunomarcados para GFAP (verde); barra de escala = 100 μ m.

6.5.5. Evaluación de la conectividad neuronal a través del tiempo y de los estados de la actividad (antes, durante y después del estímulo).

Con la intención de contribuir al entendimiento de cuál o cuáles son las características para que las displasias corticales sean susceptibles a la epileptogénesis, tomamos en cuenta la descripción de este proceso, para lograr entenderlas. De acuerdo con [58] la epileptogénesis repercute temporalmente en la modificación de la conectividad neuronal, que a su vez ocasiona la evocación de actividad hiperexcitable y de crisis espontáneas recurrentes. En este trabajo

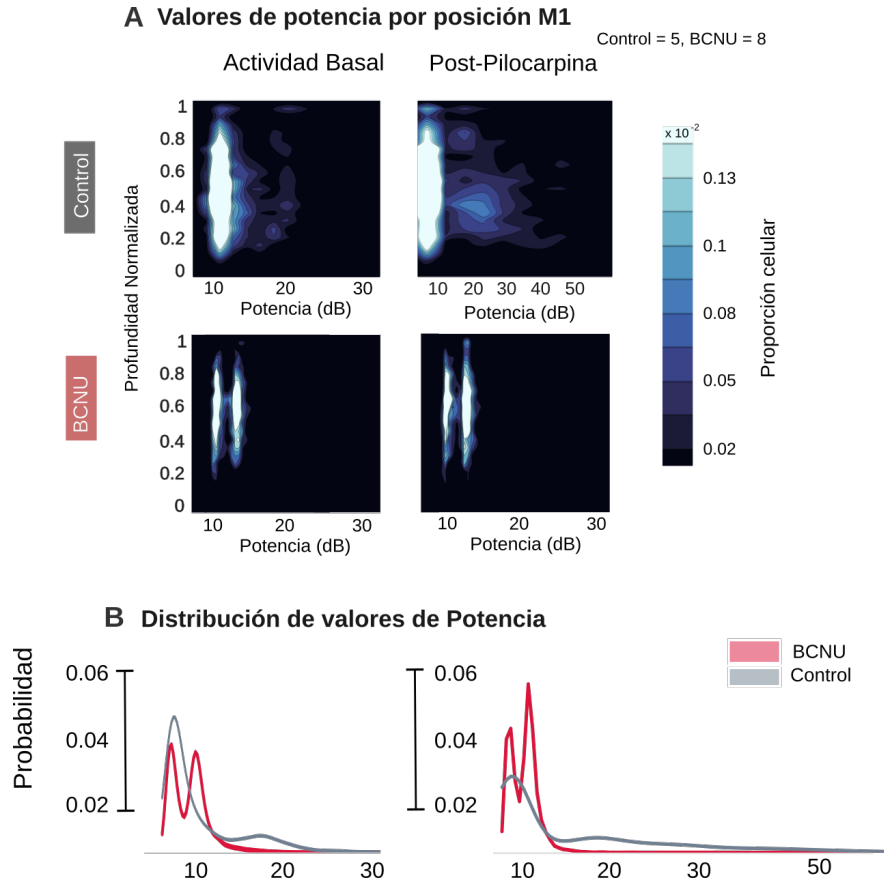


Figura 6.7: Valores de potencia durante la actividad basal y posterior al estímulo de Pilocarpina Potencia de la señal durante la actividad basal y post-pilocarpina. A: Potencia de la señal celular a lo largo de la profundidad cortical durante la actividad basal (columna izquierda) y post-pilocarpina (columna derecha); la escala de colores representa la proporción celular del número total de neuronas evaluadas. B: Distribuciones de potencia unidimensionales (es decir, similares a las del panel A, pero a lo largo de todas las profundidades corticales) durante la actividad basal (izquierda) y post-pilocarpina (derecha).

evaluamos la conectividad celular a lo largo de la corteza M1 medial, en cinco ventanas temporales, con duración de 150 s cada una. La primera corresponde al tiempo antes del estímulo o de actividad basal (Before), la segunda, contiene 30s del estímulo de pilocarpina y 120s más de actividad posterior al estímulo (150s) y, las últimas tres a la actividad después del estímulo (300, 450, 600s) Fig 6.8. Encontramos que las correlaciones neurona a neurona en la actividad antes del estímulo, en cortezas con displasia, empieza con valores de correlación ligeramente mayores que los control (Displasia ρ 0.2-0.8, Controles, ρ 0.2-0.6). En la ventana que involucra el estímulo, la distribución de los valores de correlación de controles tiene dos aumentos en la proporción de estos, uno en ρ 0.2 y el otro

en ρ 0.5. Mientras que las cortezas con displasia, sólo aumentan en proporción los valores entre ρ 0.3-0.4. En la primera ventana después del estímulo, las correlaciones Control, tienden a disminuir y distribuirse principalmente entre los valores ρ 0.3-0.5; los valores de las cortezas con displasia en este caso aumenta en el rango de valores ρ 0.5-0.7. Las dos últimas ventanas se asemejan en distribución en ambos grupos Fig 6.8A. Para localizar en la corteza aquellas células que interactuaron en cada ventana temporal, consideramos todos los valores de correlación para calcular su grado de conectividad K y así relacionarlo con la posición en la corteza. En la Fig 6.8B Observamos que la mayor cantidad de conectividad en controles, se concentra en las capas II-IV (profundidad 0.6-0.9) con valores de 10-50 interacciones en promedio, durante la actividad basal y en displasias las encontramos más distribuidas (profundidad 0.2-1), con valores de conectividad mayores a los control ($K = 10-70$, en promedio). En la ventana del estímulo, las interacciones control, permanecen en el mismo grado de conectividad, pero se distribuyen más por la corteza (profundidad 0.3-0.9), mientras que las cortezas con displasia tienden a aumentar sus valores de conectividad conforme avanza el tiempo. Las conectividad control, por su parte, sólo aumenta en número de conexión en la ventana después del estímulo y lo hace sólo en ciertas profundidades (0.3-0.6, capa IV-V); posteriormente disminuyen. Este resultado nos llevó a evaluar entre qué profundidades se estaban llevando a cabo estas conexiones. Es decir qué interacciones corticales existieron en cada ventana. Para eso comparamos las interacciones de los controles con las de displasia y sólo nos quedamos con aquellas que fueron significativas estadísticamente representadas en la Fig 6.8C, en todos los casos el mayor efecto de esta comparación lo tuvo la conectividad control, en otras palabras, las interacciones son significativamente mayores en la comunicación de células control. Dicho efecto fue interpretado con el valor de la d de Cohen, representado en los colores de la interacción, entre más claro menor es el efecto y si es más oscuro, más efecto representa. Podemos observar que en la ventana temporal correspondiente al estímulo no existen interacciones significativamente distintas entre grupos, pero posteriormente a esta ventana, lo son y comienzan a involucrarse distintas profundidades, sobre todo en las últimas dos ventanas temporales. Por último exploramos algunas características de la conectividad intrínseca de la red mediante el cálculo de 3 métricas de red, agrupación, eficiencia y asortatividad Fig 6.8D. Las dos primeras, parecen tener un comportamiento similar entre grupos y conforme evoluciona la red. Sin embargo, la asortatividad, presenta intercambio de valores positivos y negativos en los valores de las redes displásicas, a lo largo de algunas ventanas temporales como la anterior al estímulo y la del mismo, lo cual podría indicar que hay un cambio en la estabilidad de la red de una ventana a otra, siendo más inestable durante el estímulo. Posteriormente, estos valores tanto en displasias como en control, vuelven a ser positivos, lo cual indica la recuperación y/o mantenimiento de la estabilidad en la red.

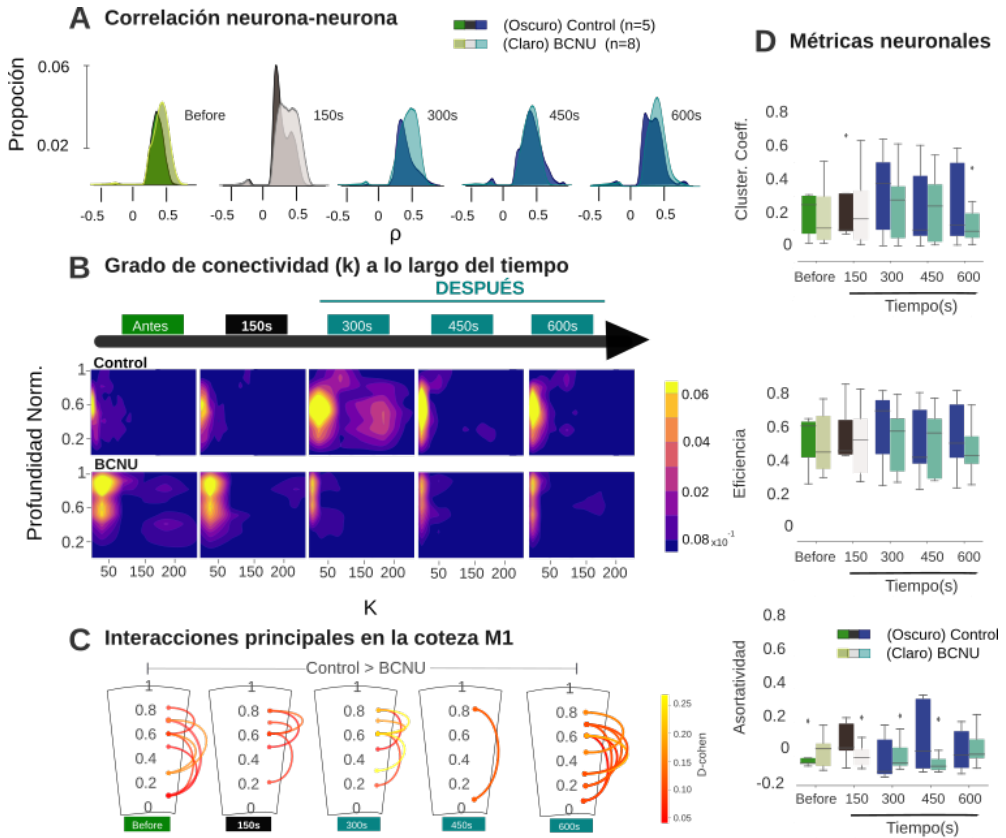


Figura 6.8: Comunicación neuronal antes, durante y después del estímulo hiperexcitable. A: Distribución de las correlaciones neurona-neurona específicas de cada grupo (ρ de Spearman) a lo largo de las ventanas temporales (como se define en la Figura 6.1; estímulo de pilocarpina dentro de la segunda ventana). B: Diagramas de densidad de los valores medios de grado de conectividad neuronal (k) en la profundidad cortical y en las ventanas temporales. C: Representación esquemática de la corteza; las líneas curvas indican reducciones estadísticamente significativas de la conectividad entre capas en los animales experimentales ($p < 0,05$), codificadas por colores según la d de Cohen. D: Métricas de red a lo largo del tiempo; no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Capítulo 7

Discusión y conclusión

A pesar de tener características histopatológicas que se asemejan a la displasia cortical focal humana tipo IIa, los animales tratados con BCNU no desarrollan convulsiones espontáneas [35, 45, 49, 54, 56, 91]. Sin embargo, la actividad eléctrica es anormal en estos animales, mostrando actividad epileptiforme en el hipocampo y el neocórtex al final del desarrollo cerebral [45], así como descargas epileptiformes evocadas tras el bloqueo del receptor GABA [45]. La ausencia de convulsiones espontáneas en ausencia de un agente precipitante es común en otros modelos de roedores de malformaciones corticales [92-96]. En consonancia con hallazgos anteriores, ninguno de nuestros animales desencadenó convulsiones espontáneas. Sin embargo, mostraron una actividad cortical alterada, tal y como evidenciaron las imágenes de calcio intracelular. A nivel individual, las células en las cortezas de control mostraron una distribución diferente de amplitudes en la línea de base, con un subconjunto de neuronas modificando su amplitud después del estímulo de pilocarpina. Además, las células registradas en los animales tratados con BCNU mostraron una distribución bimodal durante la actividad basal y también durante el estímulo externo. Esto podría explicarse por circuitos intracorticales aberrantes debidos a malformaciones corticales, pero también es posible que el BCNU alterara directamente el metabolismo del calcio de las neuronas (véase más adelante). No obstante, la presencia de actividad alterada (observada aquí a través de la actividad del calcio y en informes anteriores a través de grabaciones electrofisiológicas directas [45] sin convulsiones es una reminiscencia de la condición humana, en la que esta lesión cortical congénita a menudo no se traduce en convulsiones clínicas hasta años después del nacimiento. La plasticidad continuada durante el desarrollo cortical postnatal probablemente desenmascara la actividad neuronal alterada y permite la propagación de descargas epileptógenas [31].

Las displasias corticales surgen de procesos alterados relacionados con la migración y proliferación celular [9]. Estas alteraciones podrían resultar en patrones anormales de comunicación intracortical y contribuir al desarrollo de epilepsia. El modelo animal BCNU tiene un impacto importante en uno de estos procesos ya que la inducción se produce durante el inicio de la migración celular. Para aproximarnos a las formas en que la funcionalidad y la comunicación celular podrían verse alteradas en estas condiciones, en este trabajo aprovechamos un gran campo de visión de imágenes de calcio, que nos ayudó a analizar la dinámica de poblaciones e inferir la conectividad de una región neocortical específica en toda su profundidad. Nuestros resultados indican que la morfología anómala y la organización laminar conllevan repercusiones de comunicación intracortical además de alteraciones en neuronas individuales (Figura 5C). Esto es evidente en los patrones de conectividad anómalos entre neuronas de los

animales tratados con BCNU, que presentan diferencias en el número y la fuerza de las conexiones, así como en la dispersión de la conectividad (Figura 5A,B). Tales diferencias estaban presentes incluso antes del estímulo y, además, fueron moduladas diferencialmente entre los grupos por la pilocarpina, con diferentes patrones de retorno a la actividad basal. Las métricas globales de red, sin embargo, no difirieron entre grupos (Figura 5D), probablemente debido al gran tamaño de las redes y a la variabilidad entre especímenes. A lo largo de este trabajo, analizamos el curso temporal de la actividad $[Ca^{2+}]_i$ para cada neurona, basándonos en la suposición de que las alteraciones en la homeostasis neuronal del Ca^{2+} juegan un papel importante en la patogénesis de la epilepsia dado su papel fundamental como mensajero y transductor de señales [77, 97-99]. Existen pruebas de que la alteración de la concentración intraneuronal de este ion durante un estímulo externo altera la actividad celular y repercute en la activación de otros receptores de membrana [97]. Es probable que estos factores influyan en la evolución temporal de las señales de $[Ca^{2+}]_i$ y abogan a favor del análisis de series temporales en lugar de su deconvolución para derivar eventos neuronales. Además, la comparación directa entre grupos de las series temporales de $[Ca^{2+}]_i$ antes, durante y después del estímulo de pilocarpina nos permitió investigar la presencia de alteraciones de señalización preexistentes en los animales tratados con BCNU, así como su respuesta a un estímulo que conduce a la hiperexcitabilidad y a la (falta de) vuelta a la actividad basal.

Es posible que nuestros resultados estén relacionados con el desarrollo anormal inducido por BCNU, que puede ir más allá de la organización de la corteza y alterar varias vías celulares. Cabe destacar la vía mTOR, implicada en la activación de ATP-asas de calcio, como la $[Ca^{2+}]_i$ ATP-asa sarcoendoplasmática (SERCA), la $[Ca^{2+}]_i$ ATP-asa de membrana plasmática y el receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato tipo I, en las neuronas [100-102]. Recientes avances en el estudio de las displasias corticales focales han confirmado la implicación de la vía mTOR, que regula una serie de funciones celulares fisiológicas como el crecimiento celular, la proliferación, la expresión de canales iónicos y la plasticidad sináptica y de circuitos [18, 44, 103-105]. De hecho, la electroporación in utero para la introducción del transcrito mutante de MTOR induce la generación de displasia cortical focal y convulsiones espontáneas [29], y las alteraciones morfológicas asociadas varían en función de la hiperactivación de mTOR [106]. En particular, la alteración de la estratificación cortical no es un requisito para la generación de convulsiones, mientras que la presencia de neuronas dismórficas sí lo es [105].

El modelo animal BCNU proporciona un análogo de la desorganización microarquitectónica de las displasias corticales focales humanas, pero es insuficiente para una descripción completa de la epileptogénesis de dichas lesiones. epileptogénesis de tales lesiones. No obstante, confirmamos que la alteración de la anatomía microscópica de la corteza se traduce en una alteración de la actividad neuronal y de la respuesta a una manipulación farmacológica que provoca hiperexcitabilidad en la corteza motora primaria. Futuros trabajos deberían evaluar otras regiones neocorticales y el hipocampo, sitio en el que informes previos han demostrado alteraciones anatómicas [49, 54, 55] En este estudio nos centramos únicamente en la pilocarpina como mecanismo para perturbar la

actividad cortical, aunque existen otras formas de simular la actividad convulsiva y la hiperexcitabilidad para entender la epileptogénesis. teniendo más efectos en la estimulación cortical [107]. La alteración de la dinámica neuronal de cortes corticales vivos sólo puede lograrse con concentraciones muy altas de pilocarpina [72], como la que utilizamos nosotros, lo que limita la generalizabilidad de nuestros hallazgos. Otras intervenciones farmacológicas deben ser exploradas para validar nuestros resultados, también los modelos animales recientes que inducen FCD a través de la electroporación en el útero [108], que producen neuronas dismórficas que son capaces de provocar y mantener la actividad convulsiva, deben proporcionar una mayor comprensión de la generación y propagación de la actividad anormal dentro de la corteza, y permitir una mejor comprensión entre la anatomía y la función de las redes intracorticales.

7.1. Conclusión

Nuestro trabajo demuestra que en el modelo animal BCNU de displasia cortical, las sutiles alteraciones morfológicas en una fase temprana del desarrollo están vinculadas a una actividad neuronal de base y una comunicación intracortical anormales que, a su vez, se traducen en respuestas aberrantes a un estímulo hiperexcitable. La evaluación de la conectividad intracortical pone de relieve el papel de la disfunción de la red en la fisiopatología de la displasia cortical. Esta contribución puede guiar el refinamiento de modelos computacionales de epileptogénesis neocortical y mejorar aún más nuestra comprensión de esta causa común de epilepsia focal.

Parte III

Tercera parte, *Epílogo*

Capítulo 8

Perspectiva

A lo largo de este escrito se ha descrito la relevancia de las displasias corticales, una de las malformaciones corticales que ocurren durante el desarrollo embrionario y que su aparición es única en mamíferos, específicamente en primates. Dentro de las características que distinguen a estos sobre otras familias de animales, está la **neocorteza**, o corteza cerebral, que justamente es el sitio de alojamiento de muchas de estas malformaciones. Pasco Rakic [109], el mismo neurocientífico que generó la primera hipótesis del origen de la neocorteza a nivel de desarrollo embrionario [110], a finales de los 80's estaba proponiendo en su artículo "*Defects of neural migration and the pathogenesis of cortical malformations*" la posibilidad de que existieran errores en la formación cortical acorde a la clasificación de las malformaciones existentes, en ese entonces basándose en su hipótesis de desarrollo cortical, la primera categoría consistía en aquellas malformaciones que tenían menor disponibilidad de columnas oncogénicas, y en la segunda categoría entra en aquellas que tenían menos disponibilidad de células en dichas columnas. Varias malformaciones pueden entrar en ambas categorías. La primera categoría fue considerada por Rakic, como resultado de un defecto temprano que ocurre al mismo tiempo en el que se forma la zona ventral, en humanos esto coincidiría con la semana 7 de gestación, en la que él sugería que se empezaban a formar las columnas oncogénicas de las cuales todo proceso de proliferación y migración surgiría después y en las que era posible que no todas las neuronas alcanzaran el destino final de su migración, estancándose en algunas otras regiones, provocando neuronas ectópicas que no lograron migrar y se quedaron en la materia blanca, provocando un cerebro con grosor cortical normal pero con una superficie considerablemente más pequeña. El defecto de la segunda categoría se originaría posterior a la etapa proliferativa, según Rakic, después de la 7ma semana de gestación, cuya mayor repercusión recae en la cantidad de células disponibles en cada columna, disminuyendo la cantidad de unidades en la migración celular, y como consecuencia generando la disminución del grosor cortical aunado con la posibilidad de que existan neuronas ectópicas también [109, 110].

Si bien, la intuición de Rakic a finales de los 80's se acercaba mucho a lo que ahora citó en el Capítulo 1 y 2 que es lo que se ha descubierto gracias al mapeo molecular del desarrollo cortical, la proliferación y migración son los principales procesos que están alterados en la formación de las MCDs, sin embargo aún quedan huecos en el cómo y por qué, sólo en la neocorteza de primates se han descrito estas malformaciones.

Inicio esta perspectiva con el trabajo de Pasco Rakic, ya que él enfatiza su inquietud por el desarrollo de las malformaciones corticales, aún con la poca información que existía en esa época sobre la migración celular durante la

implican ventajas adaptativas, como la maternidad, procesos cognitivos, sociedad, lenguaje, etc. Así mismo esta corteza tiene su precedente en el clado de los saurópsidos (aves y reptiles); Ramón y Cajal mencionaba que la corteza cerebral de reptiles se parecía mucho a la de los mamíferos, dando así una importancia al estudio del mismo, para poder acercar nuestro entendimiento al cerebro actual [112].

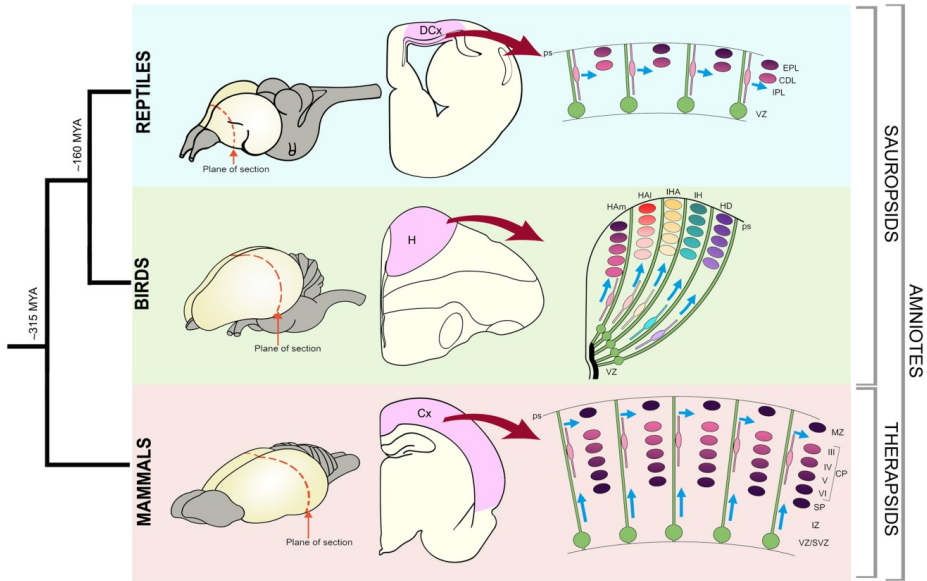


Figura 8.2: Se representa la temporalidad de aparición de cada grupo así como la ejemplificación del desarrollo cortical que conlleva cada uno en una región específica, desde un punto de vista coronal. La formación de la corteza dorsal, hiperpallium y corteza en, reptiles, aves y mamíferos, respectivamente, está descrita por la división simétrica de células progenitoras (verde), a excepción de las aves, cuyas divisiones son asimétricas siempre, y estas dan lugar a subzonas del hiperpallium, acotadas en la parte superior del esquema. Adaptado de: [113]

Existe una gran homología (mismo origen evolutivo) en el proceso de desarrollo de estas clases, ya que como se observa en la Fig.8.2, todas surgen de células progenitoras que son a su vez homólogas entre ellos. Las diferencias comienzan a surgir en las divisiones celulares así como en la migración, que como hemos revisado en los capítulos 1 y 2, estos dos procesos están coordinados por la activación de genes que fomentan y regulan ambos procesos. No obstante de acuerdo con el trabajo de [113], existen genes que se coexpresan en la formación de la capa IV de mamíferos y del Nidopallium en aves, regiones que para algunos neurobiólogos son análogas 8.3, es decir son funcionalmente iguales, pero estructuralmente distintas.

De una manera similar existen regiones corticales que poseen homología entre reptiles y mamíferos, principalmente las capas corticales profundas (LV-VI) con

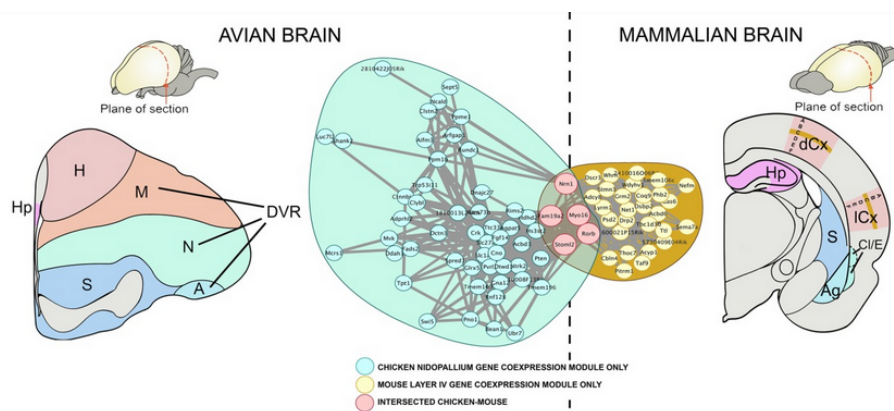


Figura 8.3: Co-expresión de genes, color rojo, en el proceso de formación del Nidopallium (N) color cyan, en aves, y en la capa IV de mamíferos, color naranja. Adaptado de: [113]

la corteza Dorsal de reptiles (DC), siendo entonces las capas corticales superiores las más innovadoras en la neocorteza. Luzzati, F [114], en el 2015 propone una hipótesis que la anteceden los hallazgos de previos estudios, donde se ha descrito Fig. 8.4 la similitud en expresión de genes que existe entre las células contenidas en las capas II-III y la corteza piriforme en donde se ha encontrado que en comparación con las otras capas V/VI, o en conjunto V/VI y II/III, las capas II-III comparten mayor cantidad de genes con la PC que las demás, Fig. 8.4. Recordando que la corteza piriforme es una de las más conservadas en los mamíferos actuales, de ahí la importancia de mencionarla y partir de ella. La hipótesis que Luzzati propone es que el origen de las capas superiores de la corteza de los sinápsidos inició con la superposición de la corteza LC y la DC Fig. 8.5, en donde en la transición de reptil a mamífero (pre-mamíferos) la LC, se expande sobre la DC y en algún punto del desarrollo las células progenitoras gliales, empiezan a producir células que constituyen a ambas cortezas. Debido a que existe nulo registro fósil de la corteza de los primeros mamíferos, por ser tejido blando y por estar en completa extinción, esta hipótesis está sustentada por reptiles modernos macrosmáticos como los dragones de Komodo. Esto se ve cada vez más marcado en la formación de cada capa cortical en los mamíferos primitivos como los roedores [114].

Considerando que los mamíferos primates humanos y no humanos, tenemos poco tiempo en la escala evolutiva, es muy posible que los cambios corticales que se establecieron en los mamíferos primitivos como los roedores, aún sufran modificaciones y adaptaciones. En este caso para lograr entender los procesos de transición evolutiva en el desarrollo cortical es indispensable continuar estudiando la neurobiología comparada de los reptiles, aves y anfibios con los mamíferos actuales, incluyéndolos. Naumann y Laurent en su capítulo, *"Function and evolution of the reptilian cerebral cortex"* [115] mencionan al igual que Sálazar y Quintero [116] el riesgo en el que se encuentra la neurobiología comparada

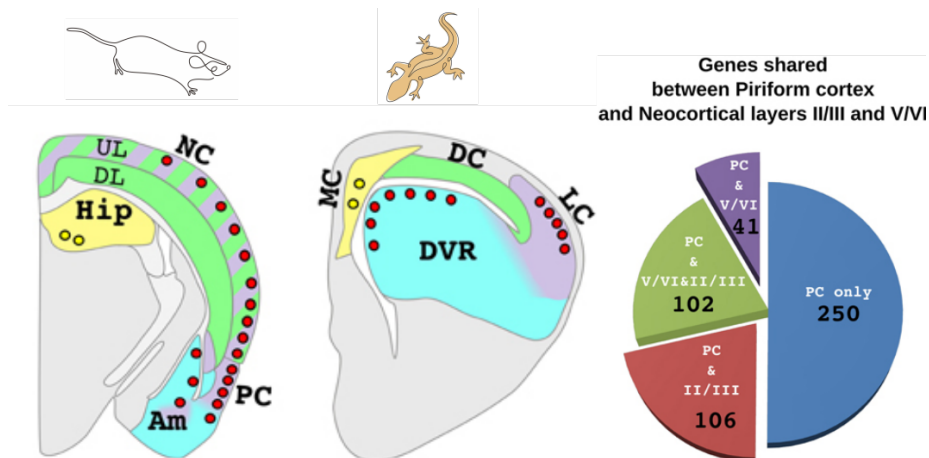


Figura 8.4: Los cortes coronales representan las regiones de mamíferos (roedores) y lagartijas, respectivamente, en donde en color violeta se somborean las zonas coticales homólogas entre ambas, en este caso la LC y la neocorteza NC, en conjunto con la DC, la LC por la PC, la cresta dorsoventral DVR, con la amígdala Am, sombreado en Cyan y en amarillo la homología entre el contenido celular del hipocampo Hip, y la corteza medial MC. Los círculos rojos muestran tipos celulares antiguos (rojo) y no antiguos (amarillo), presentes en las capas superiores. Del lado derecho, se muestra la proporción de genes compartidos entre las PC y las diferentes capas de la NC. Adaptado de: [114]

Fig. 8.6. Ya que de no tenerse esos datos se condena a una brecha de teorías sin bases o evidencias en el entendimiento del desarrollo y evolución del cerebro, tanto en su función como en su morfología. Por ejemplo, hasta el momento no se han descrito ningún tipo de malformaciones congénitas en aves, reptiles o anfibios, esto debido a la escasez en su exploración, no obstante el mayor modelo usado en la descripción de las mismas son los roedores cuyas alteraciones son manipuladas por protocolos químicos, físicos o genéticos. De manera natural los roedores tampoco parecen presentar esa alteración en el desarrollo cortical. Sólo en primates humanos se han descrito así como su repercusión epileptogénica. Siguiendo la hipótesis de Luzzati, si la formación cortical reside en un proceso modificado en el que se sobrelapan dos unidades corticales, lo que conlleva mutaciones genéticas dadas a la nueva adaptación que requiere el desarrollo cortical, esto puede tener consecuencias como el que existan mutaciones no adaptativas que conlleven a una mala migración o división celular, ya que el desarrollo cortical en primates humanos, implica una organización más compleja en tiempo y espacio, esto se hace más probable, lo que hoy en día se sabe que ocurre, principalmente en la vía mTOR. Capítulo 2 En el prefacio abordábamos algunas *cicatrices evolutivas* de los primates humanos, casi todas sobre nuestra estructura ósea; esta puede sumarse a una cicatriz más de nuestra evolución, que así como cualquier proceso evolutivo, llegaremos a un punto adaptativo en el

que esas malformaciones nunca sean exitosas en la población y por lo tanto se eliminan. Después de todo nuestra existencia en el planeta tierra aún es muy corta.

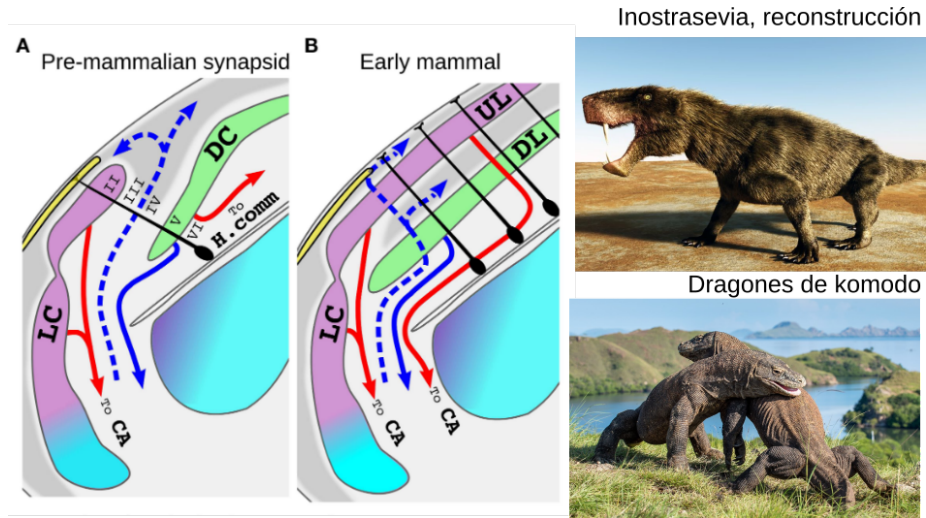


Figura 8.5: Hipótesis del origen de las capas corticales superiores. En el panel A, se muestra un esquema de la organización dorso-lateral en la formación temprana de la corteza en un pre-mamífero, como Inostrancevia, en donde la LC está representada por el color lila, en verde se encuentra la DC; las células gliales radiales progenitoras, en negro. La línea roja, representa la dirección de la formación de las conexiones interhemisferio, la azul continua, las corticotalámicas, y la azul discontinua las talamocorticales. La región superior en amarillo representa las proyecciones del bulbo olfatorio. En el panel B, se muestra la misma idea del A, pero los mamífero primitivos. Adaptado de: [114, 117, 118]

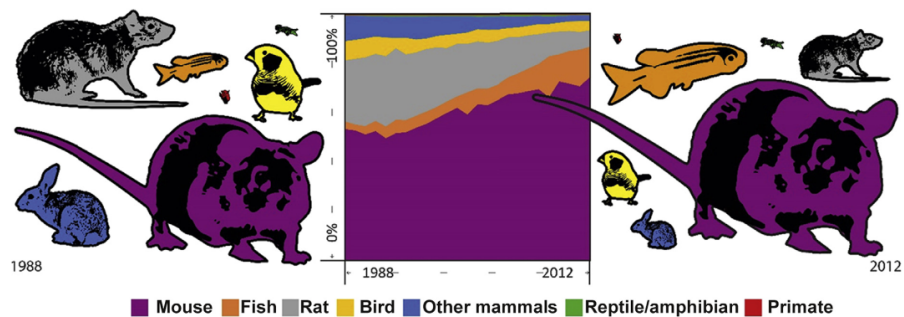


Figura 8.6: Proporción de modelos animales más usados y descritos en la neurobiología en los estudios de Reino Unido, desde 1988 hasta 2012. Siendo los mamíferos roedores los más empleados. Adaptado de: [115]

Apéndices

Apéndice A

Apéndice I

A.1. Sincronía por oscilaciones de señales periódicas

Sincronía me parece que es un termino popular que llegamos a entender con muy poco contexto en nuestra vida cotidiana, sin embargo explicar o comprender como se genera este fenómeno resulta un poco más complejo. En los sistemas biológicos, la sincronía se encuentra presente en diversas escalas y en prácticamente todas las formas de vida. Algunos de los ejemplos más explicados, son las parvadas de estorninos, que brindan espectaculares formas en su vuelo, o el apareamiento de las luciérnagas macho en épocas de apareamiento. No obstante, este fenómeno también lo encontramos en escalas más pequeñas como a nivel celular, por ejemplo, el crecimiento de una población bacteriana, depende de la sincronización de señales químicas entre bacterias, o bien, la comunicación celular en el sistema nervioso que ocurre ante diversas actividades cognitivas o sensoriales. De estos ejemplos podemos deducir que la sincronía sucede en grandes números de individuos u células; estorninos, luciérnagas, bacterias, células. Sin embargo basta sólo un par de aves, luciérnagas, bacterias o células para empezar a establecer una sincronía. La siguiente explicación es una adaptación del artículo de "*Coupled oscillators and biological synchronization*"[119]

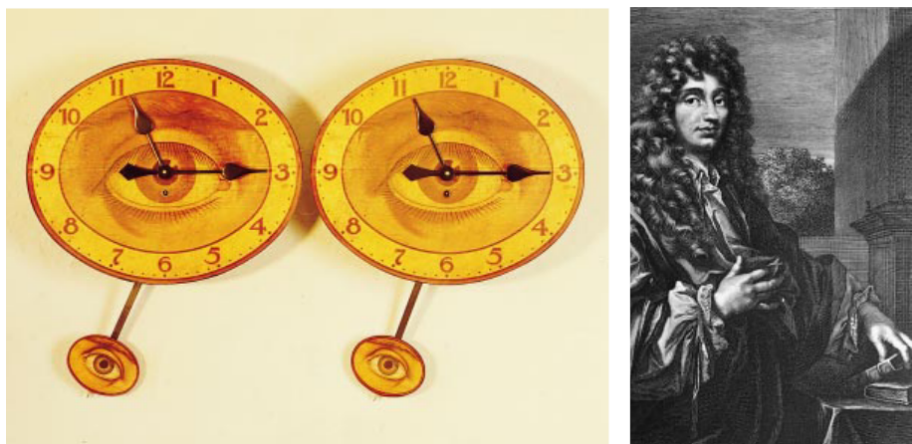


Figura A.1: Péndulos de reloj inventados por Christiaan Huygens. Adaptado de: *Strogarts & Stewart, 1993*

Christiaan Huygens (1665) [119], una noche confinado en su habitación, puso dos de los relojes de péndulo que él había creado y terminado de construir, a andar y cuando volvió a prestarles atención se percató que ambos péndulos

iban en la misma dirección, es decir se habían sincronizado, los observó por horas y aquellos no perdían su sincronía; incluso llegó a perturbar su marcha él mismo, y en menos de dos horas, los péndulos volvieron a sincronizarse. Dentro de la búsqueda de una explicación razonable a lo que observaba, consideró el que podían estar influenciados bajo una corriente de viento, así que distanció a los péndulos dentro de la habitación y encontró el mismo fenómeno. Lo que Huygens estaba encontrando esa noche de confinamiento, abriría una nueva área de estudio en las matemáticas, la de los osciladores acoplados.

Entender cómo funcionan los osciladores acoplados, como el que encontró Huygens en sus dos péndulos, o el que se encuentra intrínseco en la organización de la comunicación neuronal, es necesario definir, primero, lo que es un oscilador. Podemos entender a un oscilador como cualquier sistema que ejecute un comportamiento periódico, por ejemplo el péndulo del reloj, siempre regresa al mismo punto espacial, en intervalos temporales regulares cuya velocidad puede aumentar o decaer conforme al funcionamiento del reloj. En otras palabras un oscilador es aquel sistema que regrese a un punto de inicio *espacial*, y fluctúe en intervalos regulares temporales.

A.2. Osciladores: espacio fase

De la descripción de osciladores podemos extraer al menos tres términos importantes, el espacio, el tiempo y la fluctuación. La evolución temporal de dicha fluctuación comúnmente es estudiada a través de su espacio fase, que es una abstracción del espacio cuyas coordenadas definen el estado del sistema así como su evolución temporal, es decir el movimiento del péndulo en el tiempo, así como su velocidad y posición serán abstraídas en un espacio común. En este caso el espacio fase del péndulo tendrá curvaturas muy cerradas a consecuencia del movimiento periódico del mismo.

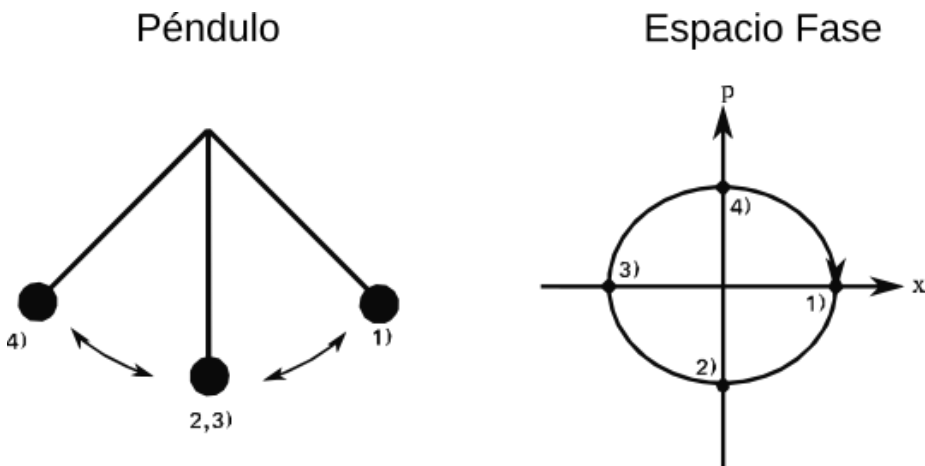


Figura A.2: Péndulos de reloj y su espacio fase.

Los sistemas biológicos, por otro lado, resultan un poco más complicados ya que tienden a tener no sólo características periódicas en su actividad, si no también en la amplitud de las señales que pueden estar involucradas. Osciladores que poseen fases y amplitudes estándar que pueden regresar fácilmente a su estado normal posterior a una perturbación, son conocidos como osciladores de ciclo limitado, ya que incorporan un mecanismo disipador para amortiguar las oscilaciones grandes y una fuente de energía para elevar aquellas que no son muy pequeñas. Un oscilador común tiene una trayectoria simple en un espacio fase, similar al que presenta la del péndulo, pero cuando se trata de dos osciladores acoplados, las trayectorias y las matemáticas detrás de este comportamiento salen de nuestro alcance. Un oscilador puede estar acoplado con algunos otros que se encuentren cerca de él, aunque ese acoplamiento sea mínimo, pero suficiente para impulsar a otros, dado a que esto incrementa una diferencia de fase entre osciladores, dando paso a la *sincronía* de los mismos. Por ejemplo, en la comunidad de luciérnagas macho en época de apareamiento, cada uno de los machos funciona como un oscilador que comienza a acoplarse primero con los vecinos y los vecinos con otros cercanos, hasta que la comunidad entera se encuentra acoplada y ocurren destellos sincrónicos durante horas. El acoplamiento que surge entre vecinos, que es la base de la sincronía en este ejemplo, comienza con lo que se conoce como *pulsos acoplados*, ya que ellos interactúan entre sí, cada que observan los pulsos lumínicos de otra luciérnaga cercana hasta que comienza su acoplamiento. Los pulsos acoplados son muy comunes en la biología, otro ejemplo más cercano a esta tesis es la comunicación eléctrica de las neuronas. La existencia de pulsos acoplados aumenta el nivel de complejidad en el estudio de la sincronía a través de las matemáticas, ya que agrega un componente de comportamiento discontinuo, es decir que ocurran o inicien en puntos distintos, como la primera luciérnaga que genera los pulsos lumínicos, o la primera neurona que evoca potenciales de acción, a un modelo continuo que es como tal el oscilador, cuyo inicio no es variable.

A.3. Osciladores con pulsos acoplados: contribuciones Charles S. Peskin

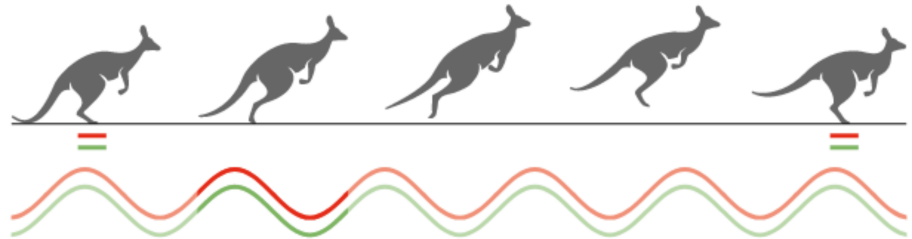
En 1975, el matemático Charles S. Peskin, propuso un modelo esquemático del ritmo del corazón, trabajo que hoy en día sigue siendo parte de su área de investigación. En dicho modelo, él esperaba responder cómo es que las células se sincronizan desde sus ritmos eléctricos individuales en un sólo ritmo, para generar un pulso cardíaco normal. Lo que hizo Peskin fue modelar un gran número de osciladores idénticos, cada uno acoplado de igual manera con todos los demás. Cada uno de los osciladores estaba basado en un circuito eléctrico que consistía en un capacitor en paralelo con una resistencia, que con una corriente constante de entrada, provocaba que el voltaje a través del capacitor, incrementara de manera constante, también. Cuando el voltaje alcanzaba un valor umbral, el capacitor se descargaba, y el voltaje caía a 0, y luego el voltaje regresaba a su línea base, y así el ciclo comenzaba de nuevo; algo muy similar a lo que

ocurre en el comportamiento de las células cardíacas de forma natural. Dos de las intuiciones de Peskin sobre la sincronización de estos osciladores en su modelo, eran que, el sistema eventualmente entrará en sincronía y, que puede sincronizarse aún cuando los osciladores no son idénticos. Al intentar corroborar estas, en su modelo, se encontró con algunos problemas matemáticos, por lo que evaluó el acople de sólo dos osciladores con corrientes de entrada infinitas, así como caídas de voltaje, con los cuales logró comprobar su primera intuición, los osciladores eventualmente llegaban a un punto de sincronía, siempre y cuando uno de los osciladores sobrepasara el umbral de voltaje del otro. Sin embargo no siempre los osciladores son exitosos en sincronizarse, algunas veces aunque estén acoplados, nunca llegan a sincronizarse. Las razones por las que esto sucede acontecen a un fenómeno llamado ruptura de la simetría.

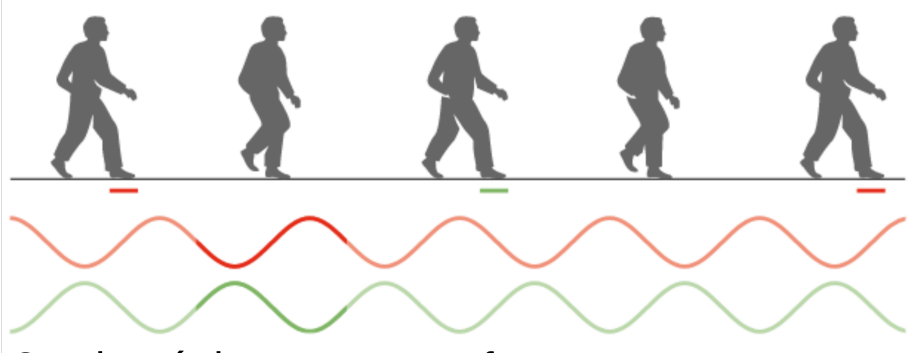
A.4. Ruptura de simetría

Los osciladores acoplados son una fuente importante de ruptura de la simetría. Es importante mencionar que dos osciladores pueden estar acoplados y presentar dos posibilidades de ese acoplamiento, sincronía, implicando una diferencia de fase igual a 0, y asincrónica donde la diferencia de fase puede ser $1/2$ o más, pero siempre diferente de 0. Un ejemplo de la primera posibilidad, es el salto de un canguro, si consideramos sus patas como osciladores, ambas estarían perfectamente acopladas, tocando periódicamente y al mismo tiempo el suelo; mientras que el caminar de un ser humano, sería un ejemplo asincrónico, en donde cada pie, tocaría en diferente tiempo el suelo, pero ambos pies estaría acoplados. Hasta el momento se ha descrito a los fenómenos detrás de la sincronía de manera sencilla, sólo a través de ejemplos de dos osciladores, en este caso tenemos 2 posibilidades, que estén en sincronía o en asincrónico. En cualquier otro ejemplo real y biológico estas posibilidades se incrementan y hacen más compleja su explicación. Por ejemplo, si hay un tercer oscilador en el mismo contexto que ejemplificamos, en este caso un señor hace su caminata con ayuda de un bastón, sabemos de inicio que ambos pies tocan asincrónicamente el asfalto, pero el bastón, en cambio, está en fase con uno de ellos y por otro lado se mueve con mayor rapidez que los pies, por lo tanto toca más veces el asfalto que los pies. Si observáramos la trayectoria del espacio fase de los pies del canguro, esta sería cíclica y simétrica, es decir la trayectoria sería coherente en todo tiempo, muy similar a la del péndulo, en cambio el espacio fase del último ejemplo, del señor caminando con bastón, sería más compleja, y seguramente no sea simétrica, sobre todo si en algún momento se pierde la fase entre el bastón y el movimiento de alguno de sus pies. Transladar esta explicación a los fenómenos neuronales es posible mediante la oscilación eléctrica del potencial a lo largo de un registro, en donde existen numerosas combinaciones en los intercambios de sincronía y asincrónica.

2 sincrónicas



2 asincrónicos



2 asincrónicos y uno en fase

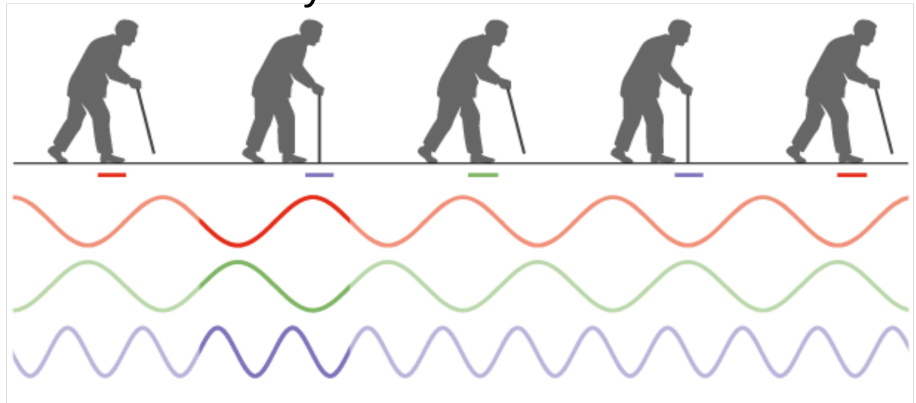


Figura A.3: Ejemplos de posibilidades de sincronía en el acoplamiento de 2 o más osciladores. Adaptado de [119]

Apéndice B

Apéndice II

B.1. Sincronía desde la perspectiva de redes neuronales

El surgimiento de sincronía en la comunicación celular es un amplio campo de estudio, el cual suele tener varias perspectivas de estudio, ya sea a través de la maquinaria química y molecular que cada célula posee, o bien a los impulsos eléctricos que genera el intercambio iónico transmembranal, en cada una, o también estudiando la organización propia del sistema desde la perspectiva de la energía del mismo, como proponen Karl Friston y Rafael Palacios [120]. Entendiendo que un sistema es capaz de auto-organizarse (sincronizarse) siempre y cuando los posibles estados de su actividad sean perpetuados en un subestado homeostático, es decir un estado imperturbable. Retomando la explicación del Apéndice A estos estados y subestados pueden ser evaluados y descritos desde su trayectoria espacio-temporal, a través de su espacio fase. Mientras que la trayectoria evolucione y regrese a un estado estable, el sistema será capaz de auto-organizarse. Un ejemplo de esto sería, un circuito establecido en la actividad neuronal, es decir un grupo de células con comunicaciones fijas entre sí, que a pesar de cualquier cambio en el ambiente, llámese estimulación del medio externo, esas conexiones no se perderán y será menos sencillo alterar la homeostásis o autorregulación del sistema. Esta auto-organización en términos de teoría de información sistema puede decirse que disminuye la energía libre del mismo, es decir, que el sistema minimiza probabilísticamente la aparición de energía libre de su entorno, o en otras palabras, minimiza la posibilidad de perturbación. Esta propiedad, involucra también un intercambio de información del sistema (un cúmulo de grupos celulares) con el entorno (ya sea mediante liberación de neurotransmisores o iones). En este intercambio puede surgir otros estados que son importantes para facilitar la sincronización, auto-organización o minimización de la energía libre del sistema. Si consideramos a cada célula neuronal como agentes activos que influyen en el entorno a partir de la información que obtienen de interacciones pasadas y, que no sólo responden ante estímulo, es más sencillo interpretar la evolución de su dinámica hasta que se alcance la sincronía. En este sentido es importante mencionar que en modelos *in silico* no todas las neuronas de una red poseen la capacidad de minimizar la energía libre del sistema, por lo que nunca alcanzan a sincronizarse con el grupo de interacción. Esto también se ha observado en actividad neuronal *in vitro* como los resultados descritos en esta tesis en donde se describe que bajo una alteración en el ambiente (un estímulo externo), existen grupos celulares que incrementan sus interacciones, pero otros, nunca vuelven a recuperarse.

Apéndice C

Artículos derivados de este proyecto de investigación



OPEN

Altered functional connectivity and network excitability in a model of cortical dysplasia

A. Aquiles¹, T. Fiordeliso^{2,3}, H. Luna-Munguia¹ & L. Concha^{1✉}

Focal cortical dysplasias (FCDs) are malformations of cortical development that often result in medically refractory epilepsy, with a greater incidence in the pediatric population. The relationship between the disturbed cortical morphology and epileptogenic activity of FCDs remains unclear. We used the BCNU (carmustine 1-3-bis-chloroethyl-nitrosourea) animal model of cortical dysplasia to evaluate neuronal and laminar alterations and how these result in altered activity of intracortical networks in early life. We corroborated the previously reported morphological anomalies characteristic of the BCNU model, comprising slightly larger and rounder neurons and abnormal cortical lamination. Next, the neuronal activity of live cortical slices was evaluated through large field-of-view calcium imaging as well as the neuronal response to a stimulus that leads to cortical hyperexcitability (pilocarpine). Examination of the joint activity of neuronal calcium time series allowed us to identify intracortical communication patterns and their response to pilocarpine. The baseline power density distribution of neurons in the cortex of BCNU-treated animals was different from that of control animals, with the former showing no modulation after stimulus. Moreover, the intracortical communication pattern differed between the two groups, with cortices from BCNU-treated animals displaying decreased inter-layer connectivity as compared to control animals. Our results indicate that the altered anatomical organization of the cortex of BCNU-treated rats translates into altered functional networks that respond abnormally to a hyperexcitable stimulus and highlight the role of network dysfunction in the pathophysiology of cortical dysplasia.

Focal cortical dysplasias (FCDs) are a type of cortical development malformation that constitutes a frequent cause of refractory epilepsy in the pediatric population and in adults^{1–5}. Clinically, FCDs show great variability in their morphology, extension, and location. Whereas some are large and easily identifiable with conventional imaging methods, others are subtle and difficult to find, which may preclude the possibility of neurosurgical treatment^{2,6}. The mechanisms driving epileptogenesis in FCDs are not fully understood due to the impossibility of performing longitudinal evaluations in patients before the onset of seizures.

Animal models of FCD provide a good opportunity to study the morphological features and pathophysiological mechanisms of epilepsy related to human cortical malformations. The carmustine 1-3-bis-chloroethyl-nitrosourea (BCNU) model has been widely described in rats, inducing in the offspring laminar disarrangement, abnormal cell morphologies, and features similar to those seen in humans with FCD type IIa^{7–11}. While animals with this induced lesion do not present spontaneous seizures, some studies have described an augmented excitability of the malformed cortex¹² and enhanced susceptibility of the lesioned animals to trigger seizures^{8,13,14}. In this study, we used the BCNU model to evaluate the physiological repercussions of the morphological alterations seen during early life and determine how these malformations facilitate the generation of abnormal electrical activity. For this, large field-of-view calcium images of live cortical slices allowed us to analyze the spatio-temporal cortical dynamics and how they change after pharmacologically induced stimulation.

Based on the premise that alterations of cellular communication are involved in epilepsy development¹⁵, the aim of the present study is to understand the link between cortical morphological alterations and intracortical connectivity before, during, and after an external stimulus is applied. BCNU-treated animals showed cortical dislamination, atypical neuronal morphology, and altered baseline connectivity patterns that abnormally responded to the external stimulus.

¹Institute of Neurobiology, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, Querétaro, Mexico. ²Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico. ³Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia LaNSBioDyT, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico. ✉email: lconcha@unam.mx



OPEN ACCESS

EDITED BY
Mario Torsio,
Oxford Brain Diagnostics Ltd, United Kingdom

REVIEWED BY
Gunther Helms,
Lund University, Sweden
Rafael Neto Henriques,
Champalimaud Foundation, Portugal

*CORRESPONDENCE

Luis Concha
✉ lconcha@unam.mx

RECEIVED 15 December 2022

ACCEPTED 18 April 2023

PUBLISHED 05 May 2023

CITATION

Villaseñor PJ, Cortés-Servín D, Pérez-Moriel A, Aquiles A, Luna-Munguía H, Ramirez-Manzanares A, Coronado-Leija R, Larriva-Sahd J and Concha L (2023) Multi-tensor diffusion abnormalities of gray matter in an animal model of cortical dysplasia. *Front. Neurol.* 14:1124282. doi: 10.3389/fneur.2023.1124282

COPYRIGHT

© 2023 Villaseñor, Cortés-Servín, Pérez-Moriel, Aquiles, Luna-Munguía, Ramirez-Manzanares, Coronado-Leija, Larriva-Sahd and Concha. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Multi-tensor diffusion abnormalities of gray matter in an animal model of cortical dysplasia

Paulina J. Villaseñor¹, David Cortés-Servín¹, Aylin Pérez-Moriel², Ana Aquiles¹, Hiram Luna-Munguía¹, Alonso Ramirez-Manzanares², Ricardo Coronado-Leija³, Jorge Larriva-Sahd¹ and Luis Concha^{1*}

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla, Querétaro, Mexico, ²Centro de Investigación en Matemáticas, A.C., Guanajuato, Mexico, ³Bernard and Irene Schwartz Center for Biomedical Imaging, Department of Radiology, New York University School of Medicine, New York, NY, United States

Focal cortical dysplasias are a type of malformations of cortical development that are a common cause of drug-resistant focal epilepsy. Surgical treatment is a viable option for some of these patients, with their outcome being highly related to complete surgical resection of lesions visible in magnetic resonance imaging (MRI). However, subtle lesions often go undetected on conventional imaging. Several methods to analyze MRI have been proposed, with the common goal of rendering subtle cortical lesions visible. However, most image-processing methods are targeted to detect the macroscopic characteristics of cortical dysplasias, which do not always correspond to the microstructural disarrangement of these cortical malformations. Quantitative analysis of diffusion-weighted MRI (dMRI) enables the inference of tissue characteristics, and novel methods provide valuable microstructural features of complex tissue, including gray matter. We investigated the ability of advanced dMRI descriptors to detect diffusion abnormalities in an animal model of cortical dysplasia. For this purpose, we induced cortical dysplasia in 18 animals that were scanned at 30 postnatal days (along with 19 control animals). We obtained multi-shell dMRI, to which we fitted single and multi-tensor representations. Quantitative dMRI parameters derived from these methods were queried using a curvilinear coordinate system to sample the cortical mantle, providing inter-subject anatomical correspondence. We found region- and layer-specific diffusion abnormalities in experimental animals. Moreover, we were able to distinguish diffusion abnormalities related to altered intra-cortical tangential fibers from those associated with radial cortical fibers. Histological examinations revealed myelo-architectural abnormalities that explain the alterations observed through dMRI. The methods for dMRI acquisition and analysis used here are available in clinical settings and our work shows their clinical relevance to detect subtle cortical dysplasias through analysis of their microstructural properties.

KEYWORDS

diffusion-weighted imaging, focal cortical dysplasia, gray matter, diffusion tensor imaging, immunofluorescence, epilepsy

Referencias

1. Dobzhansky, T. Nothing in Biology Makes Sense except in the Light of Evolution. *The American Biology Teacher* vol. 35. Publisher: University of California Press, 125-129 (1 de mar. de 1973).
2. Owen, R. *On the Nature of Limbs* ().
3. Tanghe, K. B. On The Origin of Species: The story of Darwin's title. *Notes and Records: the Royal Society Journal of the History of Science* vol. 73. Publisher: Royal Society, 83-100 (22 de ago. de 2018).
4. Krogman, W. M. The Scars of Human Evolution. *Scientific American* vol. 185. Publisher: Scientific American, a division of Nature America, Inc., 54-57 (1951).
5. Rakic, P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 10. Number: 10 Publisher: Nature Publishing Group, 724-735 (oct. de 2009).
6. Chenn, A. y Walsh, C. A. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science (New York, N.Y.)* vol. 297, 365-369 (19 de jul. de 2002).
7. Bystron, I., Blakemore, C. y Rakic, P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 9. Number: 2 Publisher: Nature Publishing Group, 110-122 (feb. de 2008).
8. Greig, L. C., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H. y Macklis, J. D. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 14. Number: 11 Publisher: Nature Publishing Group, 755-769 (nov. de 2013).
9. Buchsbaum, I. Y. y Cappello, S. Neuronal migration in the CNS during development and disease: insights from in vivo and in vitro models. *Development* vol. 146, dev163766 (9 de ene. de 2019).
10. Campbell, K. y Götz, M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in Neurosciences* vol. 25, 235-238 (1 de mayo de 2002).
11. Chini, M. y Hanganu-Opatz, I. L. Prefrontal Cortex Development in Health and Disease: Lessons from Rodents and Humans. *Trends in Neurosciences* vol. 44. Publisher: Elsevier, 227-240 (1 de mar. de 2021).
12. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M. y Noble-Haeusslein, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology* vol. 106-107, 1-16 (1 de jul. de 2013).

13. Dwyer, N. D. *et al.* Neural Stem Cells to Cerebral Cortex: Emerging Mechanisms Regulating Progenitor Behavior and Productivity. *Journal of Neuroscience* vol. 36. Publisher: Society for Neuroscience Section: Symposium and Mini-Symposium, 11394-11401 (9 de nov. de 2016).
14. Molnár, Z. *et al.* Comparative aspects of cerebral cortical development. *European Journal of Neuroscience* vol. 23. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1460-9568.2006.04611.x>, 921-934 (2006).
15. Molnár, Z. y Clowry, G. en *Progress in Brain Research* (eds. Hofman, M. A. y Falk, D.) 45-70 (Elsevier, 1 de ene. de 2012).
16. Milbocker, K. A. *et al.* Glia-Driven Brain Circuit Refinement Is Altered by Early-Life Adversity: Behavioral Outcomes. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* vol. 15 (2021).
17. Subramanian, L., Calcagnotto, M. E. y Paredes, M. F. Cortical Malformations: Lessons in Human Brain Development. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 13 (2020).
18. Crino, P. B. Focal brain malformations: Seizures, signaling, sequencing. *Epilepsia* vol. 50. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1528-1167.2009.02289.x>, 3-8 (s9 2009).
19. Taylor, D. C., Falconer, M. A., Bruton, C. J. y Corsellis, J. A. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* vol. 34, 369-387 (ago. de 1971).
20. Najm, I. M., Sarnat, H. B. y Blümcke, I. Review: The international consensus classification of Focal Cortical Dysplasia - a critical update 2018. *Neuropathology and Applied Neurobiology* vol. 44, 18-31 (feb. de 2018).
21. Gaitanis, J. N. y Donahue, J. Focal cortical dysplasia. *Pediatric Neurology* vol. 49, 79-87 (ago. de 2013).
22. Palmini, A. *et al.* Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology* vol. 62. Publisher: Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology Section: Articles, S2-S8 (23 de mar. de 2004).
23. Kim, S. H. y Choi, J. Pathological Classification of Focal Cortical Dysplasia (FCD) : Personal Comments for Well Understanding FCD Classification. *Journal of Korean Neurosurgical Society* vol. 62, 288-295 (mayo de 2019).
24. Wong-Kissel, L. C. *et al.* Challenges in managing epilepsy associated with focal cortical dysplasia in children. *Epilepsy Research* vol. 145, 1-17 (1 de sep. de 2018).
25. Chen, J. *et al.* Detection of human papillomavirus in human focal cortical dysplasia type IIB. *Annals of Neurology* vol. 72. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ana.23795>, 881-892 (2012).

26. Liu, S., Lu, L., Cheng, X., Xu, G. y Yang, H. Viral infection and focal cortical dysplasia. *Annals of Neurology* vol. 75. __eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ana.24037>, 614-616 (2014).
27. Coras, R. *et al.* No evidence for human papillomavirus infection in focal cortical dysplasia IIb. *Annals of Neurology* vol. 77. __eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ana.24328>, 312-319 (2015).
28. Shapiro, K. A. *et al.* Failure to detect human papillomavirus in focal cortical dysplasia type IIb. *Annals of Neurology* vol. 78. __eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ana.24422>, 63-67 (2015).
29. Lim, J. S. *et al.* Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nature Medicine* vol. 21. Number: 4 Publisher: Nature Publishing Group, 395-400 (abr. de 2015).
30. Sisodiya, S. M., Fauser, S., Cross, J. H. y Thom, M. Focal cortical dysplasia type II: biological features and clinical perspectives. *The Lancet. Neurology* vol. 8, 830-843 (sep. de 2009).
31. Abdijadid, S., Mathern, G. W., Levine, M. S. y Cepeda, C. Basic Mechanisms of Epileptogenesis in Pediatric Cortical Dysplasia. *CNS Neuroscience & Therapeutics* vol. 21. __eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/cns.12345>, 92-103 (2015).
32. Wyllie, E. *et al.* Successful surgery for epilepsy due to early brain lesions despite generalized EEG findings. *Neurology* vol. 69, 389-397 (24 de jul. de 2007).
33. Widdess-Walsh, P., Diehl, B. y Najm, I. Neuroimaging of focal cortical dysplasia. *Journal of Neuroimaging: Official Journal of the American Society of Neuroimaging* vol. 16, 185-196 (jul. de 2006).
34. Soares, J. C. y Mann, J. J. The anatomy of mood disorders—review of structural neuroimaging studies. *Biological Psychiatry* vol. 41, 86-106 (1 de ene. de 1997).
35. Bernasconi, A., Bernasconi, N., Bernhardt, B. C. y Schrader, D. Advances in MRI for 'cryptogenic' epilepsies. *Nature Reviews Neurology* vol. 7. Number: 2 Publisher: Nature Publishing Group, 99-108 (feb. de 2011).
36. Matsuda, K. *et al.* Neuroradiologic findings in focal cortical dysplasia: histologic correlation with surgically resected specimens. *Epilepsia* vol. 42 Suppl 6, 29-36 (2001).
37. Urbach, H. *et al.* Focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type: a clinicopathological entity with characteristic neuroimaging and histopathological features, and favorable postsurgical outcome. *Epilepsia* vol. 43, 33-40 (ene. de 2002).
38. Lawson, J. A. *et al.* Distinct clinicopathologic subtypes of cortical dysplasia of Taylor. *Neurology* vol. 64, 55-61 (11 de ene. de 2005).

39. Vézina, C., Kudelski, A. y Sehgal, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics* vol. 28, 721-726 (1 de oct. de 1975).
40. Kim, D.-H. *et al.* mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell* vol. 110, 163-175 (26 de jul. de 2002).
41. Sarbassov, D. D., Ali, S. M. y Sabatini, D. M. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology. Cell division, growth and death / Cell differentiation* vol. 17, 596-603 (1 de dic. de 2005).
42. Rosner, M. *et al.* The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* vol. 659, 284-292 (1 de sep. de 2008).
43. Nakashima, M. *et al.* Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. *Annals of Neurology* vol. 78. [_eprint: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ana.24444](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ana.24444), 375-386 (2015).
44. Wong, M. ANIMAL MODELS OF FOCAL CORTICAL DYSPLASIA AND TUBEROUS SCLEROSIS COMPLEX: RECENT PROGRESS TOWARD CLINICAL APPLICATIONS. *Epilepsia* vol. 50, 34-44 (oct. de 2009).
45. Pennacchio, P. *et al.* Increased pCREB expression and the spontaneous epileptiform activity in a BCNU-treated rat model of cortical dysplasia. *Epilepsia* vol. 56. [_eprint: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/epi.13070](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/epi.13070), 1343-1354 (2015).
46. Noctor, S. C., Palmer, S. L., McLaughlin, D. F. y Julianio, S. L. Disruption of Layers 3 and 4 during Development Results in Altered Thalamocortical Projections in Ferret Somatosensory Cortex. *Journal of Neuroscience* vol. 21. Publisher: Society for Neuroscience Section: ARTICLE, 3184-3195 (1 de mayo de 2001).
47. Cattaneo, E., Reinach, B., Caputi, A., Cattabeni, F. y Di Luca, M. Selective in vitro blockade of neuroepithelial cells proliferation by methylazoxymethanol, a molecule capable of inducing long lasting functional impairments. *Journal of Neuroscience Research* vol. 41. [_eprint: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jnr.490410510](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jnr.490410510), 640-647 (1995).
48. Benardete, E. A. y Kriegstein, A. R. Increased Excitability and Decreased Sensitivity to GABA in an Animal Model of Dysplastic Cortex. *Epilepsia* vol. 43. [_eprint: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1528-1157.2002.40901.x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1528-1157.2002.40901.x), 970-982 (2002).
49. Moroni, R. F. *et al.* Altered spatial distribution of PV-cortical cells and dysmorphic neurons in the somatosensory cortex of BCNU-treated rat model of cortical dysplasia. *Epilepsia* vol. 49, 872-887 (mayo de 2008).

50. Hradetzky, E. *et al.* The Methylazoxymethanol Acetate (MAM-E17) Rat Model: Molecular and Functional Effects in the Hippocampus. *Neuropsychopharmacology* vol. 37. Number: 2 Publisher: Nature Publishing Group, 364-377 (ene. de 2012).
51. Weiss, R. B. e Issell, B. F. The nitrosoureas: carmustine (BCNU) and lomustine (CCNU). *Cancer Treatment Reviews* vol. 9, 313-330 (dic. de 1982).
52. Ralhan, R. y Kaur, J. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* vol. 17. Publisher: Taylor & Francis _eprint: <https://doi.org/10.1517/13543776.17.9.1061>, 1061-1075 (1 de sep. de 2007).
53. Oliverio, V. T., Vietzke, W. M., Williams, M. K. y Adamson, R. H. The absorption, distribution, excretion, and biotransformation of the carcinostatic 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea in animals. *Cancer Research* vol. 30, 1330-1337 (mayo de 1970).
54. Moroni, R. F. *et al.* Expression of layer-specific markers in the adult neocortex of BCNU-Treated rat, a model of cortical dysplasia. *Neuroscience* vol. 159, 682-691 (17 de mar. de 2009).
55. Moroni, R. F. *et al.* Development of cortical malformations in BCNU-treated rat, model of cortical dysplasia. *Neuroscience* vol. 175, 380-393 (23 de feb. de 2011).
56. Inverardi, F. *et al.* Cytoarchitectural, behavioural and neurophysiological dysfunctions in the BCNU-treated rat model of cortical dysplasia. *European Journal of Neuroscience* vol. 37. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/ejn.12032>, 150-162 (2013).
57. Moroni, R. F. *et al.* Genesis of Heterotopia in BCNU Model of Cortical Dysplasia, Detected by Means of in utero Electroporation. *Developmental Neuroscience* vol. 35, 516-526 (13 de nov. de 2013).
58. Rakhade, S. N. y Jensen, F. E. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nature Reviews Neurology* vol. 5. Number: 7 Publisher: Nature Publishing Group, 380-391 (jul. de 2009).
59. Goldberg, E. M. y Coulter, D. A. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 14. Number: 5 Publisher: Nature Publishing Group, 337-349 (mayo de 2013).
60. Lau, C. G. y Zukin, R. S. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 8. Number: 6 Publisher: Nature Publishing Group, 413-426 (jun. de 2007).
61. Swann, J. W., Brady, R. J. y Martin, D. L. Postnatal development of GABA-mediated synaptic inhibition in rat hippocampus. *Neuroscience* vol. 28, 551-561 (1989).

62. Williams, P. A., Dou, P. y Dudek, F. E. Epilepsy and synaptic reorganization in a perinatal rat model of hypoxia-ischemia. *Epilepsia* vol. 45, 1210-1218 (oct. de 2004).
63. Anderson, A. E., Hrachovy, R. A., Antalffy, B. A., Armstrong, D. L. y Swann, J. W. A chronic focal epilepsy with mossy fiber sprouting follows recurrent seizures induced by intrahippocampal tetanus toxin injection in infant rats. *Neuroscience* vol. 92, 73-82 (1999).
64. Kubová, H. *et al.* Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *The European Journal of Neuroscience* vol. 19, 3255-3265 (jun. de 2004).
65. Stafstrom, C. E., Thompson, J. L. y Holmes, G. L. Kainic acid seizures in the developing brain: status epilepticus and spontaneous recurrent seizures. *Brain Research. Developmental Brain Research* vol. 65, 227-236 (21 de feb. de 1992).
66. Turski, W. A. *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural Brain Research* vol. 9, 315-335 (1 de sep. de 1983).
67. Cavalheiro, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. *The Italian Journal of Neurological Sciences* vol. 16, 33-37 (1 de mar. de 1995).
68. Cavalheiro, E. A., Santos, N. F. y Priel, M. R. The Pilocarpine Model of Epilepsy in Mice. *Epilepsia* vol. 37. __eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1528-1157.1996.tb00541.x>, 1015-1019 (1996).
69. Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S. G. y Avoli, M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods* vol. 172, 143-157 (30 de jul. de 2008).
70. Leite, J. P., Bortolotto, Z. A. y Cavalheiro, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* vol. 14, 511-517 (1 de dic. de 1990).
71. Cavalheiro, E. A. *et al.* Long-Term Effects of Pilocarpine in Rats: Structural Damage of the Brain Triggers Kindling and Spontaneous I Recurrent Seizures. *Epilepsia* vol. 32. __eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1528-1157.1991.tb05533.x>, 778-782 (1991).
72. Marchi, N. *et al.* In Vivo and In Vitro Effects of Pilocarpine: Relevance to Ictogenesis. *Epilepsia* vol. 48. __eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1167.2007.01185.x>, 1934-1946 (2007).
73. Pitsch, J. *et al.* Functional role of mGluR1 and mGluR4 in pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease* vol. 26, 623-633 (1 de jun. de 2007).
74. Yamaguchi, T. *et al.* N,N'-Bis(2-chloroethyl)- N-nitrosourea (BCNU)-induced Apoptosis of Neural Progenitor Cells in the Developing Fetal Rat Brain. *Journal of Toxicologic Pathology* vol. 23, 25-30 (2010).

75. Bymaster, F. P. *et al.* Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. *European Journal of Neuroscience* vol. 17. __eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1460-9568.2003.02588.x>, 1403-1410 (2003).
76. Budde, T., Meuth, S. y Pape, H.-C. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 3. Number: 11 Publisher: Nature Publishing Group, 873-883 (nov. de 2002).
77. Pal, S., Sun, D., Limbrick, D., Rafiq, A. y DeLorenzo, R. J. Epileptogenesis induces long-term alterations in intracellular calcium release and sequestration mechanisms in the hippocampal neuronal culture model of epilepsy. *Cell Calcium* vol. 30, 285-296 (oct. de 2001).
78. Grienberger, C. y Konnerth, A. Imaging Calcium in Neurons. *Neuron* vol. 73, 862-885 (8 de mar. de 2012).
79. Kabat, J. y Król, P. Focal cortical dysplasia – review. *Polish Journal of Radiology* vol. 77, 35-43 (2012).
80. Najm, I. M., Tilelli, C. Q. y Oghlakian, R. Pathophysiological mechanisms of focal cortical dysplasia: a critical review of human tissue studies and animal models. *Epilepsia* vol. 48 Suppl 2, 21-32 (2007).
81. WHEELER, G. P. en *Cancer Chemotherapy* 0 vols. *ACS Symposium Series* 30. Section: 5, 87-119 (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1 de jun. de 1976).
82. Luna-Munguia, H., Zestos, A. G., Gliske, S. V., Kennedy, R. T. y Stacey, W. C. Chemical biomarkers of epileptogenesis and ictogenesis in experimental epilepsy. *Neurobiology of Disease* vol. 121, 177-186 (ene. de 2019).
83. Papp, E. A., Leergaard, T. B., Calabrese, E., Johnson, G. A. y Bjaalie, J. G. Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain. *NeuroImage* vol. 97, 374-386 (15 de ago. de 2014).
84. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* vol. 9, 676-682 (28 de jun. de 2012).
85. Virtanen, P. *et al.* SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature Methods* vol. 17. Number: 3 Publisher: Nature Publishing Group, 261-272 (mar. de 2020).
86. Hagberg, A., Swart, P. y S Chult, D. *Exploring network structure, dynamics, and function using networkx* LA-UR-08-05495; LA-UR-08-5495 (Los Alamos National Lab. (LANL), Los Alamos, NM (United States), 1 de ene. de 2008).
87. R Core, T. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

88. Bates, D. *et al.* *lme4: Linear Mixed-Effects Models using 'Eigen' and S4* ver. 1.1-33. 25 de abr. de 2023.
89. Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* / Jacob Cohen / <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.4324/9780203771587/statistical-power-analysis-behavioral-sciences-jacob-cohen> (2023).
90. Hevner, R. F. Layer-specific markers as probes for neuron type identity in human neocortex and malformations of cortical development. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* vol. 66, 101-109 (feb. de 2007).
91. Moroni, R. F. *et al.* In vivo detection of cortical abnormalities in BCNU-treated rats, model of cortical dysplasia, using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroscience* vol. 192, 564-571 (29 de sep. de 2011).
92. Sancini, G. *et al.* Dysplastic neocortex and subcortical heterotopias in methylazoxymethanol-treated rats: an intracellular study of identified pyramidal neurones. *Neuroscience Letters* vol. 246, 181-185 (10 de abr. de 1998).
93. Colacitti, C., Sancini, G., DeBiasi, S., Franceschetti, S. y al et, e. Prenatal methylazoxymethanol treatment in rats produces brain abnormalities with morphological similarities to human development brain dysgeneses. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* vol. 58. Num Pages: 15 Place: Cary, United Kingdom Publisher: Oxford University Press, 92-106 (ene. de 1999).
94. Penschuck, S., Flagstad, P., Didriksen, M., Leist, M. y Michael-Titus, A. T. Decrease in parvalbumin-expressing neurons in the hippocampus and increased phencyclidine-induced locomotor activity in the rat methylazoxymethanol (MAM) model of schizophrenia. *European Journal of Neuroscience* vol. 23. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1460-9568.2005.04536.x>, 279-284 (2006).
95. Harrington, E. P., Möddel, G., Najm, I. M. y Baraban, S. C. Altered Glutamate Receptor—Transporter Expression and Spontaneous Seizures in Rats Exposed to Methylazoxymethanol in Utero. *Epilepsia* vol. 48. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1528-1167.2006.00838.x>, 158-168 (2007).
96. Tsai, V. *et al.* Fetal Brain mTOR Signaling Activation in Tuberous Sclerosis Complex. *Cerebral Cortex* vol. 24, 315-327 (1 de feb. de 2014).
97. DeLorenzo, R. J., Pal, S. y Sombati, S. Prolonged activation of the N-methyl-d-aspartate receptor-Ca²⁺ transduction pathway causes spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal neurons in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 95. Publisher:

- Proceedings of the National Academy of Sciences, 14482-14487 (24 de nov. de 1998).
98. Sun, D. A., Sombati, S., Blair, R. E. y DeLorenzo, R. J. Long-lasting alterations in neuronal calcium homeostasis in an in vitro model of stroke-induced epilepsy. *Cell Calcium* vol. 35, 155-163 (1 de feb. de 2004).
99. Steinlein, O. K. Calcium signaling and epilepsy. *Cell and Tissue Research* vol. 357, 385-393 (1 de ago. de 2014).
100. Guerini, D., Wang, X., Li, L., Genazzani, A. y Carafoli, E. Calcineurin Controls the Expression of Isoform 4CII of the Plasma Membrane Ca²⁺ Pump in Neurons *. *Journal of Biological Chemistry* vol. 275. Publisher: Elsevier, 3706-3712 (4 de feb. de 2000).
101. Genazzani, A. A., Carafoli, E. y Guerini, D. Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 96. Publisher: Proceedings of the National Academy of Sciences, 5797-5801 (11 de mayo de 1999).
102. BILMEN, J. G., WOOTTON, L. L. y MICHELANGELO, F. The inhibition of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase by macrocyclic lactones and cyclosporin A. *Biochemical Journal* vol. 366, 255-263 (15 de ago. de 2002).
103. Baybis, M. *et al.* mTOR cascade activation distinguishes tubers from focal cortical dysplasia. *Annals of Neurology* vol. 56. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ana.20211>, 478-487 (2004).
104. Miyata, H., Chiang, A. C. Y. y Vinters, H. V. Insulin signaling pathways in cortical dysplasia and TSC-tubers: Tissue microarray analysis. *Annals of Neurology* vol. 56. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ana.20234>, 510-519 (2004).
105. Lee, W. S. *et al.* Cortical Dysplasia and the mTOR Pathway: How the Study of Human Brain Tissue Has Led to Insights into Epileptogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23. Number: 3 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 1344 (ene. de 2022).
106. Nguyen, L. H., Mahadeo, T. y Bordey, A. mTOR Hyperactivity Levels Influence the Severity of Epilepsy and Associated Neuropathology in an Experimental Model of Tuberous Sclerosis Complex and Focal Cortical Dysplasia. *Journal of Neuroscience* vol. 39. Publisher: Society for Neuroscience Section: Research Articles, 2762-2773 (3 de abr. de 2019).
107. Raol, Y. H. y Brooks-Kayal, A. R. en *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (ed. Conn, P. M.) 57-82 (Academic Press, 1 de ene. de 2012).

108. Hsieh, L. S. *et al.* Convulsive seizures from experimental focal cortical dysplasia occur independently of cell misplacement. *Nature Communications* vol. 7. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 11753 (1 de jun. de 2016).
109. Rakic, P. y Swaab, D. F. en *Progress in Brain Research* (eds. Boer, G. J., Feenstra, M. G. P., Mirmiran, M., Swaab, D. F. y Van Haaren, F.) 15-37 (Elsevier, 1 de ene. de 1988).
110. Rakic, P. Specification of Cerebral Cortical Areas. *Science* vol. 241. Num Pages: 7 Place: Washington, United States Publisher: The American Association for the Advancement of Science, 170 (8 de jul. de 1988).
111. Silva, C. G., Peyre, E. y Nguyen, L. Cell migration promotes dynamic cellular interactions to control cerebral cortex morphogenesis. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 20. Number: 6 Publisher: Nature Publishing Group, 318-329 (jun. de 2019).
112. Translated, DeFelipe, e. b. J. y Jones, E. G. *Cajal on the Cerebral Cortex: An Annotated Translation of the Complete Writings* 672 págs. (Oxford University Press, Oxford, New York, 8 de dic. de 1988).
113. Montiel, J. F., Vasistha, N. A., Garcia-Moreno, F. y Molnár, Z. From sauropsids to mammals and back: New approaches to comparative cortical development. *Journal of Comparative Neurology* vol. 524. *eprint*: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cne.23871>, 630-645 (2016).
114. Luzzati, F. A hypothesis for the evolution of the upper layers of the neocortex through co-option of the olfactory cortex developmental program. *Frontiers in Neuroscience* vol. 9 (2015).
115. Naumann, R. K. y Laurent, G. en *Evolutionary Neuroscience (Second Edition)* (ed. Kaas, J. H.) 213-245 (Academic Press, London, 1 de ene. de 2020).
116. Salazar, I. y Sánchez Quinteiro, P. The risk of extrapolation in neuroanatomy: the case of the mammalian vomeronasal system. *Frontiers in Neuroanatomy* vol. 3 (2009).
117. *El dragón de Komodo gen a gen* www.nationalgeographic.com.es. https://www.nationalgeographic.com.es/naturaleza/dragon-komodo-gen-a-gen_14591 (2023).
118. *Inostrancevia | Amigos de los Dinosaurios y la Paleontología* Mundo Prehistórico. <https://www.mundoprehistorico.com/portfolio/inostrancevia/> (2023).
119. Strogatz, S. H. y Stewart, I. Coupled Oscillators and Biological Synchronization. *Scientific American* vol. 269. Publisher: Scientific American, a division of Nature America, Inc., 102-109 (1993).

120. Palacios, E. R., Isomura, T., Parr, T. y Friston, K. The emergence of synchrony in networks of mutually inferring neurons. *Scientific Reports* vol. 9. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 6412 (30 de abr. de 2019).