



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ANÁLISIS LONGITUDINAL DE LOS CAMBIOS EN LA MICROESTRUCTURA DEL
SISTEMA LÍMBICO EN UN MODELO DE EPILEPSIA CRÓNICA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
LUIS CUAUHTÉMOC MÁRQUEZ BRAVO

TUTORES PRINCIPALES:
DR. LUIS CONCHA LOYOLA
DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA CONDUCTUAL Y COGNITIVA - INB

DR. HIRAM LUNA MUNGUÍA
DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA CONDUCTUAL Y COGNITIVA - INB

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. SIDDHARTHA MONDRAGÓN RODRÍGUEZ
DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y NEUROFISIOLOGÍA- INB

DRA. MANOLA CUÉLLAR HERRERA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"

CAMPUS JURIQUILLA-UNAM, ENERO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este proyecto fue llevado a cabo en el Laboratorio de “Conectividad Cerebral” (C-13) del Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, y en el Laboratorio Nacional Enfocado en Resonancia Magnética (LANIREM) del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la cotutoría del Dr. Luis Concha Loyola y el Dr. Hiram Luna Munguía.

La investigación aquí descrita contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el apoyo (FC 1782). De igual forma, se agradece al CONACYT por la beca de posgrado concedida para la realización del presente trabajo (Becario: 476271; CVU: 858723).



"La práctica hace al maestro."

"Practice makes perfect."

"Übung macht den Meister."

"La pratique rend parfait."

Cultura popular

AGRADECIMIENTOS

A mi padre y a mi madre por su fe inconmensurable y amor infinito. Sus enseñanzas y creencias han forjado el hombre que soy ahora, por ello todo lo que soy se lo debo a Ustedes. A su lado todos los senderos se tornan transitables y cualquier desafío superable.

A mis hermanas por acompañarme en el transcurso de la vida. En especial, por todas las experiencias y bellos momentos que hemos compartido y, que aún nos faltan por compartir.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por iluminar la senda del conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante la maestría (Becario: 476271; CVU: 858723).

A la Unidad de Enseñanza y a todo el personal del Instituto de Neurobiología por su ardua labor en la formación de nuevos científicos.

Al Dr. Luis Concha por brindarme la oportunidad de aprender ciencia y mostrarme que una personalidad brillante es compaginable con una actitud siempre positiva y proactiva.

Al Dr. Hiram Luna por su dedicación y empeño vertidos en la culminación de este proyecto. Puesto que su personalidad perseverante y tenaz, en combinación con su actitud metódica y entusiasmo por la investigación científica, me enseñaron que la constancia en el trabajo siempre trae consigo buenos resultados.

A los miembros de mi comité tutor: la Dra. Manola Cuéllar y el Dr. Siddhartha Mondragón por la asesoría y apoyo otorgados durante el desarrollo de la maestría.

Al Laboratorio Nacional Enfocado en Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM). En particular, al Dr. Juan Ortiz por su conocimiento y asesoría incesante provistos para el manejo del resonador.

A la Dra. Deisy Gasca de la Unidad de Análisis Conductual por su valiosa ayuda con el resguardo de los animales y el soporte técnico otorgado durante las largas sesiones de videovigilancia.

A la Ing. Nydia Hernández de la Unidad de Microscopía por sus asesorías y la facilitación de las instalaciones para realizar el análisis histológico. Igualmente, a la M. en C. Gema Martínez por el adiestramiento impartido alusivo a preparación de soluciones y técnicas de perfusión, así como a la T.H. Leticia Castillo por sus destrezas en la realización de la técnica histológica.

Al M.V.Z. José Martín García y a la Dra. Alejandra Castillo del bioterio del Instituto de Neurobiología, por sus interminables atenciones en lo referente a los animales de experimentación.

A mis amigos y compañeros del laboratorio C-13: Alfonso Fajardo, Omar Narvaéz, Ana Aquiles, Renata Barbosa, Ricardo Ríos, Ricardo Coronado, Penélope Martínez, Itzamná Sánchez, Raúl Rodríguez, Gilberto Rojas, Gabriela Castillo y Ana Rosas, por su amistad, compañía y consejos.

A todos mis amigos del Kandel's crew: Jona, Cindy, Fer, Martín, Jalil, Ana, Mario, Santiago, Miriam, Isaac, Lizcano, Marisol y Dey. Gracias por su apoyo, los buenos momentos y, sobre todo, por su amistad.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. DESARROLLO HISTÓRICO Y CONCEPTUAL DE LA EPILEPSIA	5
2.2. EPIDEMIOLOGÍA	7
2.3. CLASIFICACIÓN DE LA CRISIS EPILÉPTICAS Y LAS EPILEPSIAS	8
2.4. NEUROBIOLOGIA DE LA EPILEPSIA	9
2.5. SISTEMA LÍMBICO EN CONDICIONES NORMALES Y PATOLÓGICAS	14
2.5.1. ANATOMÍA	14
2.5.2. CONECTIVIDAD DEL SISTEMA LÍMBICO	17
2.5.3. EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL	21
2.6. MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA Y CRISIS EPILÉPTICAS EN RATAS	25
2.6.1 MODELO DE PILOCARPINA	26
2.7. IMAGENOLOGÍA POR RESONANCIA MAGNÉTICA EN EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS	31
5.1. OBJETIVO GENERAL	31
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1. ANIMALES	32
6.2. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES <i>IN VIVO</i> POR RESONANCIA MAGNÉTICA.....	32
6.3. <i>STATUS EPILEPTICUS</i> INDUCIDO POR PILOCARPINA	33
6.4. PRE-PROCESAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN.....	34
6.5. SELECCIÓN DE REGIONES DE INTERÉS Y ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE DIFUSIÓN ...	35
6.6. PREPARACIÓN DEL TEJIDO Y ANÁLISIS HISTOLÓGICO	36
6.7. ADQUISICIÓN, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES <i>EX-VIVO</i>	37
6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
7. RESULTADOS	39
7.1. CAMBIOS LONGITUDINALES EN LAS CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DEL SISTEMA LÍMBICO <i>IN VIVO</i>	39

7.2. CAMBIOS LONGITUDINALES EN LOS PARÁMETROS DE DIFUSIÓN DERIVADOS DE LAS IMÁGENES ADQUIRIDAS <i>IN VIVO</i>	41
7.2.1. FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA	41
7.2.2. COEFICIENTE DE DIFUSIÓN APARENTE	44
7.2.3. DIFUSIVIDAD AXIAL	45
7.2.4. DIFUSIVIDAD RADIAL	45
7.3. CAMBIOS HISTOLÓGICOS SECUNDARIOS A LA INDUCCIÓN DE <i>STATUS EPILEPTICUS</i> EN EL MODELO DE PILOCARPINA	47
7.4. CAMBIOS MICROESTRUTURALES INFERIDOS POR IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN <i>EX VIVO</i>	49
7.4.1. FRACCION DE ANISOTROPÍA	49
7.4.2. COEFICIENTE DE DIFUSIÓN APARENTE	50
7.4.3. DIFUSIVIDAD AXIAL	50
7.4.4. DIFUSIVIDAD RADIAL	50
8. DISCUSIÓN	52
8.1. CAMBIOS LONGITUDINALES EN LOS PARÁMETROS DE DIFUSIÓN DERIVADOS DE LAS IMÁGENES ADQUIRIDAS <i>IN VIVO</i>	53
8.1.1. SISTEMA FIMBRIA-FÓRNIX	53
8.1.2. CÍNGULO	56
8.1.3. CUERPO CALLOSO Y CÁPSULA INTERNA	56
8.1.4. HIPOCAMPO	57
8.2. CAMBIOS HISTOLÓGICOS SECUNDARIOS A LA INDUCCIÓN DE <i>STATUS EPILEPTICUS</i> EN EL MODELO DE PILOCARPINA	59
8.3. CAMBIOS MICROESTRUTURALES INFERIDOS POR IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN <i>EX VIVO</i>	60
9. CONCLUSIÓN	61
10. REFERENCIAS	62
11. ANEXOS	78

1. RESUMEN

La imagenología con tensor de difusión ha permitido la identificación de anomalías microestructurales en regiones de sustancia gris y blanca de pacientes con epilepsia de lóbulo temporal. En el fórnix, en particular, estas anomalías se han vinculado con una densidad axonal reducida y a alteraciones en la vaina de mielina. No obstante, la temporalidad y el sustrato histológico de estas lesiones continúan en investigación. Por ello, se analizaron longitudinalmente los cambios en distintas estructuras cerebrales que surgen después de la inducción de *status epilepticus* (SE) y se buscaron correlatos histológicos.

Se indujo SE con la inyección intraperitoneal de pilocarpina en ratas Sprague-Dawley macho, con la finalidad de generar animales epilépticos (n=11) y controles (n=8). Todos los animales fueron escaneados *in vivo* en un resonador 7 T en tres puntos temporales: 16 días antes de la inducción del SE, 24 y 64 días después. Empleando el modelo del tensor se calculó la fracción de anisotropía (FA), la difusividad media (DM), la difusividad radial (DR) y la difusividad axial (DA) en estructuras de sustancia gris [hipocampo dorsal (HD), giro dentado (GD) y CA3] y sustancia blanca [fimbria-fórnix (FF), cíngulo (CG), cuerpo caloso (CC) y cápsula interna (CI)]. Finalmente, se validaron los cambios observados *in vivo*, con imágenes *ex vivo* y con las características histológicas identificadas con tinción Luxol Fast Blue.

Las métricas de difusión *in vivo* y *ex vivo*, así como la histología de animales control no presentaron anomalías a lo largo del estudio. El HD y el GD mostraron incrementos en la FA (HD 7%, $p < 0.05$; GD 21%, $p < 0.01$) a los 24 días y estos se mantuvieron a los 64 días post-SE. La FF presentó una disminución en la FA (30%, $p < 0.001$) dependiente de una reducción en la DA (24%, $p < 0.001$) y un incremento en la DR (14%, $p < 0.001$). Al igual que los cambios observados en sustancia gris, en la FF los cambios descritos fueron constantes en las mediciones post-SE. Otras estructuras de sustancia blanca tuvieron una conducta similar a la FF con reducciones en su anisotropía (CG 16%, $p < 0.001$; CC 8%, $p < 0.05$; CI 13%, $p < 0.01$). Las tendencias de reducciones o incrementos en las métricas de difusión fueron similares entre el análisis *in vivo* y *ex vivo*. En la histología del HD, se observó muerte de neuronas piramidales bilateral con predominio en CA1 y CA3. Mientras que, en la fimbria se distinguió una morfología adelgazada y con un patrón fibrilar laxo.

La reducción FA, asociada a un incremento en la DR y un decremento en la DA en la FF, reflejaron la pérdida axonal, las alteraciones en la vaina de mielina y la gliosis que caracteriza la fase crónica de la degeneración Walleriana. Estos hallazgos fueron asociados con los cambios observados en el HD, GD y CA3, donde la muerte neuronal y el nacimiento de fibras musgosas conducen a cambios en la anisotropía. La afectación de estructuras distantes al foco epiléptico podría reflejar un mecanismo distinto de daño asociado a la propagación de la actividad epiléptica. Estudios adicionales son requeridos para evaluar las poblaciones específicas de axones que se pierden en la FF después del SE.

2. ABSTRACT

Diffusion Tensor Imaging (DTI) has allowed the identification of microstructural abnormalities in grey- and white-matter regions in patients with temporal lobe epilepsy. In the fornix, in particular, these abnormalities correspond to reduced axonal density and alterations of the myelin sheaths. Nevertheless, the timing and the histologic substrate of these lesions are still undergoing research. Therefore, we aimed to longitudinally analyze structural changes that occur in different brain regions after the induction of *status epilepticus* (SE) and to seek its histological correlate.

SE was induced by intraperitoneal pilocarpine on male Sprague-Dawley rats in order to generate epileptic (n=11) and control (n=8) animals. All animals were imaged using a 7 T scanner at three time-points: 16 days prior to SE induction, and 24 and 64 days post-SE. Fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), radial diffusivity (RD) and axial diffusivity (AD) were calculated employing the tensor model in grey matter structures [dorsal hippocampus (DH), dentate gyrus (DG) and CA3] and white matter structures [fimbria-fornix (FF), cingulum (CG), corpus callosum (CC) and internal capsule (IC)]. At last, the changes observed *in vivo* were validated by the *ex vivo* imaging protocol and the histological features pointed out by the Luxol Fast Blue stain.

DTI parameters and histological features did not change over time in control animals. DH and DG showed a FA increase (DH 7%, $p < 0.05$; DG 21%, $p < 0.01$) at 24 days post SE, which remained abnormally augmented at 64 days. FF presented a FA reduction (30%, $p < 0.001$) in association with reduced AD (24%, $p < 0.001$) and an increase in RD (14%, $p < 0.001$). As well as changes observed in grey matter, the described FF changes were consistent between post SE evaluations. Other white matter structures had a similar behavior of anisotropy reductions, like FF (CG 16%, $p < 0.001$; CC 8%, $p < 0.05$; CI 13%, $p < 0.01$). The increasing and decreasing trends in the DTI parameters were analogous among *ex vivo* and *in vivo* results. In DH histology was observed bilateral neuronal death predominantly in the pyramidal cell layer of CA1 and CA3. Whereas in fimbria, a thinner morphology and a lax fibrillar pattern were identified.

A reduced FA, which was dependent of an increased RD and a decreased AD in the FF, reflected an axonal loss, abnormal myelin sheaths and gliosis. These findings correspond with the chronic phase of the Wallerian degeneration and have been related to changes in DH, DG and CA3, where the neuronal loss and the mossy fiber sprouting lead to anisotropy changes. In regard to the abnormalities found in distant structures from the epileptic focus, the underlying damage mechanisms could be secondary to epileptic activity propagation. Future studies are needed to evaluate the specific axonal populations within the FF that are lost after SE.

3. INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un trastorno crónico del sistema nervioso central que se manifiesta por una predisposición a presentar crisis epilépticas espontáneas recurrentes (CEER). Específicamente, la Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT) es la forma más frecuente de epilepsia de origen focal, identificándose a las crisis febriles, al *status epilepticus*, a las infecciones y a los traumatismos padecidos durante la infancia temprana como factores predisponentes del desarrollo de dicho padecimiento.

Numerosos estudios tanto clínicos como experimentales han demostrado que la actividad epileptiforme en sujetos con ELT se origina en regiones del sistema límbico, lo que deriva en alteraciones de sustancia gris y blanca, como muerte neuronal, neurodegeneración, gliosis y desmielinización, a nivel de esta área cerebral. Entre las alteraciones de sustancia gris, destaca la esclerosis hipocampal, que se caracteriza por la muerte segmentaria de neuronas piramidales y la consecuente sustitución de la citoarquitectura normal hipocampal, por astrogliosis, brotes axonales, crecimientos dendríticos y dispersión de neuronas granulares. Sin embargo, algunos trabajos también han identificado anomalías en la sustancia blanca, como pérdida axonal y desmielinización, en fascículos distantes al sistema límbico, lo cual ha modificado la perspectiva de la enfermedad, redireccionándola hacia un enfoque más global y menos focalizado. Dichas anomalías alejadas del foco epiléptico han sido identificadas gracias a la imagenología por resonancia magnética (IRM) sensible a difusión pues es capaz de inferir la microestructura* del tejido nervioso con base a la deducción de los movimientos aleatorios de las moléculas de agua.

El problema radica en que tales hallazgos sólo se han descrito en pacientes con ELT instaurada, por lo que se desconoce si éstos son causa o consecuencia del proceso epileptogénico. La dificultad para hacer un seguimiento de estas lesiones en pacientes ha impulsado el uso de modelos animales capaces de semejar algunas de las características clínicas del trastorno. Uno de los modelos de epilepsia adquirida más usados es el de la pilocarpina pues reproduce algunas de las alteraciones estructurales de este síndrome epiléptico, favoreciendo la aparición de CEER de origen límbico en los animales. En general, durante las últimas cuatro décadas, dicho modelo ha ayudado a comprender mejor el proceso

epileptogénico. Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar los cambios microestructurales que aparecen en áreas del sistema límbico tras la instauración de la ELT y analizarlos longitudinalmente mediante el uso de IRM sensible a difusión.

* El término microestructura hace referencia a las características morfológicas y/o físicas de los componentes del tejido nervioso, tales como mielina, axones, dendritas, soma neuronal, glía, vasos sanguíneos y matriz extracelular. Sin embargo, para los fines de la presente tesis la microestructura se delimitó sobre aquellos elementos que son detectables en la resonancia magnética sensible a difusión, como las membranas celulares y vainas de mielina. Por lo tanto, la contribución de estas estructuras a la citoarquitectura contenida dentro de un volumen específico y el cómo éstas interactúan con la difusión de las moléculas del agua, constituyeron las principales determinantes de los resultados aquí descritos.

2. ANTECEDENTES

2.1. DESARROLLO HISTÓRICO Y CONCEPTUAL DE LA EPILEPSIA

La epilepsia es tan antigua como la existencia del hombre mismo. Pocas enfermedades ostentan una representación en el imaginario social de distintas civilizaciones, tan vetusto y heterogéneo, como dicha afección. Por ello, tenemos que ahondar en la historia de la humanidad y de la medicina para encontrar testimonios y descripciones de dicha entidad nosológica.

La primera referencia médica alusiva a la epilepsia se encuentra en el *Sakkiku-miqtu*, considerado el libro de todas las enfermedades en la cultura asirio-babilónica (1067-1046 a.C.). En él se detallan diferentes tipos de crisis epilépticas y se engloban bajo el término *antashubba* (enfermedad de las caídas, en sumerio) (Wilson y Reynolds, 1990). Para el 900 a.C., Atreya (padre de la medicina hindú) describe a la epilepsia en los tratados médicos ayurvédicos y la denomina como *apasmara* (pérdida de conciencia), proponiendo diversos factores que podrían desencadenar las crisis epilépticas (Manyam, 1992). Años más tarde, en China, el libro clásico de medicina del emperador Huang Di Nei Jing (770-221 a.C.) considera que las crisis convulsivas son congénitas y las describe bajo el nombre de *Dian-Kuang* (epilepsia-psicosis) (Lai y Lai, 1991). Sin embargo, a pesar de su descripción en diversos escritos médicos, el origen de la epilepsia se pensaba sobrenatural o consecuencia de algún castigo divino. Esta creencia de la epilepsia como una enfermedad sagrada perduró hasta Hipócrates (460 a.C.), siendo el primero en desvincularla de cuestiones religiosas y en sugerir al cerebro como el sitio de origen de la enfermedad (Temkin, 1971; Wolf, 2014; Rubio y cols., 2016). Posteriormente, Galeno (130 a.C.) fue el primero en distinguir entre crisis primarias (originadas en los ventrículos cerebrales) y crisis simpáticas (originadas conforme al inicio del aura, ya sea en el estómago u otras partes del cuerpo) (Temkin, 1971; Wolf, 2014). Finalmente, la complejidad de la epilepsia como tal y el poco éxito en la cura de la mayoría de los enfermos, aunado a las transformaciones religiosas de la época bizantina y a menciones bíblicas de curas milagrosas, provocaron que la Iglesia Católica ocupara el vacío dejado por la mitología greco-romana, retomando así las antiguas creencias divinas y frenando el avance en el conocimiento de la enfermedad por varios siglos (Makris, 1995).

El estudio moderno de la epilepsia inicia en 1870 cuando John Hughlings Jackson identifica a la corteza peri-rolándica como el origen de las crisis focales motoras en pacientes con disfasia y parálisis de Todd. Además, trata de explicar los diferentes tipos de crisis epilépticas y sugiere por primera vez que la actividad epiléptica es capaz de propagarse e involucrar diversas regiones cerebrales más allá del foco inicial (Jackson, 1870). Gustav Fritsch y Edouard Hitzig, contemporáneos a J.H.Jackson, marcaron un hito en la historia de la epilepsia al identificar a la corteza cerebral como una estructura capaz de generar crisis epilépticas (Fritsch y Hitzig, 1870). Esto permitió que Victor Horsley y J.H.Jackson realizaran en 1886 la primera cirugía de epilepsia en un paciente con un tuberculoma a nivel cortical, liberándolo de las crisis epilépticas (Horsley, 1886). Tales hallazgos derivarían en la concepción de una definición aplicable a todo el espectro del fenómeno epiléptico y que aún sigue vigente: La epilepsia es una condición en la cual se producen descargas neuronales súbitas, excesivas y transitorias, las cuales inician y se propagan a partir de algún sitio de la corteza o sustancia gris (Jackson, 1932).

Actualmente, la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud definen a la epilepsia como un trastorno cerebral crónico, caracterizado por la predisposición de padecer crisis epilépticas espontáneas y recurrentes. Dichas CEER son secundarias a descargas neuronales anormalmente excesivas y sincrónicas cuyo origen puede estar limitado a una sola región cerebral o provenir de diferentes sitios cerebrales (Fisher y cols., 2005; Organización Mundial de la Salud, 2019). De esta forma, los distintos grupos neuronales y redes implicadas serán los que determinen una vasta gama de presentaciones semiológicas de crisis epilépticas, con múltiples etiologías y distintas fisiopatologías (Lowenstein, 2015). Es importante resaltar que, aunque las CEER son la característica clínica más evidente de este trastorno, también existen una variedad de afectaciones neurobiológicas, cognoscitivas, psicológicas y sociales, que le son concomitantes (Fisher y cols., 2005).

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

Con base en distintos estudios epidemiológicos se estima que entre 50 y 65 millones de personas viven con epilepsia a nivel mundial (Ngugi y cols., 2010; Organización Mundial de la Salud, 2019). Alrededor del 80% residen en países en desarrollo y la proporción de individuos sin un tratamiento efectivo es muy alta (Meinardi y cols., 2001; Organización Mundial de la Salud, 2019). Problemas como la distribución etaria de pacientes epilépticos entre poblaciones, el difícil acceso a sistemas de salud, el estigma social, la presencia de enfermedades parasitarias endémicas y la diversidad de metodologías implementadas para la identificación de casos, han generado grandes discrepancias entre estudios (Sander, 2003; Banerjee y Hauser, 2009). El dato alarmante proviene de la Organización Mundial de la Salud (2016) al señalar que cada año se agregan 2 millones de nuevos casos en el mundo (De Boer y Sander, 2007; Banerjee y cols., 2009; Thurman y cols., 2011, Moshé y cols., 2015). Además, es importante resaltar que la curva de incidencia ajustada a la edad, presenta un comportamiento bimodal. Esto es, un pico en la infancia temprana (generalmente relacionado a condiciones congénitas, perinatales y del desarrollo) y otro en la séptima década de vida (éste generalmente asociado a enfermedades cerebrovasculares y demencias) (Hauser y Kurland, 1993; Forsgren y cols., 1996; Olafsson y cols., 2005).

En México se han llevado a cabo diversos estudios epidemiológicos que han dado como resultado una prevalencia (número de casos activos, es decir, pacientes que hayan sufrido una crisis epiléptica en los últimos 5 años y/o se encuentren bajo tratamiento) de 15 casos por cada 1000 habitantes. Este dato se aproxima mucho a las cifras reportadas en América Latina y el Caribe, pero dista mucho de los 4/1000 que reportan los países desarrollados (De Boer y cols., 2007; Organización Panamericana de la Salud, 2013; Moshé y cols., 2015; Rubio y cols., 2016). A nivel mundial, no hay evidencia de que exista predominio hacia algún sexo o alguna raza. Aunque sí hay mayor incidencia en poblaciones con un estado socioeconómico bajo (De Boer y cols., 2007; Banerjee y cols., 2009).

Trastornos neurológicos tales como la depresión, la ansiedad y la psicosis, provocan que los pacientes epilépticos presenten índices de mortalidad elevados. Dicha tasa puede llegar a quintuplicarse debido a la susceptibilidad que tienen estos pacientes a sufrir eventualidades

como traumatismos, muerte súbita, *status epilepticus* y suicidio (Gaitatzis y Sander, 2004; Neligan y cols., 2010; Nashef y cols., 2012; Fazel y cols., 2013).

2.3. CLASIFICACIÓN DE LA CRISIS EPILÉPTICAS Y LAS EPILEPSIAS

Los sistemas de clasificación en epilepsia se erigen a partir de constructos complejos, resultantes de los últimos avances en investigación básica y clínica. Por ello, son considerados como un arreglo dinámico. El marco actual de clasificación se basa en un sistema multinivel donde en cada peldaño se consolidan distintos grados de integración diagnóstica, dependientes de los recursos informativos y diagnósticos con los que se cuenten (Sheffer y cols., 2017; Brodie y cols., 2018).

En el primer nivel se debe discernir el tipo de crisis epiléptica (definida como la aparición transitoria de signos y/o síntomas, secundarios a una actividad neuronal excesiva y sincrónica) (Fisher y cols., 2005). De acuerdo al sitio de origen de la actividad epiléptica, las crisis pueden tener un inicio focal, generalizado o desconocido. Aquéllas de inicio focal se originan en una red neuronal limitada y circunscrita a un hemisferio cerebral, o bien, con una distribución más amplia, pero dentro del mismo hemisferio (Berg y cols., 2010). El nivel de conciencia durante la crisis focal también permite subclasificarlas en crisis con conciencia preservada o alterada. Asimismo, la naturaleza del signo o síntoma al comienzo de la crisis (motor o no motor), también puede ser implementado para caracterizar una crisis focal (Fisher y cols., 2017). Finalmente, aquellas crisis focales capaces de propagarse hacia el hemisferio contralateral se denominan crisis focales con evolución a bilateral tónica-clónica. Ahora bien, en el caso de las crisis generalizadas, éstas se originan en algún punto capaz de conectar redes neuronales de forma rápida e inmediata en ambos hemisferios cerebrales (Berg y cols., 2010). Debido a que la mayoría de las crisis generalizadas cursan con estados de conciencia alterados, éstas únicamente se subclasifican en motoras y no motoras (Fisher y cols., 2017). Subdividiéndose las motoras en tónicas, clónicas, tónico-clónicas, mioclónicas, atónicas, mioclónicas-atónicas, mioclónicas-tónicas-clónicas y espasmos epilépticos. Mientras que las no motoras están representadas por las crisis de ausencia y sus variedades (ILAE, 1981; Fisher y cols., 2017). Aquellos casos donde se desconoce el sitio de origen de la actividad epiléptica, la crisis es denominada como de inicio desconocido; éste

será un nivel de clasificación temporal hasta la recopilación de nuevos elementos diagnósticos (Fisher y cols., 2017).

En el segundo nivel se identifica el tipo de epilepsia, el cual será definido con base en la variedad de crisis prevalente. Por ello, las epilepsias se dividen en focales, generalizadas, focales que evolucionan a generalizadas, y de origen desconocido (Sheffer y cols., 2017; Brodie y cols., 2018). En esta etapa se debe integrar el diagnóstico de epilepsia, el cual requiere la ocurrencia de al menos dos crisis espaciadas por un intervalo mínimo de 24 horas, o de la ocurrencia de una única crisis ligada a un alto riesgo de una segunda crisis, o de la identificación de un síndrome epiléptico (Fisher y cols., 2014).

El tercer nivel se reserva a los síndromes epilépticos. Éstos hacen alusión a un conjunto de características clínicas, electroencefalográficas, imagenológicas y genéticas que concurren simultáneamente y constituyen un patrón común e identificable (ILAE, 1985; Sheffer y cols., 2017; Brodie y cols., 2018).

En cada etapa clasificatoria es imperativo emprender la búsqueda etiológica de la epilepsia. Por ello, con base en la etiología, la epilepsia puede ser identificada como secundaria a alteraciones estructurales, genéticas, infecciosas, metabólicas, inmunológicas o desconocidas. De igual forma, se fomenta la pesquisa de comorbilidades para una mejor tipificación de la epilepsia (Sheffer y cols., 2017; Brodie y cols., 2018).

2.4. NEUROBIOLOGIA DE LA EPILEPSIA

La excitabilidad es una propiedad funcional de las neuronas que les permite generar respuestas eléctricas ante los estímulos que reciben. Dicha excitabilidad depende de un gradiente electroquímico de iones, provisto por la capacidad de transporte activo de la membrana neuronal y la acción reguladora de las células gliales (Scharfman, 2007). De esta forma, las neuronas se mantienen cargadas negativamente, con respecto al exterior, y presentan un potencial de reposo que puede oscilar hacia tendencias positivas (despolarización) o negativas (hiperpolarización) vía innumerables interacciones neurotransmisor-receptor (Llinas, 1988). En condiciones normales, cuando los estímulos

excitadores reducen el potencial de reposo hasta un valor umbral, canales sensibles a voltaje van a permitir la entrada de iones sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) a la célula, invirtiendo temporalmente la polaridad membranal. Milisegundos después, los canales de Na^+ y Ca^{2+} se cerrarán, mientras que los de potasio (K^+) se abrirán, favoreciéndose la salida de los iones K^+ hacia el espacio extracelular y permitiendo restaurar el potencial de membrana hacia el potencial en reposo (repolarización) o más allá de éste (hiperpolarización) (Zhang y McBain, 1995). Todos estos movimientos iónicos bidireccionales constituyen lo que se conoce como potencial de acción o descarga neuronal (Llinas, 1988; Bean, 2007), el cual es capaz de propagarse a partir del cono axónico hacia neuronas vecinas, favoreciendo la liberación de neurotransmisores en las hendiduras sinápticas (Stuart y cols., 1997). Sin embargo, ciertas perturbaciones en dicho ambiente iónico se han asociado a estados de hiperexcitabilidad, los cuales llegan a favorecer la actividad epiléptica (Chamberlin y cols., 1990; Kullmann, 2002; Somjen, 2002; Vaillend y cols., 2002).

El desbalance entre la neurotransmisión excitadora e inhibitora ha sido señalado como uno de los mecanismos esenciales de la ictogénesis (proceso a través del cual se inicia una crisis epiléptica) (Bradford, 1995; Scharfman, 2007; Jefferys, 2010; Staley, 2015). Aseveración sustentada a partir de estudios de microdiálisis realizados en el foco epiléptico de pacientes con ELT fármacorresistente, los cuales no sólo han reportado niveles extracelulares elevados de glutamato y niveles extracelulares disminuidos del ácido gamma-amino butírico (GABA) durante el período ictal, sino también durante el período interictal (Carlson y cols., 1992; During y Spencer, 1993; Cavus y cols., 2005). Resultados similares se obtuvieron a partir de un modelo de epilepsia adquirida (Luna-Munguia y cols., 2011). Lo anterior indica que las concentraciones extracelulares de glutamato permanecen constantemente elevadas entre crisis y crisis, situación que al paso del tiempo podría generar excitotoxicidad (Ankarcrona y cols., 1995; Dong y cols., 2009). Este incremento sostenido sugiere, entre otras cosas, fallas en la expresión o funcionamiento de los transportadores de glutamato en el cerebro epiléptico (Proper y cols., 2002; van der Hel y cols., 2005).

Estudios realizados en el tejido epiléptico resecaado de pacientes sometidos a cirugía sugieren un ciclo glutamato-glutamina aberrante pues enzimas como la glutamina sintetasa presentan

una reducción en la expresión dependiente del grado de muerte neuronal, lo cual podría provocar una disminución en la recaptura de glutamato y una subsecuente elevación de sus niveles extracelulares (Proper y cols., 2002; Eid y cols., 2004; van der Hel y cols., 2005). Además, los resultados obtenidos a partir de estudios autorradiográficos, inmunocitoquímicos y de hibridación *in situ*, han sugerido que las CEER pudieran incidir directamente tanto en la densidad de receptores NMDA, AMPA y kainato, así como en ciertos cambios conformacionales que pudieran sufrir dichos receptores (Mathern y cols., 1998a, 1998b). Con respecto a los receptores glutamatérgicos metabotrópicos, algunos trabajos han reportado incrementos focalizados de mGluR1 (receptor metabotrópico para glutamato 1, por sus siglas en inglés) en el giro dentado de roedores y humanos epilépticos (Blümcke y cols., 2000). Mientras que, la expresión de receptores mGluR2, 3, 4 y 8 en astrocitos se ha asociado a gliosis y neurodegeneración por actividad epiléptica recurrente (Tang y Lee, 2001). Estos factores pudieran jugar un rol importante en la modulación de la actividad epiléptica (Arvanov y cols., 1995; McBain, 1995).

Como se mencionó anteriormente, la otra parte del desbalance involucra la ausencia o decremento significativo del GABA (principal neurotransmisor inhibitor del Sistema Nervioso Central); falla también descrita como antecesora del desarrollo de descargas epilépticas (Morimoto y cols., 2004; MacDonald y Mody, 2008). A la fecha se desconocen los mecanismos que conllevan a tal disminución. Sin embargo, se han propuesto diversas causas, como: 1) Desensibilización de receptores GABAérgicos a nivel pre- y post-sináptico (Kamphius y cols., 1991; Asproдини y cols., 1992), 2) Alteraciones en las conductancias de iones Cloro (Cl⁻), derivadas de su redistribución y pérdida de gradiente iónico (MacDonald y Mody, 2008) y 3) Liberación anómala del GABA, independiente o no, de una retroalimentación inhibitoria mediada por autorreceptores pre-sinápticos GABA_B (Mott y cols., 1993).

Similar a lo que ocurre con el glutamato, los niveles sinápticos del GABA son regulados mediante simportadores GABA-Na⁺ neuronales y gliales (GAT-1 a 4, por sus siglas en inglés), los cuales se encargan de mediar la recaptura del GABA con el fin de continuar las

rutas catabólicas de dicho neurotransmisor (Richerson y Wu, 2004; MacDonald y Mody, 2008). La particularidad de estos transportadores radica en poseer una propiedad de transporte reverso, la cual les permite incrementar los niveles extracelulares del GABA ante situaciones ictogénicas tales como las descargas excesivas o el incremento de los niveles de K^+ extracelular. Sin embargo, tanto a nivel clínico como experimental, se ha reportado la afección de dicha propiedad neuroprotectora, provocando una falla en la liberación del GABA no vesicular (During y cols., 1995; Richerson y Wu, 2004). Además, los sujetos presentan alteraciones tanto en la liberación como en la recaptura del GABA debido a una expresión aberrante de GAT1 y GAT3 en diversas subregiones hipocampales (Mathern y cols., 1999).

Actualmente se sabe que las alteraciones en las propiedades intrínsecas de las neuronas, la perturbación del ambiente iónico y el desbalance entre la neurotransmisión excitadora e inhibitoria, son características imprescindibles de la ictogénesis. Sin embargo, no son suficientes para explicar la naturaleza crónica y recidivante de las CEER. Para ello, se desarrolló el concepto de epileptogénesis, el cual se encarga de describir los procesos patológicos continuos y progresivos requeridos para que una red neuronal incremente su excitabilidad y, en consecuencia, su susceptibilidad para presentar actividad epiléptica recurrente hasta lograr el establecimiento de la enfermedad (Pitkänen y Lukasiuk, 2011; Pitkänen y cols., 2015). Los 3 procesos consecutivos que integran la epileptogénesis se muestran en la Figura 1 (Arzimanoglou y cols., 2002; Pitkänen y cols., 2015). Éstos son:

A) Insulto cerebral inicial.

Evento lesionante que facilita el desencadenamiento de los procesos epileptogénicos (Hauser, 2008; Verhaert y Scott, 2010). Los más frecuentes son: traumatismos craneoencefálicos, enfermedad vascular cerebral, infecciones y neoplasias cerebrales, crisis febriles y ciertas condiciones sistémicas tales como el síndrome de abstinencia y la eclampsia (Hauser, 2008).

B) Fase latente.

Período de tiempo entre el insulto cerebral inicial y la aparición de la primera CEER (Pitkänen y cols., 2015). Aquí se inician los cambios moleculares, celulares y de redes neuronales que provocarán la generación de CEER (Pitkänen y Lukasiuk, 2009). Esta fase puede durar meses o años y su estudio en humanos es complicado (Bragin y cols., 2000; Dudek y Staley, 2011). Por ello, la importancia de los modelos animales de epilepsia que semejan esta situación (Morimoto y cols., 2004; Pitkänen y Lukasiuk, 2009). Dentro de las alteraciones epileptogénicas más reportadas está el daño axonal (Coleman y Perry, 2002), la gliosis (Jørgensen y cols., 1993; Itoh y cols., 2007), las alteraciones en las vainas de mielina (Coleman y Perry, 2002), la ruptura de la barrera hematoencefálica y la consecuente angiogénesis (Marchi y cols., 2007a; Rigau y cols., 2007), la infiltración de células inflamatorias (Vezzani y cols., 2011), la neurodegeneración por muerte neuronal (Cavazos y cols., 1994), los brotes axonales (Nadler, 2003; Cavazos y cols., 2004; Sloviter y cols., 2006), la neurogénesis (Parent y cols., 1997), la remodelación dendrítica (Isokawa, 2000), los cambios en la composición de la matriz extracelular (Dityatev y Fellin, 2008) y los trastornos de la función intrínseca neuronal (Ellerkmann y cols., 2003), entre otros.

C) Fase crónica o epilepsia *per se*.

En conjunto, los cambios progresivos observados durante la fase de latencia, desencadenarán una reorganización sináptica aberrante (Sutula y cols., 1988), procesos plásticos de depresión y/o facilitación de sinapsis excitadoras y/o inhibitoras sobre distintos blancos post-sinápticos (Le Douigou y cols., 2011; Mendez y Bacci, 2011), aparición de redes excitadoras recurrentes y la consolidación de un circuito neuronal hiperexcitable capaz de generar CEER (Bragin y cols., 2000; Lillis y cols., 2015). Es importante resaltar que los cambios epileptogénicos no culminan con la aparición de la primera CEER y el subsecuente diagnóstico de la epilepsia. Éstos progresarán y habrá un incremento en la frecuencia y severidad de las CEER a lo largo del tiempo (Dudek y Staley, 2011).

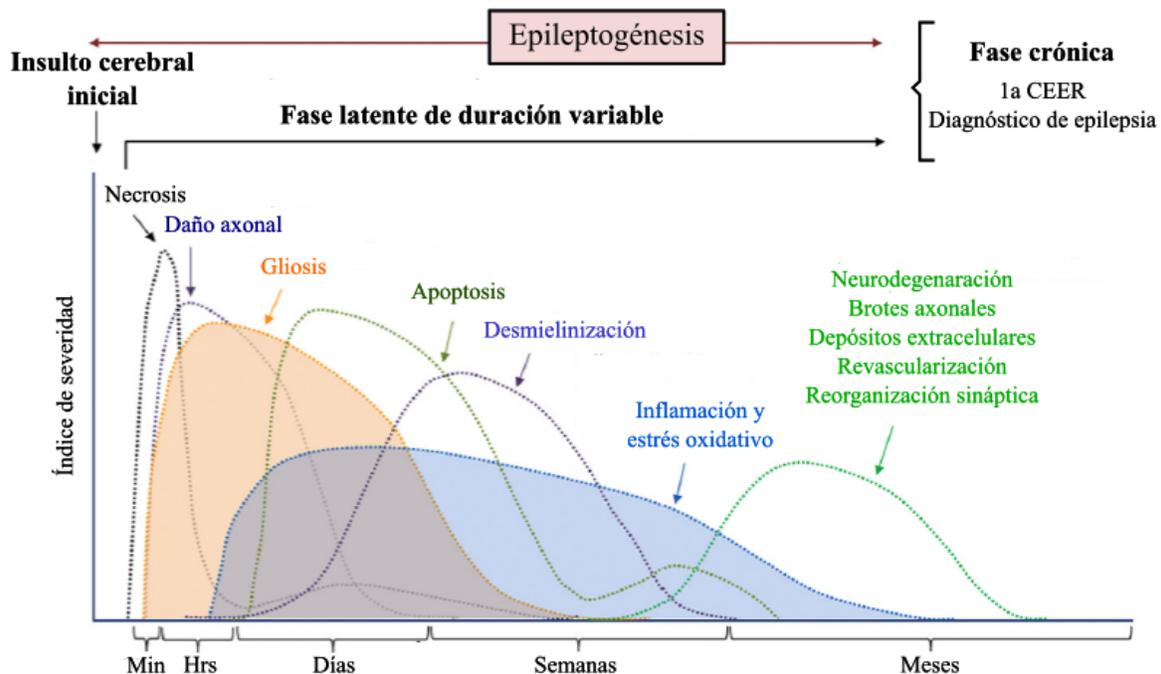


Figura 1. Curso temporal de la epileptogénesis. En la gráfica se muestran los distintos mecanismos fisiopatológicos que caracterizan la epileptogénesis y su relación temporal con los 3 eventos principales que demarcan la epileptogénesis (Insulto cerebral, fase latente y fase crónica). Modificado de Pitkänen y cols., 2019.

2.5. SISTEMA LÍMBICO EN CONDICIONES NORMALES Y PATOLÓGICAS

La necesidad de conocer la anatomía y conectividad del sistema límbico en condiciones normales resulta primordial pues la naturaleza de la ELT es esencialmente estructural.

2.5.1. ANATOMÍA

El sistema límbico hace referencia a un conjunto de estructuras corticales y subcorticales ubicadas en el borde medial (el limbo) de cada hemisferio cerebral y que rodean a manera de anillo al diencéfalo. Dichas estructuras, según Broca (1878), Papez (1937) y Maclean (1952), son: la formación hipocampal, el área subcallosa, el giro cingular, el giro parahipocampal, el uncus, los núcleos septales, el núcleo accumbens, el complejo amigdalino, el tálamo anterior, los tubérculos mamilares, las formaciones olfatorias, la corteza órbito-frontal y todos aquellos fascículos de sustancia blanca que interconectan estas estructuras entre ambos hemisferios (Figura 2) (Chronister y Hardy, 2003; Amaral y Lavenex, 2007; McIntyre y Schwartzkroin, 2008). Dada la complejidad y extensión que involucraría describir el sistema

límbico en su totalidad, a continuación, sólo se describirán brevemente aquellas estructuras de interés para este trabajo de tesis.

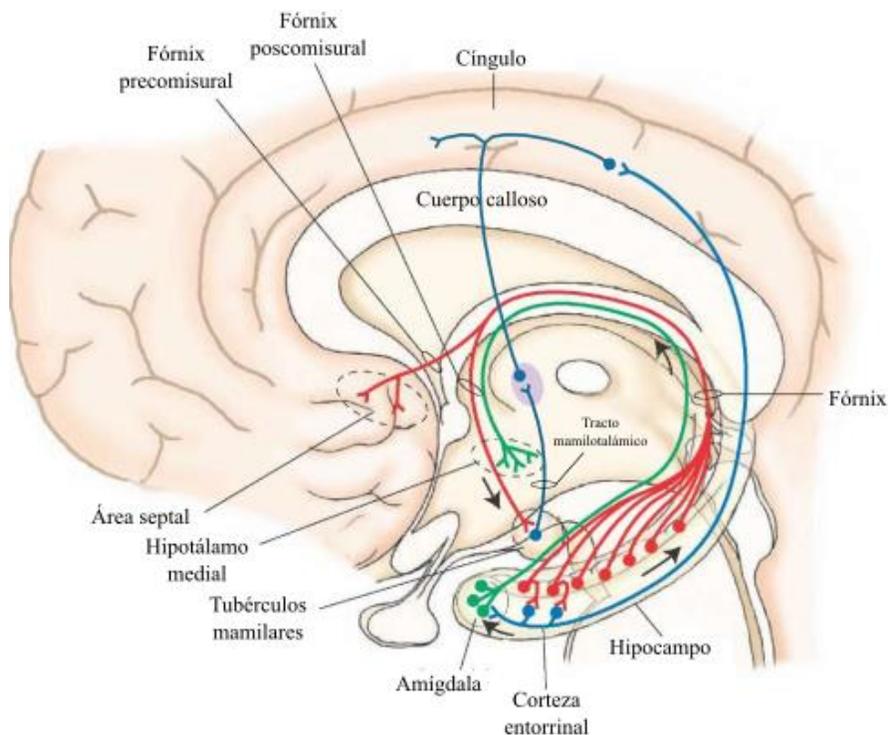


Figura 2. Estructuras corticales y subcorticales mesiales del sistema límbico vistas desde una perspectiva sagital en el encéfalo humano. En el dibujo se muestran el circuito de Papez, que se inicia en la corteza entorrinal y continúa con las eferencias hipocámpales que viajan a través del fórnix (líneas rojas) hasta los tubérculos mamilares. Ahí surge el fascículo mamilotalámico y después de llegar al tálamo anterior, asciende hasta el giro cingular donde el cíngulo completa el circuito llegando de regreso a la corteza entorrinal (Líneas azules). Igualmente, se muestra la estría terminal que conecta la amígdala con el hipotálamo (Líneas verdes). Modificado de Chronister y Hardy, 2003.

La formación hipocámpal es un complejo de estructuras paleocorticales y arquicorticales contiguas donde las paleocortezas (corteza entorrinal del giro parahipocámpal y el subículo y sus subdivisiones) se encargan de canalizar la información aferente de las áreas somatosensoriales y asociativas neocorticales hacia las regiones arquicorticales (hipocampo y giro dentado) (Figura 3).

El hipocampo es una prominencia de sustancia gris ubicada en el piso del ventrículo lateral. Desde un punto de vista coronal, éste representa la continuación de la corteza entorrinal que

se enrolla medialmente dentro del lóbulo temporal. Esta disposición motivó a De Garengeot (1742) a compararlo con un cuerno de carnero y denominarlo *cornus ammonis* (CA) (asta de Amón, en español). Siendo Lorente de Nó (1934) quien nombrara como CA1, CA2, CA3 y CA4 a cada una de las subáreas en que se divide al hipocampo. Actualmente se sabe que el *cornus ammonis* es una estructura laminar dividida en 6 estratos:

1) y 2) *Stratum moleculare* y *stratum lacunosum*. Son los estratos más superficiales. Aquí, las fibras aferentes de la vía perforante y las fibras colaterales de Schaffer hacen sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas piramidales.

3) *Stratum radiatum*. Éste contiene interneuronas, dendritas apicales piramidales, fibras aferentes septales, comisurales y colaterales de Schaffer.

4) *Stratum lucidum*. Presente únicamente en la sub-región CA3. Contiene las sinapsis de las fibras musgosas provenientes del giro dentado.

5) *Stratum pyramidale*. Aquí residen distintos tipos de interneuronas y los somas de las neuronas principales del hipocampo, las neuronas piramidales.

6) *Stratum oriens*. Por aquí transitan los axones de las neuronas piramidales y se extienden sus dendritas basales, las cuales reciben aferencias de fibras septales, comisurales y colaterales de Schaffer. También se encuentran varias poblaciones de interneuronas.

Finalmente, la agrupación de los axones mielinizados que surgen de las neuronas piramidales y del subículo, forman una capa de sustancia blanca en el plano más profundo y colindante a los ventrículos laterales. Dicha capa se denomina álveo, la cual continúa con la fimbria y el fórnix.

El giro dentado tiene una íntima relación anatómica con el *cornus ammonis* y se organiza en 3 capas:

1) Capa molecular. La más externa y prácticamente acelular. Está constituida por las dendritas apicales de neuronas granulares, en canasta y polimórficas, así como por axones provenientes de la vía perforante.

2) Capa granular. Constituida por los somas de las neuronas granulares. Dichas neuronas emiten axones que inervan las células musgosas de la capa multiforme y la sub-región CA3.

3) Capa multiforme o región hilar o sub-región CA4. Se encuentra delimitada por la *fascia dentata*, que es una estructura en forma de “V” conformada por la agrupación de la capa molecular y granular. En ésta residen las células musgosas, que reciben información de las fibras musgosas y varias poblaciones de interneuronas.

Actualmente se sabe que el hipocampo participa en la modulación de la memoria semántica, episódica y espacial, el aprendizaje, la navegación espacial, el comportamiento emocional y algunas funciones hipotalámicas (Anand y Dikhav, 2012). El sustento de dicha polifuncionalidad se basa en la capacidad que tiene el hipocampo para establecer conexiones plásticas con regiones intra- y extra-límbicas. Sin embargo, esta misma capacidad de neurogénesis y plasticidad es la que llega a provocar que el hipocampo esté implicado en el proceso epileptogénico (Scharfman, 2002).

2.5.2. CONECTIVIDAD DEL SISTEMA LÍMBICO

El circuito de Papez es uno de los múltiples circuitos que conectan al sistema límbico entre sí y con regiones extra-límbicas. Este circuito comienza en el hipocampo y recibe aferencias de la corteza entorrinal a través de la vía perforante. Los axones de la vía perforante atraviesan el subículo y llegan hasta el giro dentado y *cornus ammonis*. De esta forma, las proyecciones del hipocampo y del subículo se juntan en la fimbria y viajan a través del fórnix hasta los tubérculos mamilares, los cuales se comunican con los núcleos anteriores del tálamo vía el tracto mamilotalámico. A partir de estos núcleos, las fibras tálamo-corticales ascienden por la cápsula interna hasta llegar a la corteza del giro cingular. Finalmente, el circuito continúa bajo el giro cingular, llegando hasta la corteza entorrinal del giro parahipocampal; completándose así el circuito (Figura 2). Aunque la descripción de este circuito pareciera

cerrada y unidireccional, éste presenta conexiones extrínsecas y bidireccionales. Estudios tanto clínicos como experimentales han reportado alteraciones específicas de este circuito (fórnix y cíngulo) en sujetos con ELT. En este sentido, es importante mencionar que además del circuito de Papez, existen otras dos rutas intrahipocampales que juegan un rol importante en la fisiopatología de la ELT. Dichas rutas son:

I) La ruta polisináptica. Esta ruta es unidireccional. Inicia en corteza entorrinal, donde surgen fibras que conforman la vía perforante, la cual atraviesa el subículo y llega al giro dentado. En esta ruta, las fibras excitadoras entorrinales contactan a las neuronas granulares, cuyos axones (fibras musgosas) se encargan de alcanzar a las células musgosas y a las neuronas piramidales de CA3. Estas últimas emiten axones que siguen la ruta de la fimbria-fórnix y también dan origen a las colaterales de Schaffer (encargadas de inervar a las neuronas piramidales de CA1). Finalmente, estas neuronas piramidales de CA1 proyectan al subículo y junto con las neuronas del subículo, a la corteza entorrinal, formando así el fascículo angular (Amaral y Lavenex, 2007; Anand y Dhikav, 2012) (Figura 3).

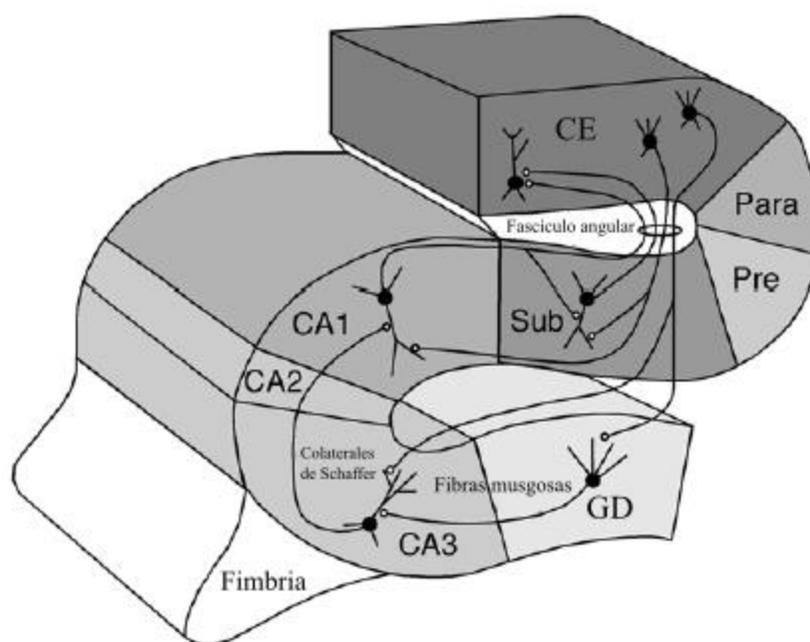


Figura 3. La formación hipocampal. En la imagen se muestran los circuitos intrahipocampales que forman la ruta polisináptica. CE: Corteza entorrinal, Sub: Subículo, Para: Parasubículo, Pre: Presubículo, GD: Giro dentado. Modificado de Amaral y Lavenex, 2007.

II) La ruta directa. Esta ruta se origina en la corteza perirrinal y en la corteza entorrinal, conectándose con las neuronas piramidales de CA1 sin la necesidad de recurrir a la vía perforante. En esta ruta, los axones de las neuronas de CA1 llegan al subículo, surgiendo proyecciones que se dirigirán hacia el álveo o de vuelta a la corteza entorrinal. A partir de este punto, la información es dirigida hacia la corteza temporal inferior y hacia la corteza prefrontal (Amaral y Lavenex, 2007; Anand y Dhikav, 2012).

En condiciones normales, el fórnix es una estructura de sustancia blanca constituida por axones mielinizados y no mielinizados. Dicha estructura semeja una bóveda de 4 columnas, ubicada sobre la cavidad del tercer ventrículo. Cada columna posterior emerge de la fimbria ipsilateral, asciende, y traza una curva cóncava que se reúne con la columna contralateral para formar el cuerpo del fórnix. El cuerpo del fórnix sigue un curso subcalloso y en su porción anterior, se curva y bifurca, formando las columnas anteriores. A nivel de la comisura anterior, cada columna anterior se divide en dos porciones, la precomisural y la poscomisural, las cuales se dirigen hacia los núcleos septales y hacia los tubérculos mamilares, respectivamente (Chronister y Hardy, 2003; Latarjet y Ruiz Liard, 2004). En humanos, las fibras que constituyen al fórnix son bidireccionales y $\frac{2}{3}$ de ellas siguen un camino precomisural. El tercio restante alcanza los tubérculos mamilares (Daitz, 1953; Powell y cols., 1957). Finalmente, es importante resaltar que la mayoría de estas fibras son asociativas. Sin embargo, por el fórnix también transitan fibras comisurales que comunican regiones homólogas tanto del hipocampo como del parahipocampo (Gloor y cols., 1993) (Figura 4).

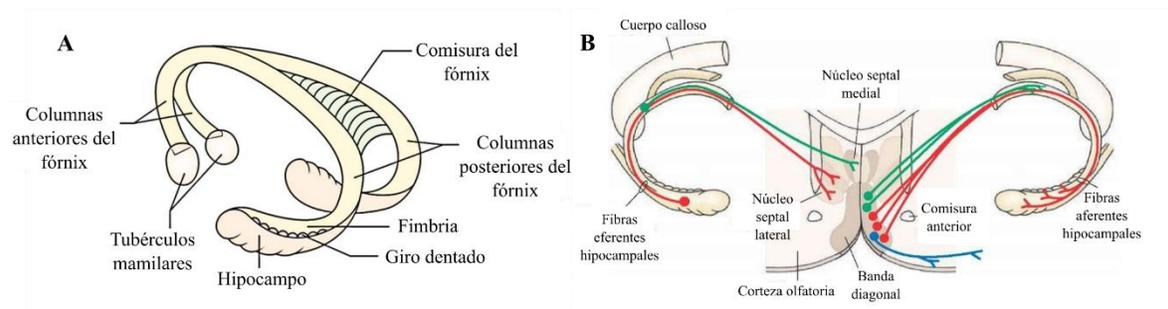


Figura 4. Sistema fimbria-fórnix y vías septo-hipocampales. (A) Dibujo de la estructura macroscópica del sistema fimbria-fórnix mostrado desde una perspectiva oblicua caudo-rostral. (B)

Vías septohipocampales mostradas en una perspectiva coronal, donde se resaltan las fibras aferentes y eferentes que comunican el hipocampo con el área septal (líneas rojas y verdes).

El fórnix es la principal ruta eferencial del hipocampo. Las fibras eferentes glutamatérgicas que se originan de neuronas piramidales de CA1, CA3 y del subículo, se desplazan por la vía precomisural y su destino es el núcleo septal lateral (NSL) (Swanson y Cowan, 1977; Swanson y Cowan, 1979; Stevens y Cotman, 1986; Gaykema y cols., 1991; Dutar y cols., 1995; Amaral y Lavenex, 2007). Dicho núcleo emite proyecciones GABAérgicas al complejo del Núcleo Septal Medial y la Banda Diagonal (NSMBD), el cual está constituido por una población heterogénea de neuronas GABAérgicas, colinérgicas y glutamatérgicas (Swanson y Cowan, 1979; Gaykema, 1991; Sotty y cols., 2003; Colom y cols., 2005, 2006; Kitchigina y cols., 2013; Unal y cols., 2015). Las proyecciones de dicho complejo constituyen las principales aferencias que viajan a través del sistema fimbria-fórnix, la estría supracallosa y una vía amigdalina, hacia la formación hipocampal (Amaral y Kurz, 1985; Unal y cols., 2015). Es importante resaltar que las conexiones entre el complejo NSMBD y la formación hipocampal son recíprocas pues (Figura 5):

A) El complejo es inervado por fibras colaterales de neuronas no piramidales ubicadas en el *stratum oriens* de CA1 y CA3 (Gaykema, 1991; Colom y cols., 2006) y estas conectan principalmente con neuronas septales GABAérgicas y en menor grado, colinérgicas (Tóth, Borhegyi, y Freund, 1993).

B) Del complejo surgen fibras colinérgicas que hacen sinapsis con neuronas piramidales e interneuronas de CA1 y CA3 (Amaral y Kurz, 1985; Frotscher y Léránth, 1985) y con células musgosas y granulares del giro dentado (Lübke y cols., 1997; Amaral y Lavenex, 2007). Así como, fibras eferentes GABAérgicas que se conectan exclusivamente con interneuronas hipocampales (Freund y Antal, 1988) y finalmente, fibras glutamatérgicas que establecen conexiones con neuronas piramidales de CA3 (Colom y cols., 2005; Huh y cols., 2010).

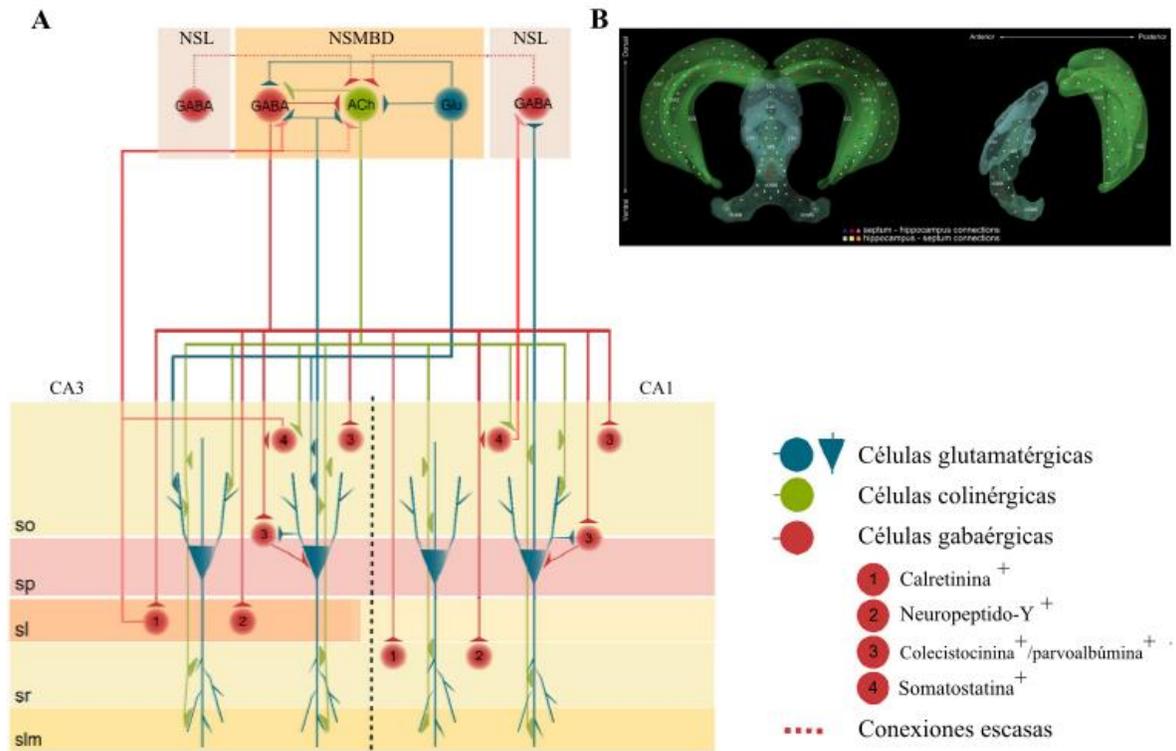


Figura 5. Representación esquemática de las conexiones septohipocampales. (A) Neuronas de diferente naturaleza neuroquímica conectando de forma recíproca las áreas CA3 y CA1 hipocámpales, con el núcleo septal lateral (NSL) y el complejo núcleo septal medial banda diagonal (NSMBD). (B) Reconstrucción tridimensional del hipocampo de rata (verde) y el área septal (ázul), desde una perspectiva coronal caudorostral (izquierda) y desde una perspectiva sagital (derecha). Modificado de Teles-Grilo y Mellor, 2013.

En conjunto, todas estas conexiones establecen las vías septo-hipocámpales, las cuales tienen como principal objetivo el generar y mantener la actividad eléctrica hipocámpal conocida como ritmo theta (Lee y cols., 1994; Buzsáki y cols., 2002; Unal y cols., 2015).

2.5.3. EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL

La ELT es la forma más frecuente de epilepsia con crisis focales secundaria a una etiología estructural. En ella, las CEER se pueden originar a partir de las estructuras límbicas temporales, o bien, las crisis se propagan hacia las regiones límbicas, provenientes de regiones extra-temporales (Engel, 1996; Engel y cols., 2008; Blair, 2012). Inicialmente, estas crisis suelen responder a tratamientos farmacológicos. Sin embargo, 30% de los pacientes

con ELT llegan a desarrollar farmacoresistencia (Löscher, 2005; Löscher y Schmidt, 2011). Actualmente se conocen dos tipos de ELT:

A) ELT mesial. Corresponde al 80% de todos los casos. Aquí, las CEER involucran regiones como la formación hipocampal, la circunvolución parahipocampal y la amígdala

B) ELT lateral. Aquí, el origen de las CEER es la neocorteza temporal (ILAE, 1985; Engel, 1996).

Además, resalta el hecho de que un elevado porcentaje de los pacientes con ELT mesial reportan haber sufrido crisis febriles o algún otro insulto cerebral durante sus primeros cinco años de vida, seguido de un período de latencia de meses o años y finalmente, la aparición de CEER durante la adolescencia o adultez temprana (Mathern y cols., 1995).

Clínicamente, las CEER límbicas suelen presentarse como crisis focales (con conciencia preservada o alterada) que pocas veces llegan a convertirse en bilaterales. Las auras sensoriales o psíquicas son la modalidad de crisis focal con conciencia preservada más frecuente. Mientras que las crisis focales con conciencia alterada se manifiestan de la siguiente forma: 1) Fijación de la mirada y arresto conductual, 2) Actividad motora estereotipada e involuntaria (automatismos) y 3) Periodo postictal en el que hay confusión y amnesia (Fisher y Frost, 1991; Engel, 2001; Alarcón y Valentín, 2010; Blair, 2012).

Con respecto a las anomalías estructurales que se observan en la ELT, la más representativa es la esclerosis hipocampal. Dicha lesión se encuentra en un 33% de los pacientes que son sometidos a resección quirúrgica y su frecuencia de detección asciende hasta un 70% en casos de refractariedad al tratamiento con fármacos antiepilépticos (Bernasconi, 2006; Blümcke y Spreafico, 2012). La esclerosis hipocampal (EH) es caracterizada por una pérdida segmentaria de neuronas piramidales, acompañada de astrogliosis, en regiones como el prosúbicula, CA1 y CA4. Mientras que CA3 y CA2 muestran daño variable y mínimo, respectivamente. En el giro dentado, suele existir pérdida masiva de neuronas hilares asociada a la adopción de un patrón de dispersión de las neuronas granulares, lo cual provoca

que aumente el grosor y se difuminen los bordes de la capa granular (Sloviter, 1987; Houser, 1990; Bernasconi, 2006; Mathern y cols., 2008; Blümcke y Spreafico, 2012). La anterior descripción histopatológica se ajusta a la EH tipo 1a de la ILAE, subtipo más frecuente (60-80% de los casos). No obstante, se describen otros patrones de pérdida neuronal y gliosis, ya sea generalizada a todos los sectores CA1-4 (1b), restringida a CA1 (EH tipo 2) o a CA4 (EH tipo 3), e inclusive presencia exclusiva de gliosis sin muerte de neuronas piramidales (ausencia de EH) (Blümcke y cols., 2013; Coras y Blümcke, 2015; Gales y cols., 2017) (Figura 6). Este patrón restringido del daño permite diferenciar la esclerosis hipocámpal de otras patologías como las lesiones isquémicas o hipóxicas, donde el daño es usualmente más generalizado.

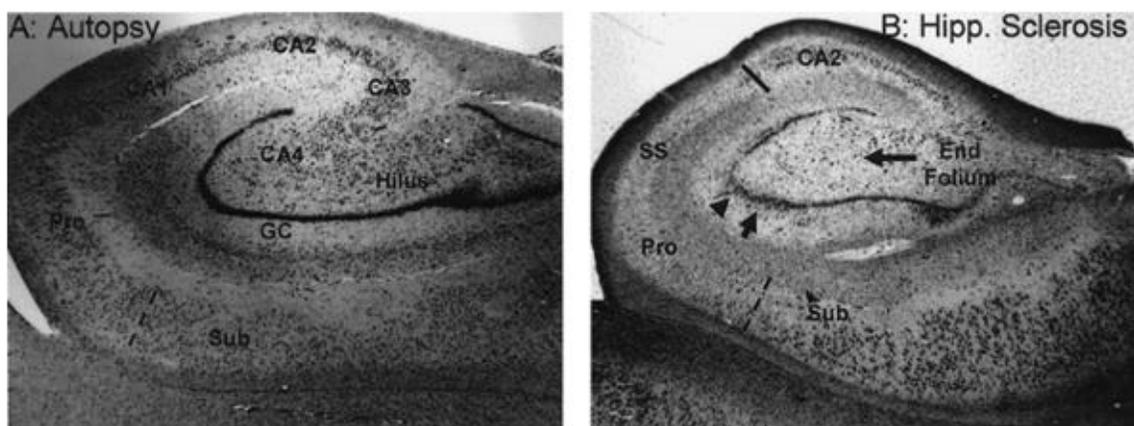


Figura 6. Cortes coronales donde la tinción de Nissl muestra la apariencia del hipocampo de un sujeto normal (pánel izquierdo) y la apariencia de un hipocampo esclerótico obtenido de un paciente con ELT (pánel derecho). La esclerosis hipocámpal se observa como un patrón de pérdida neuronal en pro-subículo y CA1 (sector de sommer) y a la región hilar o CA4 (esclerosis terminal). En CA2 el daño es mínimo; por ello es considerada como una zona resistente (Imagen tomada de Mathern y cols., 2008).

Finalmente, los cambios estructurales e histopatológicos antes descritos culminarán con cambios a nivel de conectividad (Curia y cols., 2014). En este sentido, la hipótesis de la célula en canasta durmiente describe aquellos cambios observados a nivel de giro dentado (Sloviter, 1991). Esta hipótesis afirma que la descarga excesiva y repetida de las neuronas granulares es capaz de destruir a las células musgosas, las cuales establecen contactos sinápticos excitadores sobre las interneuronas en canasta GABAérgicas. De esta forma, las

interneuronas en canasta perderán su impulso aferente excitador y no lograrán mantener la inhibición en el giro dentado (Sloviter, 1987, 1989, 1991). Algo muy similar ocurre cuando las neuronas piramidales de CA3 mueren y se provoca una disminución en el tono inhibitorio de las interneuronas en canasta de CA1, las cuales recibían estímulos excitatorios de dichas neuronas (Sloviter, 1991). Además, la pérdida de células musgosas y neuronas piramidales en CA3 condicionará que las neuronas granulares pierdan sus dianas sinápticas y en un intento por recuperar estas conexiones, se suscite el nacimiento de fibras musgosas aberrantes que formarán circuitos excitadores recurrentes (Kuo y cols., 2008) (Figura 7).

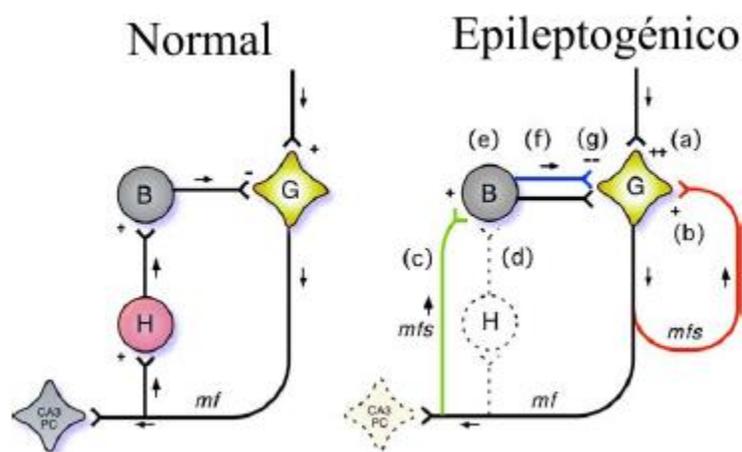


Figura 7. Esquema de una red normal (izquierda) y de distintos tipos de reorganización sináptica excitadora e inhibitoria (derecha) a nivel del giro dentado. La reorganización sináptica excitadora incluye (a) la potenciación glutamatergica y (b) el nacimiento de fibras musgosas que crean vías excitadoras recurrentes. La reorganización sináptica inhibitoria incluye (c) el nacimiento de fibras musgosas sobre interneuronas inhibitorias, (d) la pérdida de las aferencias excitadoras sobre las interneuronas inhibitorias, (e) la pérdida selectiva de interneuronas inmunoreactivas a somatostatina y reducción de la inhibición dendrítica, (f) los brotes axonales sobre interneuronas GABAérgicas o NPY, y (g) la reducción de las entradas inhibitorias sobre neuronas granulares.

G: neurona granular, B: célula en canasta, H: célula musgosa hilar, PC: célula piramidal, MFS: nacimiento de fibras musgosas. Imagen modificada de Morimoto y cols., 2004.

2.6. MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA Y CRISIS EPILÉPTICAS EN RATAS

Un modelo animal tiene como objetivo representar las características celulares, moleculares, clínicas y fisiopatológicas de una enfermedad específica (Curia y cols., 2008). Dichos modelos pueden ser:

I) Isomórficos. Cuando el modelo reproduce las características y los mecanismos patológicos, pero no la etiología de la enfermedad.

II) Predictivo. Cuando el modelo no se asemeja a la enfermedad como tal, pero permite evaluar respuestas a diversos tipos de manipulaciones y estímulos.

En el caso de la epilepsia, el desarrollo de modelos experimentales se ha basado principalmente en mimetizar las crisis epilépticas observadas en el humano. Sin embargo, es importante diferenciar los modelos de crisis epilépticas agudas, únicas e inducidas, de los verdaderos modelos de epilepsia que se caracterizan por la presentación CEER o crisis crónicas. Actualmente, existen distintas consideraciones que ayudan a clasificar a los modelos experimentales en el campo de la epilepsia (Löscher, 2011) (Figura 8). Éstas son:

1) La naturaleza del insulto cerebral inicial que desencadena de la actividad epiléptica (e.g. predisposición genética, alteraciones metabólicas, inducción química o eléctrica, *status epilepticus*, traumatismo).

2) La temporalidad de las crisis epilépticas (e.g. crisis agudas o aisladas, o crisis recurrentes o crónicas).

3) El sitio de origen y propagación de la actividad epiléptica a partir del foco inicial (e.g. límbicas, corticales, focales o generalizadas)

4) La asociación de las crisis con manifestaciones conductuales específicas (e.g. convulsivo o no convulsivo, clónicas o tónicas).

5) Los mecanismos fisiopatológicos asociados a ciertos tipos específicos de epilepsia.

6) Otros factores que permiten diferenciar a los modelos animales son la finalidad del mismo o sus aplicaciones y la existencia de umbrales para la aparición de las crisis.

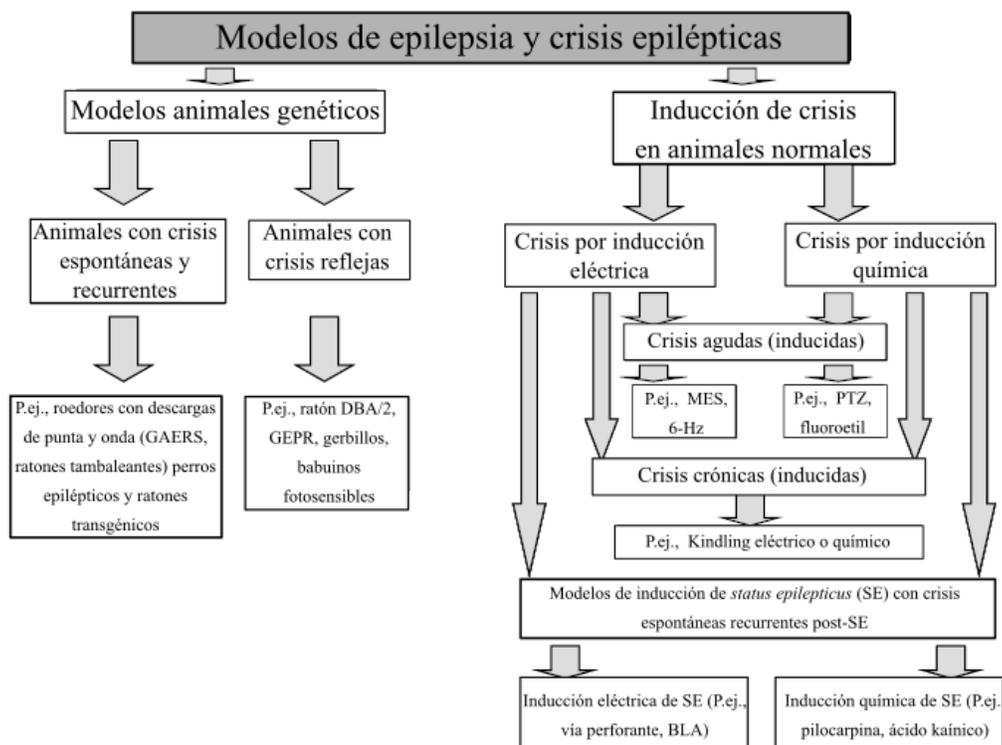


Figura 8. Diagrama que muestra los distintos tipos de modelos de epilepsia y crisis epilépticas. GAERS: por sus siglas en inglés, ratas genéticamente propensas a crisis de ausencia, GEPR: Ratas genéticamente propensas a epilepsia, MES: crisis de máximo electroshock, PTZ: Pentilentetrazol, BLA: Amígdala basolateral. Modificada de Löscher 2011.

2.6.1 MODELO DE PILOCARPINA

La pilocarpina es un alcaloide con acción colinérgica que actúa principalmente a nivel de los receptores muscarínicos M1 y M2 (Scorza y cols., 2009), desencadenando los siguientes efectos:

a) La unión al receptor M1 induce la activación de la fosfolipasa C y favorece la producción de diacilglicerol e inositol trifosfato. Esto provoca una modificación tanto de las

conductancias de Ca^{2+} como de K^+ , incrementando la excitabilidad (Segal, 1988). Dicho incremento es facilitado por la baja en la actividad de las ATPasas hipocampales, las cuales son incapaces de repolarizar la membrana neuronal y de exportar el exceso de Ca^{2+} intracelular (Fernandes y cols., 1996; Funke y cols., 2003). Estas concentraciones elevadas de Ca^{2+} promueven la liberación presináptica de glutamato, generando un desequilibrio entre la neurotransmisión excitadora e inhibitoria y el desencadenamiento de las crisis epilépticas y el *status epilepticus*. Una vez iniciada la actividad epiléptica, ésta es sostenida por la acción del glutamato sobre el receptor NMDA. Además, su unión a receptores AMPA y kainato favorece la entrada de Na^+ y más Ca^{2+} a la neurona postsináptica, lo cual provoca excitotoxicidad y muerte celular (Scorza y cols., 2009).

b) La activación del receptor M2 provoca la inhibición de la adenilato ciclasa, disminuyendo la liberación de acetilcolina y la neurotransmisión excitadora.

Actualmente se sabe que además de las acciones colinérgicas de la pilocarpina, ésta también es capaz de inducir un daño focal a nivel de la barrera hematoencefálica, así como un estado proinflamatorio a nivel sistémico (Yang y cols., 2005; Marchi y cols., 2007a y 2007b).

El modelo de pilocarpina en roedores es considerado como un modelo isomórfico de la ELT. Integrado por 3 etapas principalmente:

1) La inducción química de un *status epilepticus*. Tras la administración sistémica de pilocarpina, los animales desarrollan conductas de actividad epileptiforme focal asociadas a una estimulación colinérgica (arresto conductual, movimientos orofaciales, salivación, parpadeo y movimientos de vibrisas). Dichos cambios se presentan de forma discontinua por un determinado período de tiempo hasta la aparición de crisis motoras límbicas caracterizadas por salivación intensa, movimientos clónicos de cabeza y extremidades, adopción de una postura de canguro y finalmente, movimientos tónico-clónico generalizados que provocan caídas repetidas del animal (Turski y cols., 1983). Dichas crisis motoras límbicas progresan hasta constituir un *status epilepticus* (Cavalheiro, 1995). La evolución de las manifestaciones conductuales antes mencionadas ha sido correlacionada con una

actividad electroencefalográfica rápida y de alto voltaje cuyo origen es el hipocampo. Sin embargo, se ha descrito que puede propagarse hacia otras estructuras como la amígdala y la neocorteza (Turski y cols., 1983).

2) Período silente o de latencia de duración variable. Este período inicia con la terminación del *status epilepticus* y su duración varía de acuerdo a diversos factores como: la cepa elegida, la edad de los animales al día del experimento (Biagini y cols., 2006; Goffin y cols., 2007), la dosis de pilocarpina administrada (Liu y cols., 1994), y el tiempo que duró el *status epilepticus* (Lemos y Cavalheiro, 1995; Fujikawa, 1996; Biagini y cols., 2006, Goffin y cols., 2007). En promedio, la duración del periodo latencia es de 15 días (Cavalheiro y cols., 1991), concluyendo con la aparición de la primera CEER. Diversos estudios sugieren que los cambios epileptogénicos necesarios para la consolidación de un circuito recurrente hiperexcitable acontecen en esta etapa (Dalby y Mody, 2001; Pitkänen y Sutula, 2002).

3) Período crónico. Caracterizado por la ocurrencia de CEER, las cuales comienzan como crisis parciales con bilateralización secundaria.

2.7. IMAGENOLÓGÍA POR RESONANCIA MAGNÉTICA EN EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL

La IRM es una técnica no invasiva, fundamental en el diagnóstico y detección de lesiones asociadas a ELT, un trastorno esencialmente de sustancia gris. En el caso de la IRM sensible a difusión, ésta ha permitido identificar alteraciones en la sustancia blanca del sistema límbico; específicamente, anomalías bilaterales en los parámetros de difusión, reducción en la fracción de anisotropía e incremento en la difusividad perpendicular de ciertas regiones cerebrales como el fórnix (previamente descrito como un fascículo con eferencias y aferencias hipocampales). Esto llama poderosamente la atención pues son pacientes con ELT cuya afección neurológica focal es unilateral. En resumen, la IRM sensible a difusión logra este objetivo pues permite monitorear cambios estructurales de manera longitudinal mediante la inferencia de la citoarquitectura a través del registro del movimiento aleatorio de las moléculas de agua. Dicho movimiento presentará distintos grados de restricción de acuerdo a la coherencia estructural del tejido analizado (Concha y cols., 2007, 2009, 2010).

Estudios realizados en modelos animales han reportado que sólo los sujetos que desarrollaron CEER, presentaron una difusión del agua anormal dentro del fórnix (similar a lo descrito en humanos) (Parekh y cols., 2010). Esto sugiere que dichas anomalías pudieran representar un factor predisponente para el desarrollo posterior de ELT (Parekh y cols., 2010). Sin embargo, aún se desconoce el origen de los axones afectados en el fórnix, es decir, si son aferencias o eferencias hipocampales, y qué papel juegan en la regulación de esta estructura durante la epileptogénesis. En este sentido, van Eijsden y cols. (2011) sugieren que las alteraciones observadas tanto en fórnix como en el cuerpo calloso representan una fase temprana del proceso patológico de la epilepsia crónica.

Otros estudios se han enfocado en evaluar cuáles son los elementos celulares que contribuyen en la determinación de las diferentes magnitudes observadas en los parámetros de difusión. En el caso de regiones altamente implicadas a la ELT, como el hipocampo, las fibras musgosas aberrantes que surgen de neuronas granulares del giro dentado y forman circuitos excitatorios recurrentes, se han propuesto como uno de los principales sustratos que restringen la difusión en esta estructura (Kim y cols., 2004; Kuo y cols., 2008; Parekh y cols., 2010). Igualmente, Salo y cols. (2017) reportaron modificaciones en la difusión asociadas a axones mielinizados y procesos astrocíticos. Por lo anterior, la búsqueda de los sustratos histológicos que subyacen el proceso epileptogénico y que puedan ser detectados de forma no invasiva por resonancia magnética sensible a difusión continúa su marcha.

3. JUSTIFICACIÓN

Alrededor de 65 millones de personas sufren epilepsia a nivel mundial. Específicamente, la ELT es el tipo de epilepsia más frecuente y el que está más asociado a la resistencia al tratamiento farmacológico. Generalmente, los pacientes con ELT sufrieron un insulto cerebral en la infancia temprana, seguido de un periodo de latencia de duración variable caracterizado por la ausencia de manifestaciones clínicas de la enfermedad. Durante este período silente se ha propuesto que ocurren los mecanismos epileptogénicos necesarios para la aparición subsecuente de CEER y la instauración de la epilepsia. En este sentido, una de las descripciones del proceso epileptogénico en ELT se ha enfocado en las anomalías estructurales que se observan específicamente en el sistema límbico. Estudios recientes han demostrado que los cambios microestructurales también abarcan regiones cerebrales de sustancia blanca y gris, intra- y extra-límbicas. La razón por la que esta enfermedad llega a convertirse en un trastorno con daño estructural extenso, aún se desconoce. Si consideramos que la epileptogénesis es un proceso dinámico, resulta crucial el estudio longitudinal de los cambios en la microestructura de sujetos epilépticos. Sin embargo, en humanos resulta complicado dar este seguimiento pues generalmente el paciente llega con la enfermedad establecida. Por ello, la relevancia de los modelos animales y de las técnicas no invasivas de IRM con capacidades inferenciales de la microestructura tisular. Esto nos permitirá evaluar longitudinalmente las anomalías anatómicas que aparecen durante la ELT, ayudándonos a caracterizar los cambios estructurales que ocurren tras un insulto inicial.

4. HIPÓTESIS

Los cambios microestructurales detectados por IRM sensible a difusión tendrán una distribución predominantemente límbica. Dichos cambios mostrarán un comportamiento temporal paralelo al proceso epileptogénico progresivo observado en la fase crónica de la ELT. Además, estas modificaciones microestructurales tendrán un correlato histológico, es decir, los patrones de daño histológico estarán directamente relacionados con los cambios en las métricas de difusión.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar longitudinalmente los cambios microestructurales de regiones intra- y extra-límbicas durante el proceso epileptogénico en un modelo de epilepsia crónica.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar la magnitud, temporalidad y tendencias de los cambios microestructurales a nivel de hipocampo, sub-regiones hipocampales, fórnix y cíngulo.

- b) Caracterizar la magnitud, temporalidad y tendencias de los cambios microestructurales en estructuras extra-límbicas como cuerpo calloso y cápsula interna.

- b) Determinar la validez de las métricas imagenológicas empleadas para evaluar cambios microestructurales mediante su correlato histológico.

- c) Comparar y validar las capacidades inferenciales que tienen las técnicas imagenológicas de difusión tanto *in vivo* como *ex vivo*.

- d) Identificar biomarcadores estructurales que pudieran estar asociados al proceso epileptogénico.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. ANIMALES

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 40 días de edad al inicio del estudio, provenientes del Bioterio del Instituto de Neurobiología (INB). Los animales fueron alojados (en cajas individuales y con acceso *ad libitum* a agua y alimento) dentro de este mismo edificio en un cuarto con condiciones reguladas de ventilación (12 cambios por hora), temperatura (20-22°C), humedad (50%-60%) e iluminación (ciclos luz-oscuridad de 12 horas). El cuidado y manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del INB (Protocolo CICUAL 105A).

6.2. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES *IN VIVO* POR RESONANCIA MAGNÉTICA

Los protocolos de escaneo fueron conducidos en un resonador para especies pequeñas Bruker de 7 Teslas (Biospec 70/16) conectado a una consola con software Paravision 6.0.1 integrado (Bruker, Germany). El magneto está equipado con un arreglo de gradientes de 9 cm., capaces de generar una fuerza de gradiente máxima de 760 mT/m. Para la detección de la señal y la transmisión de pulsos de radiofrecuencia, se usó una antena de superficie 2x2 de recepción única y una antena de volumen, respectivamente. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano (4%) - aire a un flujo de 2.5 l/min. Una vez corroborada la sedación, los animales fueron posicionados sobre un marco con fijación estereotáxica y les fue suministrada una dosis de mantenimiento anestésico (mezcla de isoflurano (2%) - aire) a un flujo similar al de la inducción. Durante el estudio, los sujetos fueron colocados dentro del magneto, razón por la cual debieron mantenerse en normotermia (37° C) mediante un sistema de recirculación de agua caliente bajo el animal. Todas las ratas tuvieron un monitoreo continuo de constantes fisiológicas como el ritmo cardíaco, la frecuencia respiratoria y la saturación de oxígeno.

Con el objetivo de inferir los cambios microestructurales que fueran ocurriendo a lo largo del estudio, se implementó una secuencia eco-planar pesada a difusión con los siguientes parámetros: TR = 2250 ms, TE = 31.32 ms, 4 promedios, $\delta = 2.9$ ms, $\Delta = 8.7$ ms, 6 volúmenes no sensibles a difusión ($b = 0$ s/mm²) y volúmenes con sensibilización a difusión en 40

direcciones no colineales y no coplanares, para dos valores de b ($b= 650$ y 2000 s/mm²). La imagen resultante fue de una resolución de 133×135 μm y un grosor de rebanada de 750 μm . En la misma sesión, también se adquirieron las imágenes anatómicas con contraste T2, utilizando una secuencia eco de gradiente con ángulo limitado (FLASH, por sus siglas en inglés) y con una resolución isométrica de 100 μm por lado. La sesión completa de adquisición de imágenes, para ambas secuencias, tuvo una duración de 20 minutos. La primera adquisición de imágenes se hizo en animales de 40 días de edad (P40).

6.3. STATUS EPILEPTICUS INDUCIDO POR PILOCARPINA

Dieciséis días después del escaneo basal, las ratas (P56) fueron sometidas al modelo de *status epilepticus* inducido con pilocarpina (Turski y cols., 1983; Leite y Cavalheiro, 1995; Luna-Munguía y cols., 2017). Para ello, todos los animales fueron pre-tratados con sulfato de atropina (5 mg/kg; i.p.) 20 minutos antes de inyectar la pilocarpina (340 mg/kg; i.p.) a los animales del grupo epiléptico ($n = 11$), o el volumen equivalente de solución salina a los animales del grupo control ($n = 8$). Aquellos sujetos que no desarrollaron actividad convulsiva en los 40 minutos posteriores a la dosis inicial de pilocarpina, recibieron dosis adicionales de 170 mg/kg (i.p.) cada 40 minutos hasta desarrollar el *status epilepticus*. La progresión de la actividad convulsiva fue evaluada con base en los cambios conductuales descritos por Racine (1972). El *status epilepticus* se mantuvo por 90 minutos y se interrumpió con una inyección de diazepam (10 mg/kg; i.p.). En algunos casos, al no ceder la actividad convulsiva, fue necesaria una segunda dosis de 5 mg/kg (i.p.). Con respecto a los animales del grupo control, éstos recibieron la inyección de diazepam 2 horas después de haber recibido la inyección de solución salina.

Los animales que recibieron la inyección de pilocarpina y desarrollaron el *status epilepticus* se mantuvieron en un período de recuperación de 7 días. Al octavo día, se inició la videograbación continua de las ratas por dos semanas con el fin de garantizar que los animales presentan CEER. Los animales volvieron al cuarto de videograbación, 60 días después del día de la inducción del *status epilepticus*. En esta ocasión, sólo fueron grabados ininterrumpidamente por una semana.

La segunda y la tercera adquisición de imágenes de ambos grupos se hizo a los siguientes tiempos:

1) Día 80 de edad (P80). Imágenes adquiridas 24 días después del día de la inducción del *status epilepticus*. Correspondiente a la etapa crónica temprana del desarrollo de la epilepsia en los animales sometidos al modelo de pilocarpina.

2) Día 120 de edad (P120). Imágenes adquiridas 64 días después de la inducción del *status epilepticus*. Correspondientes a la etapa crónica tardía del desarrollo de la enfermedad en estos animales.

6.4. PRE-PROCESAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN

Las imágenes crudas pesadas a difusión no son apropiadas para los procesamientos que involucran aplicación de modelos y análisis de alto nivel. Por ello, requieren ser sometidas a un proceso conocido como pre-procesamiento, el cual se encarga de corregir los artefactos derivados de la adquisición y de mejorar la calidad de la señal. Todas las imágenes fueron procesadas fuera de línea mediante el uso del software de acceso libre MRtrix versión 3.0 (Brain Research Institute, Melbourne, Australia).

El pre-procesamiento consistió en: 1) Convertir los archivos al formato .mif con el fin de habilitar las funciones de MRtrix, 2) Reducir el ruido y mejorar la relación señal/ruido; esto se logra al suprimir las fluctuaciones de la señal secundarias a factores térmicos y anatómicos (Veraart y cols., 2016a, 2016b), 3) Corregir los artefactos de movimiento generados por la respiración del animal y las propias vibraciones del resonador, así como las distorsiones secundarias a las corrientes de Foucault generadas por variaciones del campo magnético de los gradientes (uso de la herramienta *eddy_correct* (biblioteca de FSL 5.0.10)) con el fin de estimar la transformación afín óptima aplicada a cada volumen de difusión (Andersson y Sotiropoulos, 2015) y 4) Corregir la inhomogeneidad de la intensidad de la señal para eliminar las variaciones en la intensidad de la señal sin relevancia anatómica derivadas del uso de una antena de superficie (Belaroussi y cols., 2006).

Durante el procesamiento se modelaron los datos de difusión contenidos en las imágenes pre-procesadas con el modelo de tensor (Basser y cols., 1994). Este modelo permite la cuantificación de la difusión en cualquier dirección vóxel a vóxel y que el comportamiento estocástico de la difusión de moléculas de agua se ordene en una matriz 3 x 3 (donde los 3 valores diagonales representan coeficientes de difusión a lo largo de los 3 ejes principales (x, y, z) del marco de referencia de laboratorio). Los 6 valores fuera de esta diagonal corresponden a correlaciones de movimientos aleatorios entre combinaciones de las direcciones principales. Además, el modelo se representa geoméricamente como una elipse, donde la magnitud de sus ejes principales es determinada por los valores propios (λ_1 , λ_2 y λ_3) equivalentes a los coeficientes de difusión principales y su orientación resulta de los vectores propios (V_1 , V_2 y V_3) obtenidos a partir de las direcciones preferenciales de la difusión en cada plano ortogonal. A través del uso de los valores propios, se derivaron los mapas de fracción de anisotropía (FA), difusividad media (DM) o coeficiente de difusión aparente (CDA), difusividad radial (DR), difusividad axial (DA) y de direccionalidad del vector principal (V_1).

6.5. SELECCIÓN DE REGIONES DE INTERÉS Y ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE DIFUSIÓN

Las regiones de interés (RDI) evaluadas corresponden a aquellas áreas cerebrales que se sabe presentan mayor daño en sujetos con ELT (Turski y cols., 1983; Concha y cols., 2009; Parekh y cols., 2010; Curia y cols., 2014; Salo y cols., 2017). El delineado de dichas RDI se hizo manualmente, tomando como referencia los límites anatómicos demarcados para cada estructura y ayudándonos del contraste T2 en los volúmenes no sensibles a difusión, de la escala de grises en el mapa de FA, y del color en el mapa V_1 . Durante el delineado manual, no se incluyeron aquellos vóxeles ubicados en los límites de cada estructura para evitar efectos de volumen parcial. Las RDI analizadas en este trabajo fueron las siguientes: hipocampo dorsal y subregiones (CA3 y giro dentado), fimbria, cíngulo, cuerpo calloso y cápsula interna.

Para la obtención de las métricas de difusión (FA, ADC, DR, DA), se cuantificaron los promedios de dichos escalares, aplicando las RDI sobre los respectivos mapas y tomando en cuenta todos los vóxeles contenidos en las regiones delimitadas.

Cabe resaltar que las mismas RDI empleadas para la obtención de las métricas de difusión del hipocampo dorsal y la fimbria-fórnix se utilizaron para evaluar cambios en el volumen de dichas estructuras, debido a que la reducción de volumen hipocampal es una de las principales características de la esclerosis hipocampal. Para este análisis se cuantificaron el número de vóxeles que demarcaban estas estructuras después de la segmentación y el número de vóxeles resultante, se multiplicó por las dimensiones de la matriz de la imagen (133 x 135 x 750 μm), obteniendo así, el volumen aproximado de la estructura analizada.

6.6. PREPARACIÓN DEL TEJIDO Y ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Dos días después de la tercera adquisición de imágenes, se realizó la eutanasia química de los animales con pentobarbital sódico. Posteriormente, se realizó una incisión y se expuso la cavidad torácica. Se canuló el ventrículo izquierdo del corazón y se abrió una ventana en la aurícula derecha. Mediante dicha canulación, primero se perfundieron 400 ml de solución salina y luego 400 ml de una solución de paraformaldehído al 4% en una mezcla de buffer fosfato salino y agua desionizada (pH 7.4). El cerebro fijado de los animales fue extraído y sumergido en un recipiente estéril con solución fresca de paraformaldehído al 4% (pH 7.4). El tejido fue almacenado hasta el día del procesamiento histológico, en este caso, la tinción de Klüver-Barrera (también conocida como Luxol azul rápido). En dicha tinción se usa ftalocianina de cobre, pigmento que se adhiere a las bases de las lipoproteínas contenidas en la vaina de mielina y permite ver los axones mielinizados en un color azul intenso (Klüver y Barrera, 1953; Kiernan, 2007). Por ello, su utilidad para la detección de hallazgos patológicos en trastornos desmielinizantes donde hay una fijación débil del pigmento a la sustancia blanca.

Es importante mencionar que dos animales del grupo control y dos animales del grupo epiléptico fueron seleccionados al azar para ser perfundidos con una solución modificada de paraformaldehído al 4%. Ésta mantuvo el pH de 7.4 pero incluía glutaraldehído al 2% y gadolinio 0.002 mM. El tejido fue almacenado en esta solución hasta el día del escaneo *ex vivo* en el resonador. Esta modificación se hizo con el objetivo de determinar si los cambios microestructurales observados *in vivo* sufrían o no alguna modificación al ser sometidos a un escaneo *ex vivo* cuya secuencia de difusión tiene mayor resolución.

A continuación, se describe brevemente la metodología que se siguió para lograr la tinción de Klüver-Barrera:

Cada cerebro fue enjuagado varias veces con agua destilada con el fin de remover el exceso de paraformaldehído. Posteriormente, fueron deshidratados con etanol, aclarados con xilol, e incluidos en parafina líquida. Una vez que el tejido ha quedado embebido en parafina, a través del uso del microtomo, se obtienen cortes coronales de 7 μm de grosor a nivel de hipocampo dorsal. Las rebanadas son desparafinadas y rehidratadas para después sumergirlas en una solución de azul Luxol-resistente. Posteriormente, las rebanadas son colocadas dentro de un horno a 56° C por 12 horas. Finalmente, el exceso de colorante es removido y las rebanadas se sumergen en una solución de carbonato de litio con el fin de diferenciar y mejorar la definición de la sustancia blanca. La solución de violeta de cresilo se usó como tinción de contraste frente al azul-Luxol, permitiendo la visualización del soma neuronal y el neuropilo en color rosáceo (Prophet y cols., 1992). Las muestras fueron observadas bajo un microscopio de luz transferida a 4x, 10x y 40x.

6.7. ADQUISICIÓN, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES *EX-VIVO*

Los 4 cerebros fueron escaneados en el resonador Bruker 7T usando una antena refrigerada (CryoProbe, Bruker), pues brinda una mejor relación señal/ruido y una mayor capacidad para generar imágenes de alta resolución. Para ello, cada cerebro se colocó dentro de una jeringa de 10 ml y fue suspendido en una solución fluorocarbonada (Fluorinert, 3M; disminuye los artefactos de susceptibilidad magnética en escaneos *ex-vivo*). Las imágenes pesadas a difusión se adquirieron utilizando una secuencia spin-eco, con el fin de evitar los artefactos de susceptibilidad magnética en zonas de interfaz tejido-líquido que presentan los cerebros epilépticos al tener un sistema ventricular dilatado. La resolución de las imágenes fue de 100 x 100 x 100 μm y contaron con 20 volúmenes no sensibles a difusión y volúmenes sensibles a la difusión con valores de b de 3000 y 5000 s/mm², cada uno con 64 direcciones. El tiempo total de escaneo fue de 11 horas.

Las imágenes fueron pre-procesadas con reducción de ruido, múltiples registros lineales utilizando la herramienta FLIRT (biblioteca de FSL 5.0.10), concatenación de volúmenes registrados para formar una imagen única y corrección de inhomogeneidades de campo. Al igual que las imágenes *in vivo*, el procesamiento consistió en el cálculo del modelo de tensor y derivación de mapas de métricas de difusión. Las RDI analizadas fueron las previamente descritas.

6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Aplicación de pruebas *t* pareadas para determinar si había diferencias o no entre el lado izquierdo y derecho de las RDI a evaluar. La ausencia de cambios suscitó que se promediaran los escalares de ambos lados y así poder describir las alteraciones de cada región como una sola entidad. Los datos resultantes fueron sometidos a la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para evaluar su distribución. Una vez corroborada la normalidad de su distribución, se evaluó la progresión en los parámetros de difusión por medio de una prueba ANDEVA (Análisis de variancia), de medidas repetidas y con dos factores (tiempo y tratamiento). La prueba *post-hoc* de Sidak fue aplicada para comparar las variaciones entre las distintas mediciones. Los datos fueron analizados con los programas Rstudio (R, versión 3.4.3) y SPSS (IBM SPSS Statistics, versión 25) y se presentaron como la media \pm la desviación estándar de la media (σ). Se consideraron significativas las diferencias con $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. CAMBIOS LONGITUDINALES EN LAS CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DEL SISTEMA LÍMBICO *IN VIVO*

Al comparar las imágenes anatómicas con contraste T2 de los dos grupos de animales, obtenidas 24 días post-*status epilepticus*, se observan cambios significativos a nivel de hipocampo dorsal y fimbria de los sujetos epilépticos. En el caso del hipocampo dorsal, su tamaño disminuyó y el espacio liberado fue ocupado por los ventrículos laterales (fenómeno que se aprecia como hiperintensidades en las regiones colindantes del hipocampo) (Figura 9E). Además, se perdieron los límites de las subáreas que lo integran (región hilar y fisura hipocampal). En el caso de la fimbria, ésta pasó de ser una estructura semi-rectangular con bordes redondos y bien delimitados, a una región elongada y difusa (Figura 9E). Todos los cambios descritos en las imágenes obtenidas a los 24 días post-*status epilepticus*, persistieron en las imágenes correspondientes a los 64 días post-*status epilepticus* (Figura 9F).

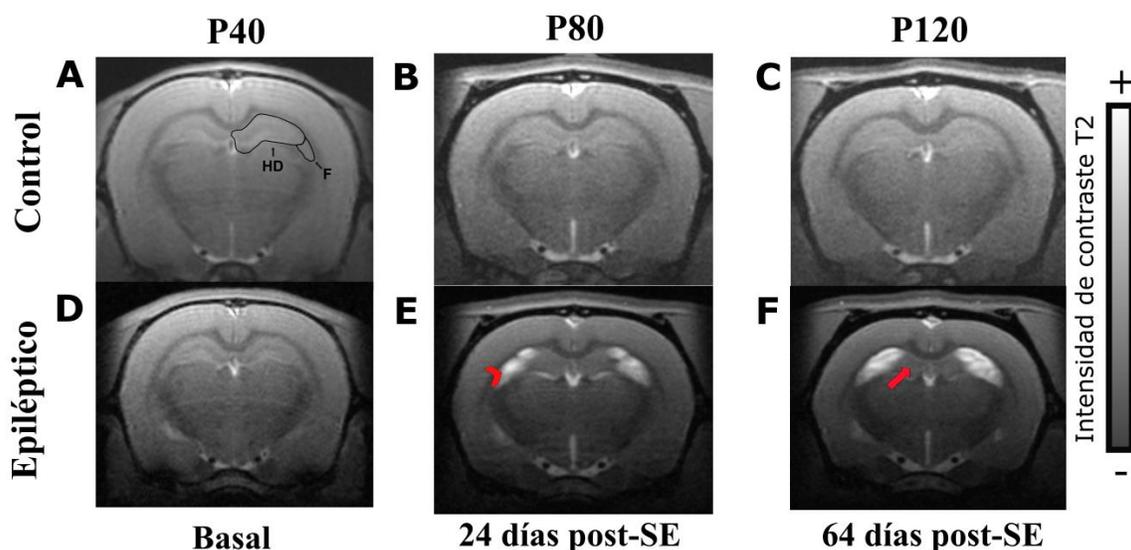


Figura 9. Imágenes anatómicas ponderadas a contraste T2 que muestran rebanadas coronales a nivel de hipocampo dorsal. Animal control (A-C) y epiléptico (D-F), evaluados antes y después de la inducción del *status epilepticus* (SE). La cabeza de la flecha roja indica la hiperintensidad ventricular; la flecha roja indica la reducción del tamaño del hipocampo dorsal. Abreviaturas: HD: hipocampo dorsal; F; fimbria.

Para corroborar los cambios cualitativos antes mencionados, tanto hipocampo dorsal como la fimbria fueron segmentados y así poder cuantificar sus cambios volumétricos. En este sentido, el hipocampo dorsal de los animales epilépticos mostró una reducción del 30% con respecto al de los animales control ($F = 55$, $***p < 0.001$) (Figura 10A); la fimbria disminuyó un 37% ($F = 51$, $***p < 0.001$) (Figura 10C). Las evaluaciones longitudinales realizadas en el hipocampo dorsal de ambos grupos muestran que hay una diferencia significativa entre la primera y la tercera medición ($F = 6.7$, $^{++}p < 0.01$) (Figura 10A). Las evaluaciones longitudinales hechas en fimbria no mostraron cambios significativos en ambos grupos (Figura 10C).

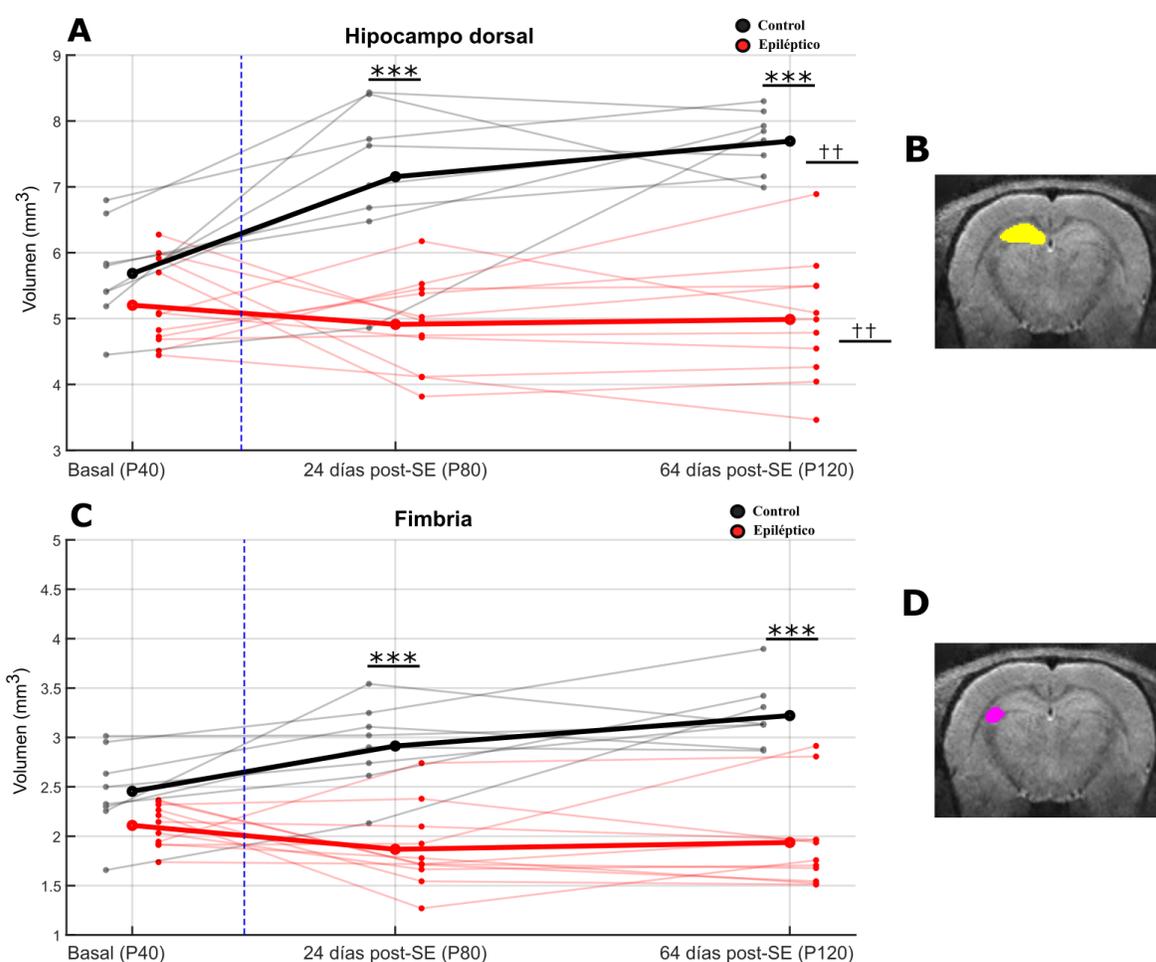


Figura 10. Cambios volumétricos longitudinales. Evaluaciones hechas en hipocampo dorsal (A) y fimbria (C) tanto del grupo control (negro) como del grupo epiléptico (rojo) en 3 tiempos diferentes (basal, 24 y 64 días post-*status epilepticus* (SE)). Regiones de interés empleadas para obtener las métricas graficadas, delimitando el hipocampo dorsal en amarillo (B) y la fimbria en rosa (D). Las

líneas tenues representan a cada uno de los individuos que integran los grupos; las líneas gruesas representan la media de cada grupo. La línea punteada en azul indica el momento de la inducción del *status epilepticus*. La comparación entre grupos indica una diferencia significativa en ambas regiones (** $p < 0.001$). Sólo la comparación longitudinal de hipocampo dorsal muestra que ambos grupos presentan diferencias significativas al comparar la primera y la tercera evaluación ($^{\dagger}p < 0.01$).

7.2. CAMBIOS LONGITUDINALES EN LOS PARÁMETROS DE DIFUSIÓN DERIVADOS DE LAS IMÁGENES ADQUIRIDAS *IN VIVO*

7.2.1. FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA

La fracción de anisotropía (FA) es un índice de asimetría de la difusión asociado con coherencia estructural. En el caso de los animales epilépticos, el hipocampo dorsal muestra un incremento significativo (7%) con respecto al de los animales control (FA-basal = 0.26, $\sigma = 0.04$; FA-post-*status epilepticus* (P80) = 0.28, $\sigma = 0.06$; FA-post-*status epilepticus* (P120) = 0.29, $\sigma = 0.04$; $F = 6$, $*p < 0.05$). Es importante resaltar que, aunque el incremento de la FA en hipocampo dorsal se mantuvo hasta la tercera medición, no hubo diferencias significativas entre las dos mediciones post-*status epilepticus* (Figura 11A).

CA3 no mostró cambios significativos entre sujetos epilépticos y control. Sin embargo, sí mostró una tendencia creciente, aunque no significativa, a lo largo del tiempo (FA-basal = 0.25, $\sigma = 0.03$; FA-post-*status epilepticus* (P80) = 0.29, $\sigma = 0.06$; FA-post-*status epilepticus* (P120) = 0.29, $\sigma = 0.05$; $F = 1.2$, $p = 0.2$) (Figura 11B).

Finalmente, al evaluar la FA del giro dentado de los animales epilépticos, ésta muestra un incremento significativo (21%) con respecto al de los animales control (FA-basal = 0.30, $\sigma = 0.06$; FA-post-*status epilepticus* (P80) = 0.34, $\sigma = 0.1$; FA-post-*status epilepticus* (P120) = 0.36, $\sigma = 0.08$; $F=12$, $**p < 0.01$). Similar a lo observado en las otras dos regiones evaluadas, aquí tampoco hubo cambios significativos entre las dos mediciones post-*status epilepticus* (Figura 11C).

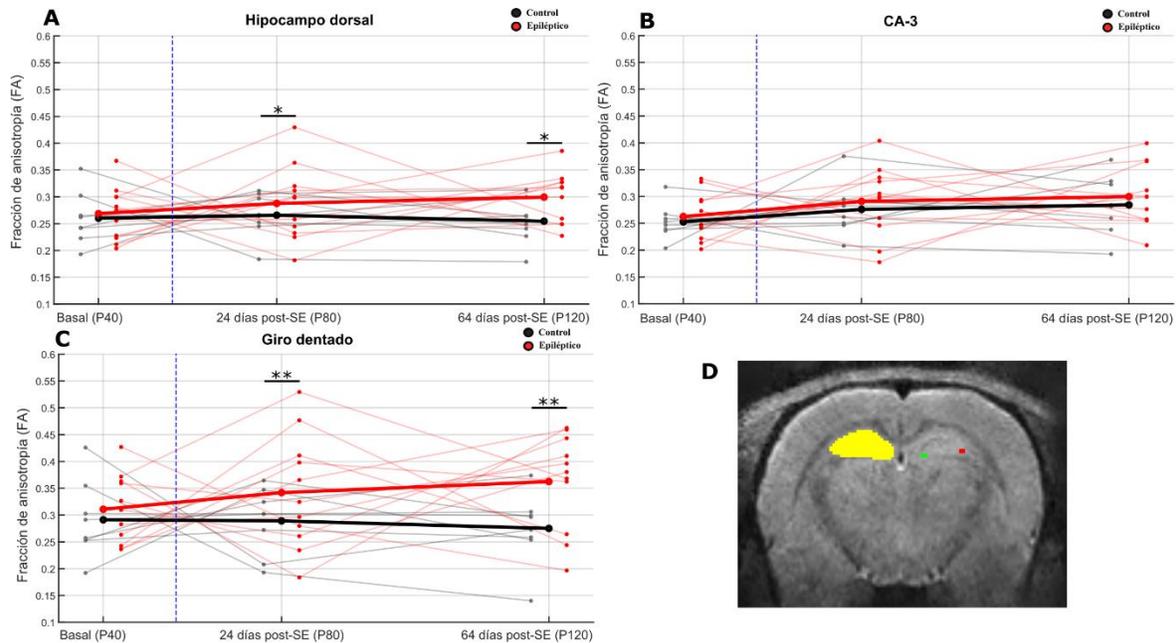
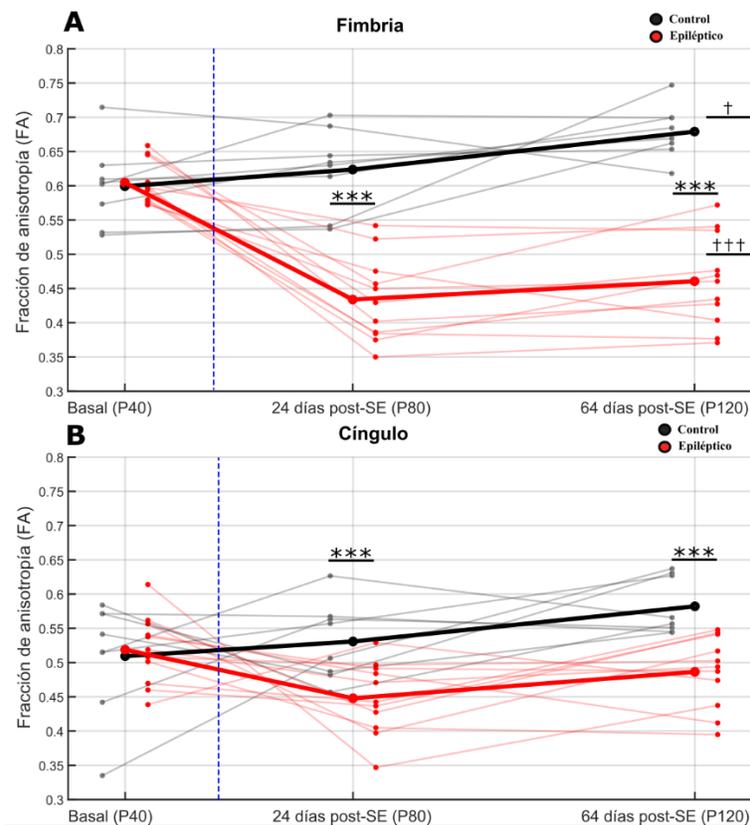


Figura 11. Cambios longitudinales en la fracción de anisotropía (FA) de estructuras de sustancia gris (hipocampo dorsal (A), CA3 (B) y giro dentado (C)) tanto del grupo control (negro) como del grupo epiléptico (rojo). (D) Muestra las regiones de interés empleadas para obtener las métricas graficadas, delimitando el hipocampo dorsal en amarillo, el giro dentado en verde y CA3 en rojo. Las líneas tenues representan a cada uno de los individuos que integran los grupos; las líneas gruesas representan la media de cada grupo. La línea punteada en azul indica el momento de la inducción del *status epilepticus*. La comparación entre grupos indica una diferencia significativa en hipocampo dorsal y giro dentado (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, respectivamente). La comparación longitudinal muestra que no hay diferencias significativas en ninguna de las tres regiones evaluadas.

Al evaluar la FA en estructuras de sustancia blanca (fimbria, cíngulo, cuerpo calloso y cápsula interna), el porcentaje de cambio disminuyó significativamente en los animales epilépticos. En el caso de la fimbria, su valor de FA cayó un 30% con respecto a los niveles obtenidos en los animales control (FA-basal = 0.60, $\sigma = 0.04$; FA-post-*status epilepticus* (P80) = 0.43, $\sigma = 0.06$; FA-post-*status epilepticus* (P120) = 0.46, $\sigma = 0.06$; $F = 56$, *** $p < 0.001$). Además, esta estructura mostró cambios longitudinales tanto en el grupo control (basal vs P120) ($F=0.5$, $^{\dagger}p < 0.05$) como en el grupo epiléptico (basal vs P80 y P120) ($F = 10$, $^{+++}p < 0.001$) (Figura 12A).

Similar a lo observado en la fimbria, el cíngulo y el cuerpo calloso también mostraron decrementos significativos en los animales epilépticos (16% y 8%, respectivamente) (Cíngulo: FA-basal = 0.51, $\sigma = 0.06$; FA-post-*status epilepticus* (P80) = 0.44, $\sigma = 0.05$; FA-post-*status epilepticus* (P120) = 0.48, $\sigma = 0.05$; $F = 26$, $***p < 0.001$; Cuerpo calloso: FA-basal = 0.57, $\sigma = 0.07$; FA-post-*status epilepticus* (P80) = 0.55, $\sigma = 0.06$; FA-post-*status epilepticus* (P120) = 0.58, $\sigma = 0.06$; $F = 5.9$, $*p < 0.05$). Ambas estructuras no mostraron cambios longitudinales en ninguno de los dos grupos (Figura 12B y 12C).

Finalmente, la cápsula interna también presentó una reducción significativa de la FA (13%) en los animales epilépticos (FA-basal = 0.50, $\sigma = 0.06$; FA-post-*status epilepticus* (P80) = 0.45, $\sigma = 0.06$; FA-post-*status epilepticus* (P120) = 0.46, $\sigma = 0.06$; $F = 11$, $**p < 0.01$). Tampoco se observaron cambios longitudinales en los grupos evaluados (Figura 12D).



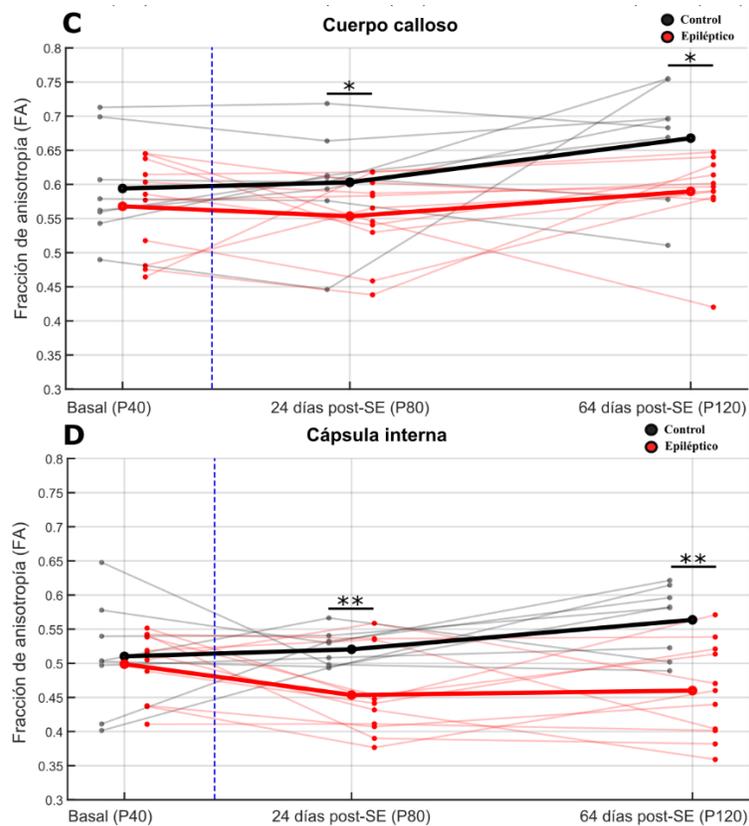


Figura 12. Cambios longitudinales en la fracción de anisotropía (FA) de estructuras de sustancia blanca (fimbria (A), cíngulo (B), cuerpo calloso (C) y cápsula interna (D)) tanto del grupo control (negro) como del grupo epiléptico (rojo). Las líneas tenues representan a cada uno de los individuos que integran los grupos; las líneas gruesas representan la media de cada grupo. La línea punteada en azul indica el momento de la inducción del *status epilepticus*. La comparación entre grupos indica una diferencia significativa en las 4 estructuras evaluadas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). La comparación longitudinal muestra que sólo fimbria presenta una diferencia significativa en ambos grupos ($^{\dagger}p < 0.05$, $^{\dagger\dagger}p < 0.001$).

7.2.2. COEFICIENTE DE DIFUSIÓN APARENTE

El coeficiente de difusión aparente (CDA) refleja el promedio de la difusión hacia todas las direcciones dentro de un espacio tridimensional, en este caso, dentro de un vóxel. Al comparar los valores de CDA entre grupos, no se observaron diferencias significativas en 6 de las 7 estructuras evaluadas; sólo la cápsula interna presentó una disminución significativa en los animales epilépticos ($F = 6.5$, $*p < 0.05$) (Figura 13G). Además, el comportamiento longitudinal de este coeficiente no varió en hipocampo dorsal ($F = 0.7$, $p = 0.3$) y fimbria (F

= 2.4, $p = 0.1$) de ambos grupos (Figura 13A y 13D, respectivamente). Pero sí en CA3 ($F = 4.5$, $^{\dagger}p < 0.05$), giro dentado ($F = 5$, $^{\dagger}p < 0.05$), cíngulo ($F = 8.4$, $^{\dagger}p < 0.05$), cuerpo calloso ($F = 13.8$, $^{+++}p < 0.001$) y cápsula interna ($F = 5.3$, $^{\dagger}p < 0.05$) de ambos grupos al comparar basal contra P120 (Figura 13B, 13C, 13E, 13F y 13G, respectivamente).

7.2.3. DIFUSIVIDAD AXIAL

La difusividad axial (DA) representa el movimiento del agua en la dirección preferencial de la difusión, derivándose del autovalor principal del modelo de tensor. Al comparar animales control y epilépticos, estos últimos presentaron reducciones significativas en todas las estructuras de sustancia blanca (fimbria 24%; $F = 23$, $^{***}p < 0.001$, cíngulo 12%; $F = 10$, $^{**}p < 0.01$, cuerpo calloso 8%; $F = 6$, $^{*}p < 0.05$ y cápsula interna 18%; $F = 12$, $^{**}p < 0.01$). Además, el cuerpo calloso presentó cambios longitudinales en ambos grupos al comparar la medición basal vs P80 ($F = 5.7$, $^{++}p < 0.01$). En estructuras de sustancia gris no se identificaron cambios significativos entre grupos, ni longitudinales (Anexo 1).

7.2.4. DIFUSIVIDAD RADIAL

La difusividad radial (DR) se refiere al movimiento del agua en el plano perpendicular a la dirección preferencial de la difusión, resultando del promedio del segundo y tercer autovalor del modelo de tensor. En los animales epilépticos se observó un incremento significativo (14%) de la DR en fimbria ($F = 26$, $^{***}p < 0.001$) con respecto a los animales del grupo control. En contraste, el giro dentado de sujetos epilépticos presentó una disminución significativa (6%) de la RD ($F = 6$, $^{*}p < 0.05$). Al realizar las evaluaciones longitudinales, la DR presentó cambios significativos en hipocampo dorsal ($F = 4.5$, $^{\dagger}p < 0.05$), giro dentado ($F = 9.5$, $^{++}p < 0.01$), CA3 ($F = 6.2$, $^{++}p < 0.01$), cíngulo ($F = 12$, $^{+++}p < 0.001$), cuerpo calloso ($F = 21$, $^{+++}p < 0.001$) y cápsula interna ($F = 9.3 < 0.01$) de ambos grupos (Basal y P80 vs P120) (Anexo 2).

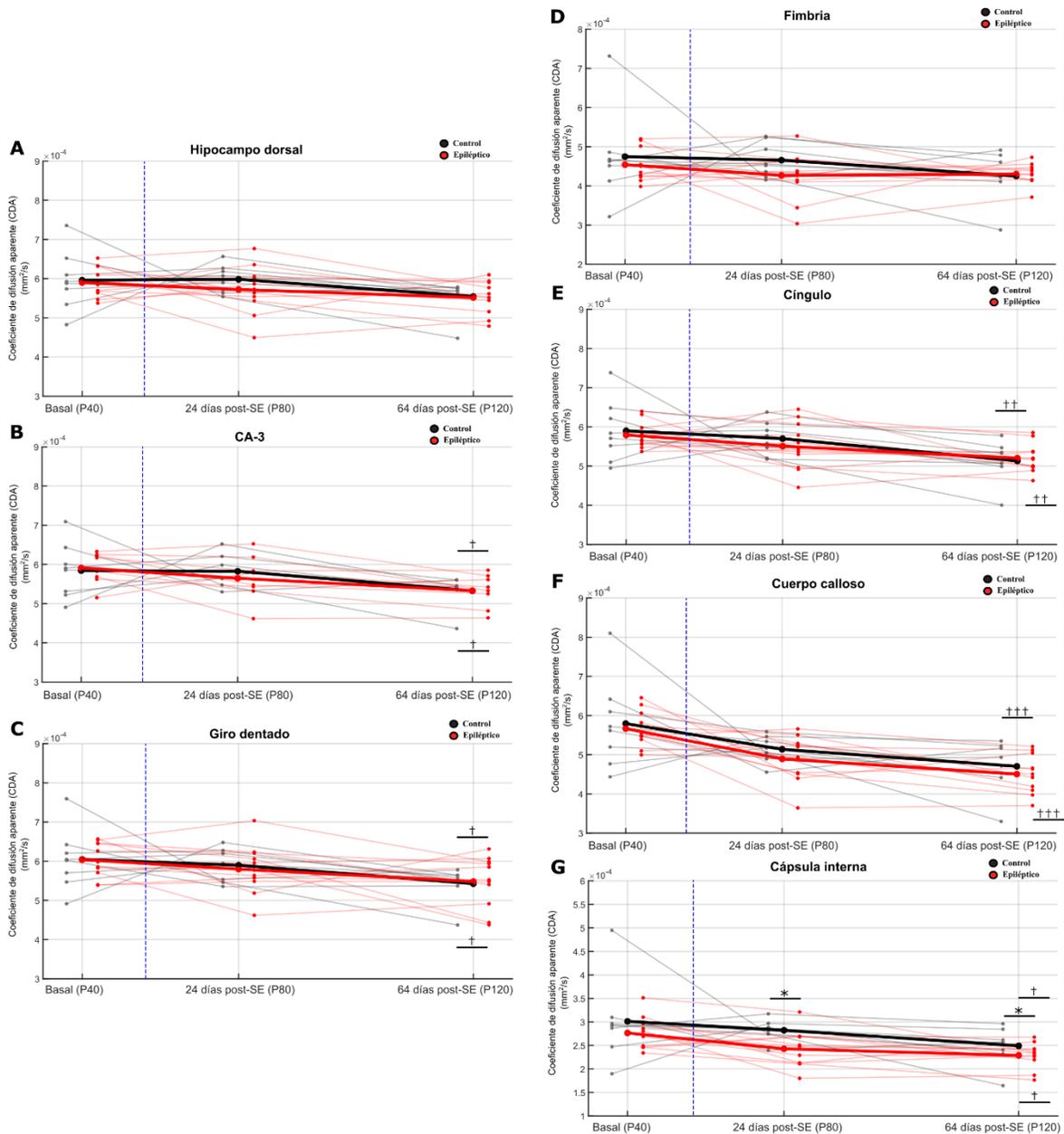


Figura 13. Cambios longitudinales en coeficiente de difusión aparente (CDA) en estructuras tanto de sustancia gris (hipocampo dorsal (A), CA3 (B) y giro dentado (C)) como de sustancia blanca (fimbria (D), cíngulo (E), cuerpo calloso (F) y cápsula interna (G)) del grupo control (negro) y del grupo epiléptico (rojo). Las líneas tenues representan a cada uno de los individuos que integran los grupos; las líneas gruesas representan la media de cada grupo. La línea punteada en azul indica el momento de la inducción del *status epilepticus*. La comparación entre grupos indica una diferencia significativa en cápsula interna (* $p < 0.05$). La comparación longitudinal entre P40 y P120 muestra diferencias significativas en CA3, giro dentado, cíngulo, cuerpo calloso y cápsula interna († $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ y ††† $p < 0.001$).

7.3. CAMBIOS HISTOLÓGICOS SECUNDARIOS A LA INDUCCIÓN DE *STATUS EPILEPTICUS* EN EL MODELO DE PILOCARPINA

El análisis de los cortes histológicos identificó esclerosis hipocampal (muerte de neuronas piramidales y reducción del tamaño de la región) bilateral en los animales epilépticos. La disminución en la densidad de neuronas piramidales predominó en CA1 y CA3, observándose también un patrón de dispersión de las células remanentes. Además, la intensidad de la muerte neuronal registrada en CA3 provocó un desarreglo de la lámina de células piramidales y la presencia de numerosas neuronas picnóticas (Figura 14D – 14F).

Al comparar los cortes histológicos de los animales control y los animales epilépticos a nivel de fimbria, éstos develaron un evidente cambio morfológico de dicha estructura. En los sujetos control, la fimbria tiene una forma rectangular bien delimitada con bordes redondeados (Figura 15A). En contraste, los sujetos epilépticos tienen una fimbria triangular, elongada y reducida en tamaño (especialmente en la porción distal) (Figura 15D). Además, al observar los cortes a 10x y 40x, se pudo apreciar que los animales control presentaban un patrón fibrilar denso y homogéneo, así como una menor densidad de células gliales (Figura 15B y 15C). Muy diferente al patrón fibrilar laxo, disperso y con menor intensidad de tinción presentado por los animales epilépticos (Figura 15E y 15F).

Hipocampo dorsal CA-3

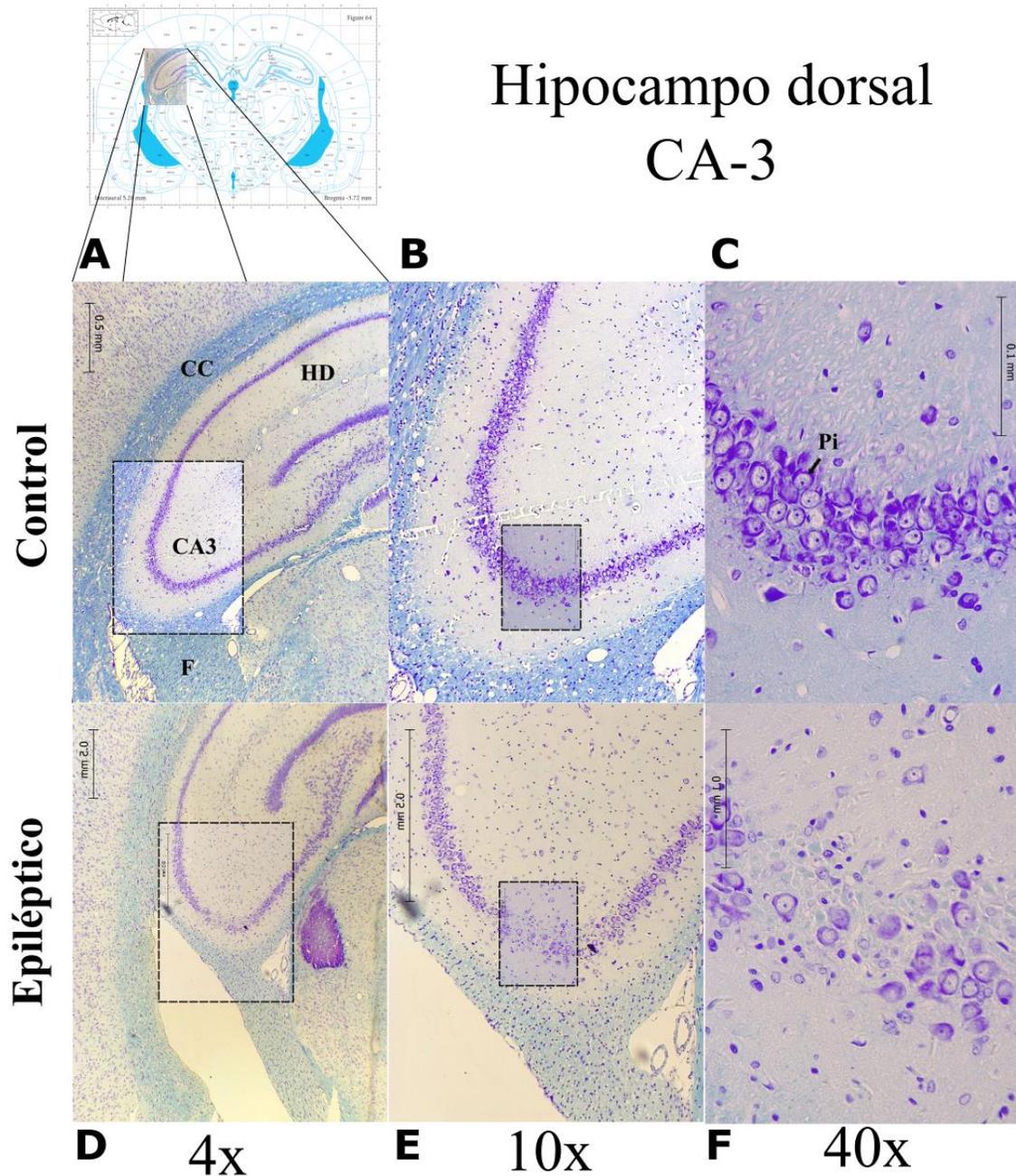


Figura 14. Cortes coronales a nivel de hipocampo dorsal, teñidos con Luxol Fast-blue, evaluados con los objetivos de 4x, 10x y 40x. El rectángulo muestra un acercamiento a la región de CA3 debido a que fue la región evaluada que presentó mayores cambios entre grupos. (A-C) Los cortes obtenidos del animal control muestran una lámina de células piramidales densa y compacta a lo largo del cuerno de Ammon. (D-F) Los cortes obtenidos del animal epiléptico muestran un decremento en la densidad de neuronas piramidales, muerte neuronal y dispersión de células remanentes. Abreviaturas: CC: cuerpo calloso, HD: hipocampo dorsal, F: fimbria y Pi: célula piramidal.

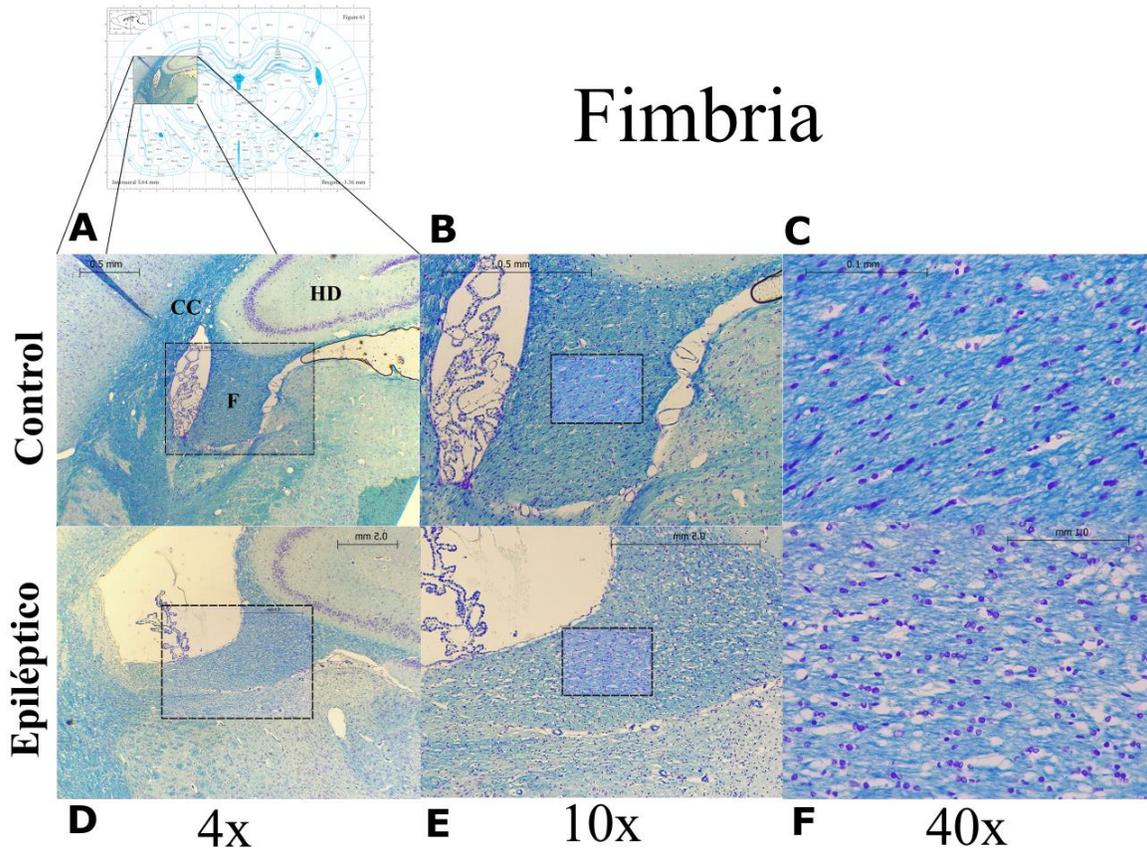


Figura 15. Cortes coronales a nivel de fimbria, teñidos con Luxol Fast-blue, evaluados con los objetivos de 4x, 10x y 40x. El rectángulo muestra un acercamiento a la región de la fimbria debido a que fue la región evaluada de sustancia blanca que presentó mayores cambios entre grupos. (A) Los cortes obtenidos del animal control muestran una fimbria con bordes bien definidos (flecha) y una intensidad de tinción alta; (B-C) muestran un patrón denso de fibras mielínicas. (D) Los cortes obtenidos del animal epiléptico muestran una fimbria elongada (cabeza de flecha) y con una tenue intensidad de la tinción; (E-F) muestran un patrón de fibras mielínicas dispersas. Abreviaturas: CC: cuerpo calloso, HD: hipocampo dorsal y F: fimbria.

7.4. CAMBIOS MICROESTRUTURALES INFERIDOS POR IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN *EX VIVO*

7.4.1. FRACCIÓN DE ANISOTROPÍA

Las imágenes *ex vivo* de alta resolución confirmaron las tendencias observadas en las secuencias *in vivo*. Al evaluar la FA de las estructuras de sustancia gris de los cerebros epilépticos, éstos mostraron incrementos en todas las regiones analizadas; siendo el de giro dentado el más significativo. La evaluación de estructuras de sustancia blanca constató el

descenso de la FA en cerebros epilépticos; siendo fimbria la que presentara el mayor decremento (Figura 16). El análisis de la cápsula interna no se realizó en las imágenes *ex vivo* pues dicha estructura no se encontraba lo suficientemente cerca a la antena para contar con una buena calidad de señal.

7.4.2. COEFICIENTE DE DIFUSIÓN APARENTE

El CDA no presentó una tendencia definida en estructuras de sustancia gris. De igual forma, no se observaron cambios en la difusión media de tejido vivo para estas estructuras en ambos grupos de animales. Sin embargo, en la fimbria y en el cuerpo calloso de sujetos epilépticos se registraron valores mayores de CDA respecto a los valores de los animales del grupo control. El CDA del cíngulo no presentó cambios entre sujetos (Figura 16).

7.4.3. DIFUSIVIDAD AXIAL

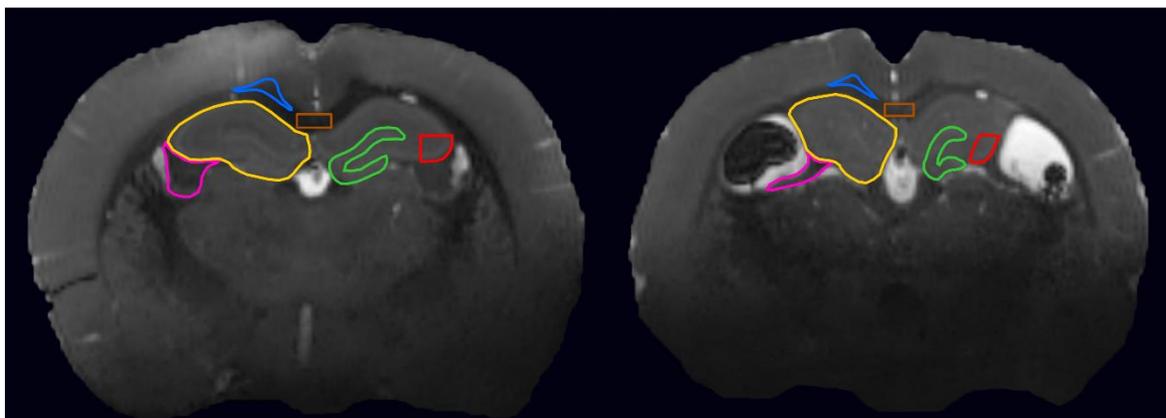
El análisis *ex vivo* reveló un aumento en los valores de DA en sujetos epilépticos. A nivel de sustancia blanca, similar a lo observado *in vivo*, los animales epilépticos presentaron valores inferiores de DA con respecto a los animales del grupo control (Figura 16).

7.4.4. DIFUSIVIDAD RADIAL

La DR en estructuras de sustancia gris presentó una disminución a nivel de giro dentado y CA3 de los animales epilépticos; comportamiento similar al registrado *in vivo* a nivel de giro dentado. Además, al igual que lo reportado *in vivo*, se observó un incremento de la DR en fimbria. Misma tendencia se observó en cíngulo y cuerpo calloso (Figura 16).

Control

Epiléptico



■ Fimbria

■ Cíngulo

■ Cuerpo calloso

■ Hipocampo dorsal

■ Giro dentado

■ CA3

Parámetros de difusión derivados de imágenes *ex vivo*

Estructura	Fracción de anisotropía (FA)		Coeficiente de difusión aparente (CDA) ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)		Difusividad axial (DA) ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)		Difusividad radial (DR) ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)	
	Control	Epiléptico	Control	Epiléptico	Control	Epiléptico	Control	Epiléptico
■ Fimbria	0.84	0.74	0.13	0.15	0.35	0.32	0.04	0.07
■ Cíngulo	0.59	0.57	0.18	0.18	0.31	0.29	0.11	0.12
■ Cuerpo calloso	0.79	0.71	0.18	0.20	0.40	0.39	0.07	0.10
■ Hipocampo dorsal	0.22	0.29	0.23	0.24	0.28	0.31	0.20	0.20
■ Giro dentado	0.27	0.41	0.22	0.23	0.29	0.35	0.19	0.18
■ CA3	0.20	0.36	0.23	0.22	0.27	0.29	0.20	0.18

Figura 16. Cortes coronales a nivel de hipocampo dorsal adquiridos a partir de una secuencia *ex vivo* sensible a difusión (izquierda, animal control; derecha, animal epiléptico). En la figura se muestran las 6 estructuras cerebrales evaluadas *ex vivo*, observándose cambios evidentes entre grupos. Cada región fue delimitada: fimbria (rosa), cíngulo (azul), cuerpo calloso (café), hipocampo dorsal (amarillo), giro dentado (verde) y CA3 (rojo). La tabla muestra los parámetros de difusión derivados del análisis de las imágenes *ex vivo* (promedio de dos animales del grupo control y de dos animales epilépticos). Las 4 métricas analizadas: fracción de anisotropía (FA), coeficiente de difusión aparente (CDA), difusividad axial (DA) y difusividad radial (RD).

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron distintas estructuras límbicas y extra-límbicas en distintos puntos temporales de la fase crónica del modelo de pilocarpina, y se encontraron cambios significativos en la microestructura del sistema fimbria-fórnix de animales epilépticos, como consecuencia del insulto cerebral inducido por pilocarpina y el proceso epileptogénico subsecuente. La caracterización de los cambios longitudinales anatómo-patológicos se logró mediante el uso de IRM sensible a difusión, implementándose métricas de difusión *in vivo*. Los resultados obtenidos *in vivo* fueron correlacionados con los resultados obtenidos *ex vivo* y a nivel histológico.

Las anomalías bilaterales que se presentan en los patrones de difusión de pacientes epilépticos con esclerosis hipocampal unilateral sugieren que distintas poblaciones de fibras a nivel del fórnix pudieran contribuir al daño bilateral. Entre éstas destacan las aferentes y en menor medida las comisurales (Concha y cols., 2005, 2007; McDonald y cols., 2010). Estudios previos en modelos animales han reportado que las lesiones en el sistema fimbria-fórnix que llegan a provocar denervación de las aferencias hipocampales, facilitan el desarrollo de la actividad epiléptica (Buszáki y cols., 1989; Ferencz y cols., 1997, 2001). Este efecto podría ser resultado de la pérdida de las acciones moduladoras que ejercen las vías septo-hipocampales sobre la actividad eléctrica hipocampal pues dichas vías están íntimamente relacionadas con el ritmo theta (potencial de campo oscilatorio hipocampal de 4-12 Hz) (Lee y cols., 1994; Buzsáki, 2002; Teles-Grilo Ruivo y Mellor, 2013; Unal y cols., 2015). En este sentido, el mantenimiento de la actividad eléctrica hipocampal en un rango oscilatorio limitado evitaría la aparición de estados de excitabilidad anormales y por lo tanto, evitaría la aparición de crisis epilépticas espontáneas recurrentes (Miller y cols., 1994; Colom y cols., 2006; Kitchiniga y Butuzova, 2009; Kitchigina y cols., 2013). A causa de la complejidad de los circuitos involucrados en la modulación de este ritmo, aún se desconocen las alteraciones precisas responsables de estos cambios. A continuación, se sugieren posibles candidatos que pudieran estar involucrados:

- Las neuronas colinérgicas septales están disminuidas y sufren cambios atróficos (Cavalheiro, 1995; Follesa y cols., 1999). Esto podría causar el poder espectral disminuido,

ya que a estas neuronas se les atribuye un efecto tónico y amplificador sobre el ritmo theta (Lee y cols., 1994).

- La muerte tanto de neuronas GABAérgicas septales de proyección como de interneuronas GABAérgicas septales; consideradas los tipos neuronales más susceptibles al daño excitotóxico agudo y crónico (Covolan y Mello, 2000; Garrido Sanabria y cols., 2006). Esto también contribuiría a los cambios de frecuencia del ritmo theta (Colom y cols., 2006; Hangya y cols., 2009; Kitchiniga y cols., 2013).

Similar a lo establecido anteriormente, en este trabajo también se observó un adelgazamiento en el extremo distal de la fimbria, sitio que corresponde a las fibras aferentes septales, y en mayor proporción, a las fibras eferentes de CA1 y CA3 del hipocampo ventral (Daitz, 1953; Wyss y cols., 1980).

8.1. CAMBIOS LONGITUDINALES EN LOS PARÁMETROS DE DIFUSIÓN DERIVADOS DE LAS IMÁGENES ADQUIRIDAS *IN VIVO*

8.1.1. SISTEMA FIMBRIA-FÓRNIX

Estudios previos han descrito que pacientes con ELT fármacorresistente presentan variaciones en el comportamiento de la difusión a nivel del fórnix, señalándose a la degeneración Walleriana como la responsable de dichos cambios (Concha y cols., 2005, 2006; Liu y cols., 2013). En este estudio, el valor de difusión de la fimbria post-*status epilepticus* destacó por ser el que presentó un mayor porcentaje de cambio, observándose una disminución significativa de la fracción de anisotropía (FA) y de la difusividad axial (DA), así como un incremento en los valores de difusividad radial (DR). Esto nos lleva a sugerir que tras la inducción del insulto cerebral ocurren una serie de eventos degenerativos (llámese inflamación, desintegración granular del citoesqueleto axonal, fragmentación axonal, entre otros) tanto en las regiones proximales como distales a la lesión primaria, concluyendo con la atrofia de las diversas regiones cerebrales afectadas (George y Griffin, 1994; Kerschensteiner y cols., 2005; Beirowski y cols, 2010). Tales cambios van a constituir obstáculos que van a limitar la movilidad del agua en sentido paralelo a las fibras (especialmente en el compartimento extracelular), lo que provocará un descenso en los valores de DA. Sin embargo, las barreras conferidas por la pared axonal y la vaina de mielina

(las cuales aún preservan cierto grado de integridad) serán las que se encarguen de mantener estables los valores de DR pues continúan restringiendo la difusión en sentido perpendicular a las fibras.

El cambio en conjunto de las métricas previamente mencionadas se ha asociado a pérdida axonal, incrementos en el espacio extracelular y proliferación de células gliales isotrópicas (Pierpaolli y cols., 2001; Song y cols., 2003; Concha y cols., 2005, 2006; Liu y cols., 2013). En nuestro caso, la evaluación de las métricas de difusión en los días 24 y 64 post-*status epilepticus* corresponde a la fase crónica de la degeneración Walleriana, etapa caracterizada por la activación de la microglía, la degradación de mielina y la eliminación de los detritus axonales (George y Griffin, 1994). Por lo tanto, la caída persistente en la DR de los animales epilépticos se puede atribuir a la pérdida de la vaina de mielina pues se sabe que es la principal estructura que limita la difusividad perpendicular (Song y cols., 2003). En el caso de la DA, ésta presentó un marcado descenso sin variación entre mediciones post-*status epilepticus*, comportamiento que podría atribuirse a una eliminación parcial de los detritus axonales (George y Griffin, 1994; Concha y cols., 2005, 2006). Otra posibilidad es que los resultados obtenidos también pudieran verse afectados, en parte, por la dificultad que representa detectar variaciones de DR en roedores (considerando que DR sólo representa 1/5 de la DA) (Xu y cols., 2008).

Pocos estudios en animales han reportado el hallazgo de una reducción en la FA del sistema fimbria-fórnix. Parekh y cols. (2010) usaron un modelo de estimulación eléctrica hipocámpal y reportaron que la caída en la FA sólo aparece durante la fase aguda de aquellos animales que presentaban crisis epilépticas espontáneas recurrentes. En contraparte, van Eijsden y cols. (2011) usaron el modelo de litio-pilocarpina y únicamente reportaron una reducción en la FA de los animales tras 8 semanas de haber sufrido la inducción del *status epilepticus*. En nuestro caso, usamos el modelo de pilocarpina y observamos que la reducción de la FA fue definitiva e irreversible. Resultado similar a lo reportado en pacientes sometidos a tratamientos resectivos del foco epiléptico y que incluso quedaron libres de crisis epilépticas tras la cirugía (Concha y cols., 2007; McDonald y cols., 2010). Esto sugiere una evolución

anatomo-patológica progresiva de la degeneración Walleriana, la cual al completarse es capaz de arrojar un perfil de difusión caracterizado por alteraciones irreversibles.

Con respecto al coeficiente de difusión aparente (CDA), éste también sigue una dinámica de cambio asociada a los mecanismos fisiopatológicos que prosiguen a la actividad epiléptica. En este sentido, diversos estudios han reportado que durante los primeros 10 minutos post-*status epilepticus*, el valor de CDA es capaz de ascender como consecuencia de una tasa metabólica aumentada (Engelhorn y cols., 2007). Durante las próximas 24 horas se desarrollará el edema citotóxico (caracterizado por una re-distribución del agua extracelular a favor del compartimento intracelular) como consecuencia de la inflamación y las alteraciones en la permeabilidad membranal. Por lo tanto, el valor del CDA disminuirá debido a que el ambiente intracelular es más restrictivo al movimiento de las moléculas de agua a causa de las barreras que representan los orgánulos y las interacciones electrostáticas de las macromoléculas intracelulares (Nakasu y cols., 1995; Wang y cols., 1996; Gass y cols., 2001; Fabene y cols., 2003; Engelhorn y cols., 2007; Concha y cols., 2012). Otros reportes también atribuyen esta reducción en el valor del CDA al incremento en la tortuosidad del espacio extracelular, la cual es consecuencia de los cambios en la viscosidad de la matriz y la proliferación e inflamación astrocítica y microglial (Wall y cols., 2000). Siete días post-*status epilepticus*, el valor del CDA vuelve a incrementarse tras la aparición del edema vasogénico (caracterizado por un incremento en el contenido neto de agua y daño en la barrera hematoencefálica, lo cual trae como consecuencia una salida masiva de proteínas al espacio intersticial, así como una expansión del volumen extracelular y un aumento de la presión intracerebral) (Gass y cols., 2001; Yu y Tan, 2008). Finalmente, la muerte neuronal asociada a la degeneración Walleriana y la gliosis modularán un ligero incremento en el valor del CDA pues la ruptura en la citoarquitectura otorgará más libertad a la difusión (Pierpaoli y cols., 2001; Concha y cols., 2007, 2012; Yu y Tan, 2008; Nguyen y cols., 2011).

Similar a lo reportado en otros estudios longitudinales que comprendieron períodos entre 7 días y 18 meses post-*status epilepticus* (Righini y cols, 1994; Nakasu y cols., 1995; Wang y cols, 1996), los valores de CDA que obtuvimos a nivel de fimbria en los puntos temporales analizados no mostraron diferencias entre sujetos epilépticos y sujetos control.

Probablemente debido a que el incremento esperado en el CDA ocasionado por la pérdida axonal y la degeneración de la vaina de mielina, sea contrarrestado por la acumulación de detritus axonales y la proliferación glial, lo cual restringiría el movimiento global de la difusión (Werring y cols., 2000). Además, hay que considerar que el CDA es un promedio de los coeficientes de difusión en los 3 ejes principales, por lo que perderá sensibilidad debido a que los decrementos en el eje mayor de la difusión (DA) serán compensados por los incrementos en los ejes menores ortogonales (DR) (Beaulieu y cols., 1996).

8.1.2. CÍNGULO

Pacientes con ELT fármacorresistente presentan una reducción bilateral en los valores de FA a nivel del cíngulo tanto antes como después de realizado el procedimiento quirúrgico; hallazgo correlacionado con la presencia de esclerosis hipocampal (Concha y cols., 2005, 2007, 2009; McDonald y cols., 2010; Scanlon y cols., 2013; Li y cols., 2019). Este decremento en la FA, modulado por un incremento en la DR, también ha sido relacionado con daño axonal y mielínico (similar a lo reportado en fórnix) (Concha y cols., 2005, 2007, 2009). En nuestro caso, el cíngulo de los animales epilépticos registró un perfil de difusión de daño axonal crónico, caracterizado por un valor de FA reducido como consecuencia de una disminución en el valor de DA. Sin embargo, no se observaron incrementos significativos en la DR (Anexo 2). Esto probablemente debido a la dificultad para percibir cambios en este parámetro en roedores (Xu y cols., 2008). Si consideramos que el cíngulo es un fascículo primario del sistema límbico carente de una conexión directa con el hipocampo, otros mecanismos deben ser los responsables de los cambios registrados a nivel de la sustancia blanca. Uno de los mecanismos sugeridos involucra la propagación de descargas epilépticas repetidas en fascículos distantes, perturbando los procesos de remielinización y provocando degeneración axonal secundaria (Garbelli y cols., 2012; Deleo y cols., 2018).

8.1.3. CUERPO CALLOSO Y CÁPSULA INTERNA

Múltiples estudios realizados en pacientes con ELT han reportado una anisotropía reducida en la rodilla (Gross y cols., 2006; Concha y cols., 2009; Scanlon y cols., 2013; Li y cols., 2019), el cuerpo (Concha y cols., 2009; McDonald y cols., 2010; Scanlon y cols., 2013; Li y cols., 2019) y el esplenio (Arfanakis y cols., 2002; Concha y cols., 2007; Scanlon y cols., 2013) del cuerpo calloso. Estos resultados demuestran que hay un daño cerebral generalizado

y que no sólo las fibras comisurales que conectan ambos lóbulos temporales se encuentran afectadas. Por el contrario, van Eijsden y cols. (2011) no reportaron diferencias significativas en la FA de ratas epilépticas; aunque sí muestran decrementos en los valores de DA y CDA, así como alteraciones a nivel histológico.

Con respecto a la cápsula interna, pocos estudios se han enfocado en su análisis. Scanlon y cols. (2013) reportaron una anisotropía reducida, ipsilateral a la esclerosis hipocampal. Otros estudios han reportado incrementos post-quirúrgicos asociados a la capacidad plástica de las redes del lenguaje y la memoria (Yogarajah y cols., 2010; Li y cols., 2019).

En este trabajo, con el fin de evaluar el efecto que tiene el *status epilepticus* y las crisis epilépticas espontáneas recurrentes sobre la conectividad global, analizamos la porción medial del cuerpo caloso y la cápsula interna. El resultado obtenido demuestra que ambas estructuras presentan un perfil de difusión de daño axonal crónico, con una caída en la FA dependiente de una DA reducida. Estos cambios podrían ser el reflejo de una mielinización alterada relacionada a daño axonal, alteraciones en la permeabilidad membranal y una densidad reducida del empaquetamiento neuronal; todo inducido por la propagación de la actividad epiléptica.

8.1.4. HIPOCAMPO

La capacidad deductiva sobre la citoarquitectura de la sustancia gris que ofrece el modelo de tensor aplicado a imágenes sensibles a difusión es limitada. Esto debido a que los cambios microestructurales involucran cuerpos neuronales, axones, dendritas, células gliales y vasos sanguíneos. Esta heterogeneidad estructural confiere una alta dificultad para dilucidar los cambios que ocurren en regiones como el hipocampo (Sierra y cols., 2015). Sin embargo, a pesar de dichas limitantes, pudimos observar la totalidad del hipocampo dorsal y del giro dentado, apreciándose un perfil de difusión post-*status epilepticus* marcado por un incremento significativo de la anisotropía.

El efecto a nivel de giro dentado se puede atribuir al nacimiento de fibras musgosas que, por su disposición regular y orientación preferencial en las capas granular y molecular, restringen

y re-direccionan a la difusión en sentido paralelo a las mismas (Kim y cols., 2004; Kuo y cols., 2008; Parekh y cols., 2010). Esta idea se sustenta en la correlación positiva que existe entre las regiones que presentan mayor anisotropía y aquellas con mayor positividad a la tinción de Timm (técnica que permite la detección de terminales de fibras musgosas ricas en Zinc) (Kuo y cols., 2008; Parekh y cols., 2010). Aquí es importante recordar que la formación de circuitos excitadores recurrentes, mediados por el nacimiento de fibras musgosas, tiene un rol fundamental en el proceso epileptogénico (Scharfman y cols., 2000). Similar a lo que ocurre con las alteraciones en la difusión del sistema fimbria-fórnix, estos brotes axonales sólo se observan en sujetos que desarrollan crisis epilépticas espontáneas recurrentes (Parekh y cols., 2010) y su detección se correlaciona con la frecuencia y severidad de dichas crisis (Nadler y cols., 2003). Otros cambios epileptogénicos tales como la gliosis y la neurodegeneración han sido descartados como responsables de los cambios en la anisotropía (Immonen y cols., 2008; Parekh y cols., 2010). Es importante resaltar que, aunque los incrementos en la anisotropía del giro dentado se han reportado como progresivos en la fase crónica (Salo y cols., 2017), nosotros no observamos patrones de progresión en la FA.

A nivel de hipocampo dorsal, éste sufrió cambios muy evidentes de forma y tamaño. Esto nos llevó a cuantificar su volumen, confirmando una franca disminución bilateral. Estos cambios en volumen, aunados a la muerte de neuronas piramidales a nivel de CA3, a la dispersión granular, y al acortamiento de la *fascia dentata*, nos permitieron confirmar la presencia de esclerosis hipocampal (Jackson y cols., 1990; Seidenberg, 2005; Blümcke y cols., 2013). Aunque las evaluaciones longitudinales realizadas en el volumen del hipocampo dorsal de ambos grupos mostraron diferencias significativas a lo largo del tiempo, tales cambios se pueden atribuir al ritmo de crecimiento normal de los animales control. En contraposición, en los animales epilépticos otros factores como la muerte neuronal, la gliosis y los cambios en la matriz extracelular pudieran también estar involucrados. Cabe mencionar que, el incremento significativo en el valor de anisotropía registrado en esta región cerebral pudiera verse influenciado por los intensos cambios reportados a nivel de giro dentado.

La región de CA3 resultó ser una de las áreas más vulnerables al mostrar cambios histológicos compatibles con un alto grado de muerte de neuronas piramidales. La muerte

neuronal y los brotes axonales a nivel de CA3 son hallazgos frecuentes que aparecen después de la inducción del *status epilepticus* (Fujikawa, 1996; Liu y cols., 1999). En esta región se han reportado incrementos progresivos en la anisotropía dependientes de los cambios en los axones mielinizados y procesos astrocíticos (Salo y cols., 2017). Sin embargo, nuestros resultados no revelaron diferencias significativas en la anisotropía entre grupos. Es probable que esta observación se deba a la orientación heterogénea de las fibras, ya que a diferencia de la orientación preferencial que adoptan las fibras musgosas en el giro dentado, en CA3 los nuevos axones no muestran una orientación preferente (Kim y cols., 2004). Así, los brotes axonales desorientados, la muerte neuronal y la proliferación astrocítica darán a la región CA3 una re-organización más heterogénea reflejada en un menor incremento en la anisotropía.

8.2. CAMBIOS HISTOLÓGICOS SECUNDARIOS A LA INDUCCIÓN DE *STATUS EPILEPTICUS* EN EL MODELO DE PILOCARPINA

La microscopía electrónica ha permitido el análisis del fórnix removido quirúrgicamente de pacientes con ELT refractaria, describiéndose una densidad axonal disminuida y alteraciones en la vaina de mielina; hallazgos correlacionados a una anisotropía reducida como consecuencia de una DA disminuida y una DR aumentada (Ozdogmus y cols., 2009; Concha y cols., 2010). Esto apoya la idea de que los cambios en el perfil de difusión (principalmente aquéllos que suceden en la fase aguda y luego se consolidan en la fase crónica) se deben a procesos que tienen lugar en el espacio extra-axonal. El presente estudio confirma que la disminución de la densidad axonal (inferida por el perfil de difusión alterado) se presenta en asociación a una morfología elongada y adelgazada de la fimbria; efecto observado tanto en las imágenes obtenidas por resonancia magnética como por microscopía. Con respecto a las alteraciones en la vaina de mielina, también influyeron en los resultados imagenológicos e histológicos obtenidos. Similar a lo reportado por van Eijsden y cols. (2011), también observamos una impregnación débil de la tinción Luxol Fast Blue y un patrón fibrilar laxo en la fimbria de los sujetos epilépticos.

La muerte segmentaria de las neuronas piramidales (característica de la esclerosis hipocampal) ha sido propuesta como una de las principales causas de la degeneración Walleriana del sistema fimbria-fórnix (Kuzniecky y cols., 1999; Concha y cols., 2009). Por

lo tanto, la muerte de neuronas piramidales y no piramidales de CA1 y CA3, así como la degeneración anterógrada de los axones eferentes que surgen de estas áreas y se integran al fórnix, serán las responsables de los cambios observados tanto a nivel clínico como experimental (Turski y cols., 1983; Concha y cols., 2005; Parekh y cols., 2010; van Eijsden y cols., 2011; Curia y cols., 2014). En nuestro caso, los animales epilépticos sólo presentaron pérdida de neuronas piramidales a nivel de CA3. Dada la magnitud de los cambios observados, otras regiones además del *cornus ammonis* podrían estar involucradas. Un posible candidato es el subículo debido a su contribución de fibras eferentes hacia el sistema fimbria-fórnix y a la pérdida neuronal previamente descrita por algunos autores que usaron el modelo de pilocarpina (Swanson y Cowan, 1977; Knopp y cols., 2008).

8.3. CAMBIOS MICROESTRUTURALES INFERIDOS POR IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN *EX VIVO*

El análisis *ex vivo* ofrece múltiples ventajas como: 1) Una mejor relación señal ruido, 2) una mayor resolución espacial y 3) menores artefactos de movimiento. La comparación entre los resultados *in vivo* y *ex vivo* nos permitió confirmar las tendencias de cambio que obtuvimos en los parámetros evaluados (FA, DR y DA) de las regiones cerebrales seleccionadas tanto de sustancia gris como de sustancia blanca. En resumen, las diversas condiciones a las cuales fue expuesto el tejido cerebral (extracción, fijación, cambios de temperatura, encogimiento secundario a un menor espacio extracelular, incoherencia intravóxel debido al componente sanguíneo capilar), no alteraron los comportamientos de las métricas ya mencionadas, sólo sus magnitudes (Sun y cols., 2003).

En contraparte, el CDA sí se vio afectado. Posiblemente debido a las bajas temperaturas del tejido fijado (Sun y cols., 2005). Con respecto a los valores elevados que presentaron los cerebros epilépticos tanto a nivel de sustancia gris como de sustancia blanca, esto tal vez se deba a que la microestructura se encuentra menos organizada como consecuencia de la muerte neuronal y de la degeneración Walleriana; es decir, menos barreras que limiten la difusión libre de las moléculas de agua (Sun y cols., 2005).

9. CONCLUSIÓN

El modelo del tensor es la herramienta analítica más usada en imagenología sensible a difusión para estudiar la microestructura de la sustancia blanca y gris. Los cambios en los parámetros de difusión descritos en las secciones previas podrían en algún momento usarse como biomarcadores imagenológicos de epileptogénesis. Sin embargo, estos parámetros resultan de la suma de las características estructurales de distintos elementos del tejido nervioso (como cuerpos neuronales, axones, dendritas, células gliales, matriz extracelular y vasos sanguíneos). Por ello, el desarrollo y la implementación de nuevos modelos analíticos, así como la combinación con otras técnicas imagenológicas, bioquímicas, genéticas, inmunológicas, moleculares y funcionales, que permitan discernir las contribuciones de cada componente del sistema nervioso es imprescindible. A la fecha, la imagenología por resonancia magnética ha enriquecido la comprensión de las alteraciones microestructurales y funcionales que caracterizan el proceso epileptogénico y la epilepsia *per se*, evolucionando la perspectiva de una enfermedad limitada a un foco epiléptico a la de una enfermedad con una distribución más sistémica y con afectaciones que van desde un nivel celular hasta un nivel de redes.

De esta forma el presente trabajo, se suma a la literatura ya existente, que señala a los cambios imagenológicos identificados en el fórnix y asociados a los cambios anatomopatológicos hipocampales, como posibles biomarcadores de epileptogénesis. Igualmente, la dependencia temporal de los cambios observados con la evolución de procesos neurodegenerativos podría extender su utilización como biomarcadores de progresión del padecimiento. En lo concerniente, a los cambios identificados en estructuras extra-límbicas estos pudieran tener aplicaciones para evaluar el grado de extensión del daño y, por lo tanto, ser empleados como biomarcadores de monitorización y severidad del trastorno. Lo anterior, permitiría emprender intervenciones terapéuticas más tempranas y enfocar los tratamientos de una forma más individualizada.

10. REFERENCIAS

A

- Alarcón, G. & Valentín, A. (2010). Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. En: Atlas of epilepsies. 1st edition (pp. 1171-76). London, England. Springer Science & Business Media.
- Amaral, D.G. & Kurz, J. (1985). An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol.* 240(1), 37-59.
- Amaral, D. & Lavenex, P. (2007). Hippocampal neuroanatomy. En: The hippocampus book. 1st edition (pp. 37-114). New York, United States of America. Oxford University Press.
- Anand, K.S. & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease. An overview. *Ann Indian Acad Neurol.* 15(4), 239-46.
- Andersson, J.L.R. & Sotiropoulos, S.N. (2016). An integrated approach to correction for off-resonance effects and subject movement in diffusion MR imaging. *Neuroimage.* 125, 1063-78.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A. & Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 15, 961-73.
- Arida, R.M., Scorza, F.A. Peres, C.A. & Cavalheiro, E.A. (1999). The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 34, 88-107.
- Arfanakis, K., Haughton, V.M., Carew, J.D., Rogers, B.P., Dempsey, R.J. & Meyerand, M.E. (2002). Diffusion tensor MR imaging in diffuse axonal injury. *AJNR Am J Neuroradiol.* 23 (5), 794-802.
- Arroyo, S., Brodie, M.J., Avanzini, G., Baumgartner, C., Chiron, C., Dulac, O., French, J.A., & Serratosa, J.M. (2002) Is refractory epilepsy preventable? *Epilepsia.* 43 (4). 437-44.
- Arvanov, V.L., Holmes, K.H., Keele, N.B. & Shinnick-Gallager, P. (1995). The functional role of metabotropic glutamate receptors in epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the rat amygdala slice. *Brain Res.* 669 (1), 140-44.
- Arzimanoglou, A., Hirsch, E., Nehlig, A., Castelnaud, P., Gressens, P. & Pereira de Vasconcelos, A. (2002). Epilepsy and neuroprotection: a illustrated review. *Epileptic Disord.* 3, 173-82.
- Asproдини, E.K., Rainnie, D.G. & Shinnick-Gallagher, P. (1992). Epileptogenesis reduces the sensitivity of presynaptic gamma-aminobutyric acid B receptors on glutamatergic afferents in the amygdala. *J Pharmacol Exp Ther.* 262, 1011-21.

B

- Banerjee, P.N., Filippi, D. & Hauser W.A. (2009). The descriptive epidemiology of epilepsy- a review. *Epilepsy Res,* 85 (1), 31-45.
- Basser, P.J., Mattiello, J. & LeBihan, D. (1994). MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J.* 66. 259-67.
- Bean, B.P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci.* 8, 451-65.

- Beaulieu, C., Does, M.D., Snyder, R.E. & Allen, P.S. (1996). Changes in water diffusion due to Wallerian degeneration in peripheral nerve. *Magn Reson Med.* 36(4), 627-31.
- Belaroussi, B., Milles, J., Carme, S., Zhu, Y.M. & Benoit-Cattin. (2006). Intensity non-uniformity correction in MRI: Existing methods and their validation. *Med Image Anal.* 10, 234-46.
- Beirowski, B., Nogradi, A., Babetto, E., Garcia-Alias, G. & Coleman, M.P. (2010). Mechanisms of axonal spheroid formation in central nervous system Wallerian degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 69, 455-72.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D., Plouin, P. & Scheffer, I.E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51 (4), 676-685.
- Bernasconi A. (2006). Magnetic resonance imaging in intractable epilepsy: focus on structural image analysis. *Adv Neurol.* 97, 273-78.
- Biagini, G., Baldelli, E., Longo, D., Pradelli, L., Zini, I., Rogawski, M.A. & Avoli, M. (2006). Endogenous neurosteroids modulate epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol.* 201, 519-24.
- Blair, R.D. (2012). Temporal lobe epilepsy semiology. *Epilepsy Res Treat.* 751510, 1-10.
- Blümcke, I., Becker, A.J., Klein, C., Scheiwe, C., Lie, A.A., Beck, H., Waha, A., Friedl, M.G., Kuhn, R., Emson, P., Elger, C. & Wiestler, O.D. (2000). Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: Correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59(1), 1-10.
- Blümcke, I. & Spreafico, R. (2012). Cause matters: a neuropathological challenge to human epilepsies. *Brain Pathol.* 22, 347-49.
- Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D.D., Bartolomei, F., Bernasconi, A., Bernasconi, N., Bien, C.G., Cendes, F., Coras, R., Cross, J.H., Jacques, T.S., Kahane, P., Mathern, G.W., Miyata, H., Moshé, S.L., Oz, B., Ozkara, C., Perucca, E., Sisodiya, S., Wiebe, S., y Spreafico, R. (2013). International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia.* 54 (7). 1315-29.
- Bragin, A., Wilson, C.L. & Engel, J. Jr. (2000). Chronic epileptogenesis requires development of a network of pathologically interconnected neuron cluster: a hypothesis. *Epilepsia.* 41 (Suppl. 6), 144-52.
- Bradford, H.F. (1995). Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol.* 47, 477-511.
- Brodie, M.J., Zuberi, S.M., Sheffer, I.E. & Fisher R.S. (2018). The 2017 ILAE classification of seizure types and the epilepsies: what do people with epilepsy and their caregivers need to know? *Epileptic Disord.* 20 (2), 77-87.
- Buzsáki, G., Ponomareff, G.L., Bayardo, F., Ruiz, R. & Gage, F.H. (1989). Neuronal activity in the subcortically denervated hippocampus: a chronic model for epilepsy. *Neuroscience.* 28 (3), 527-38.
- Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron.* 33, 325-40.

C

- Carlson, H., Ronne-Engstrom, E., Ungerstedt, U. & Hillerid, L. (1992). Seizure related elevations of extracellular aminoacids in human focal epilepsy. *Neurosci Lett.* 140, 30-32.
- Cavalheiro, E.A., Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Turski, W.A. Ikonomidou, C. & Turski, L. (1991). Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia.* 32, 778-82.
- Cavalheiro, E.A. (1995). The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci.* 16, 33-7.
- Cavazos, J.E., Das, I. & Sutula, T.P. (1994). Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci.* 14 (5), 3106-21.
- Cavazos, J.E., Jones, S.M. & Cross, D.J. (2004). Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience.* 126 (3), 677-88.
- Cavus, I., Kasoff, W.S., Cassaday, M.P., Jacob, R., Gueorguieva, R., Sherwin, R.S., Krystal, J.H., Spencer, D.D. & Abi-Saab, W.M. (2005). Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Ann Neurol.* 57 (2), 226-35.
- Chamberlin, N.L., Traub, R.D. & Dingledene, R. (1990). Role of EPSPs in initiation of spontaneous synchronized burst firing in rat hippocampal neurons bathed in high potassium. *J Neurophysiol.* 64, 1000-06.
- Chronister, R.B. & Hardy, S.G.P. (2003). Sistema límbico. En: Principios de neurociencia. 2ª edición (pp. 493-504). Madrid, España. Elsevier.
- Coleman, M.P. & Perry, V.H. (2002). Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci.* 25 (10), 532-37.
- Colom, L.V., Castaneda, M.T., Reyna, T., Hernandez, S. & Garrido-Sanabria, E. (2005). Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse.* 58 (3), 151-64.
- Colom, L.V., García-Hernández, A., Castañeda, M.T., Perez-Cordova, M.G. & Garrido-Sanabria, E.R. (2006). Septo-hippocampal networks in chronically epileptic rats: Potential antiepileptic effects of theta rhythm generation. *J Neurophysiol.* 95, 3645-53.
- Concha, L., Beaulieu, C., & Gross, D.W. (2005). Bilateral limbic diffusion abnormalities in unilateral temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* 57, 188-96.
- Concha, L., Gross, D.W., Wheatley, B.M., & Beaulieu, C. (2006). Diffusion tensor imaging of time-dependent axonal and myelin degradation after corpus callosotomy in epilepsy patients. *Neuroimage.* 32, 1090-99.
- Concha, L., Beaulieu, C., Wheatley, B.M., & Gross, D.W. (2007). Bilateral white matter diffusion changes persist after epilepsy surgery. *Epilepsia.* 48(5):931-40.
- Concha, L., Beaulieu, C., Collins, D.L. & Gross, D.W. (2009). White-matter diffusion abnormalities in temporal-lobe epilepsy with and without mesial temporal sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 80. 312-19.
- Concha, L., Livy, D.J., Beaulieu, C., Wheatley, B.M., & Gross, D.W. (2010). In vivo diffusion tensor imaging and histopathology of the fimbria-fornix in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci.* 30 (3), 996-1002.
- Concha, L., Kim, H., Bernasconi, A., Bernhardt, B.C. & Bernasconi, N. (2012). Spatial patterns of water diffusion along white matter tracts in temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 79, 455-62.

- Coras, R. & Blümcke, I. (2015). Clinico-pathological subtypes of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy and their differential impact on memory impairment. *Neuroscience*. 309, 153-61.
- Covolan, L. & Mello, L.E. (2000). Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res.* 39 (2), 133-52.
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R.S.G. & Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*. 172, 143-57.
- Curia, G., Lucchi, C., Vinet, J., Gualtieri, F., Marinelli, C., Torsello, A., Costantino, L. & Biagini, G. (2014). Pathophysiology of mesial temporal lobe epilepsy : Is prevention of damage antiepileptogenic ? *Curr Med Chem*. 21, 663-688.

D

- Daitz, H. (1953). Note on the fibre content of the fornix system in man. *Brain*. 76 (3), 509-12.
- Dalby, N.O. & Mody, I. (2001). The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. *Curr Opin Neurol*. 14, 187-92.
- De Boer, H.M., Mula, M. & Sander J.W. (2008). The global burden and stigma of epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 12, 540-46.
- Deleo, F., Thom, M., Concha, L., Bernasconi, A., Bernhardt, B.C. & Bernasconi, N. (2018) Histological and MRI markers of white matter damage in focal epilepsy. *Epilepsy Res*. 140, 29-38.
- Dityatev, A. & Fellin, T. (2008). Extracellular matrix in plasticity and epileptogenesis. *Neuron Glia Biol*. 4 (3), 235-47.
- Dong, X.X., Wang, Y. & Qin, Z.H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 30 (4), 379-87.
- Dudek, F.E. & Staley, K.J. (2011). The time course of acquired epilepsy: Implications for therapeutic intervention to suppress epileptogenesis. *Neurosci Lett*. 497, 240-6.
- During, M.J. & Spencer, D.D. (1993). Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet*. 341, 1607-10.
- Dutar, P., Bassant, M.H., Senut, M.C. & Lamour, Y. (1995). The septohippocampal pathway: Structure and Function of a central cholinergic system. *Physiol Rev*. 75 (2), 393-27.
- Ellerkmann, R.K., Remy, S., Chen, J., Sochivko, D., Elger, C.E., Urban, B.W., Becker, A. & Beck, H. (2003). Molecular and functional changes in voltage-dependent Na⁺ channels following pilocarpine-induced status epilepticus in rat dentate granule cells. *Neuroscience*. 119, 323-33.
- Eid, T., Thomas, M.J., Spencer, D.D., Rundén-Pran, E., Lai, J.C.K., Malthankar, G.V., Kim, J.H., Danbolt, N.C., Ottersen, O.P. & de Lanerolle, N.C. (2004). Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet*. 363, 28-37.
- Engel, J.Jr. (1996). Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 26 (1), 141-50.
- Engel, J.Jr., Williamson, P.D., & Wieser, H.G. (2008) Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. En: *Epilepsy: a comprehensive textbook*. 2nd edition. (pp. 2479-86) Philadelphia, United States of America. Lippincott, Williams and Wilkins.

- Engel, J.Jr. (2001). Mesial temporal lobe epilepsy: What have we learned? *Neuroscientist*. 7 (4). 340-52.
- Engelhorn, T., Hufnagel, A., Weise, J., Baehr, M. & Doerfler, A. (2007). Monitoring of acute generalized status epilepticus using multilocal diffusion MR imaging: Early prediction of regional neuronal damage. *Am J Neuroradiol*. 28, 321-7

F

- Fabene, P.F., Marzola, P., Sbarbati, A., & Bentivoglio, M. (2003). Magnetic resonance imaging of changes elicited by status epilepticus in the rat brain: diffusion-weighted and T2-weighted and T2-weighted images, regional blood volume maps, and direct correlation with tissue and cell damage. *Neuroimage*. 18. 375-89.
- Fazel S., Wolf A., Langström, N., Newton, C.R. & Lichtenstein, P. (2013). Premature mortality in epilepsy and the role of psychiatric comorbidity: a total population study. *Lancet*. 382, 1646-54.
- Fernandes, M.J.S., Naffah-Mazzacoratti, M.G. & Cavalheiro, E.A. (1996). Na⁺K⁺ATPase in the rat hippocampus: A study in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Int*. 28, 497-500.
- Ferencz, I., Kokaia, M., Keep, M., Elmér, E., Metsis, M., Kokaia, Z. & Lindvall, O. (1997). Effects of cholinergic denervation on seizure development and neurotrophin messenger RNA regulation in rapid hippocampal kindling. *Neuroscience*. 80(2), 389-99.
- Ferencz, I., Leanza, G., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Kokaia, M. & Lindvall, O. (2001). Septal cholinergic neurons suppress seizure development in hippocampal kindling in rats: Comparison with noradrenergic neurons. *Neuroscience*. 102(4), 819-32.
- Fisher, R.S. & Frost, J.J. (1991). Epilepsy. *J Nucl Med*. 32, 651-59.
- Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P. & Engel, J.Jr. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46 (4), 470-472.
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J.Jr., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M. & Wiebe, S. (2014). A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55 (4), 475-82.
- Fisher, R.S., Cross, J.H., French, J.A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L., Peltola, J., Roulet, E., Scheffer, I.E. & Zuberi, S.M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 58(4), 522-30.
- Follasa, P., Tarantino, A., Floris, S., Mallei, A., Porta, S., Tuligi, G., Cagetti, E., Caddeo, M., Mura, A., Serra, M. & Biggio, G. (1999). Changes in the gene expression of GABAA receptor subunit mRNAs in the septum of rats subjected to pentylentetrazol-induced kindling. *Brain Res Mol Brain Res*. 70(1), 1-8.
- Forsgren L., Bucht, G., Eriksson, S. & Bergmark L. (1996). Incidence and clinical characterization of unprovoked seizures in adults: a prospective population-based study. *Epilepsia*. 37(3), 224-29.
- Freund, T.F. & Antal, M. (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*. 336 (6195), 170-3

- Fritsch, G. & Hitzing, E. (1870). Über die elektrische Erregbarkeit des Grosshirns. *Arch Anat Physiol.* 37, 300-32.
- Frotscher, M. & Léránth, C. (1985). Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 239 (2), 237-46.
- Fujikawa, D.G. (1996). The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 725, 11-22.
- Funke, M.G., Costa, M.S., Amado, D., Cavalheiro, E.A. & Naffah-Mazzacoratti, M.G. (2003). Calcium homeostasis and temporal lobe epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr.* 61, 8-14.

G

- Gales, J.M., Jehi, L., Nowacki, A. & Prayson, R.A. (2017). The role of histopathologic subtype in the setting of hippocampal sclerosis-associated mesial temporal lobe epilepsy. *Hum Pathol.* 63, 79-88.
- Gaitatzis A. & Sander J.W. (2004). The mortality of epilepsy revisited. *Epileptic Disord.* 6, 3-13.
- Garrido Sanabria, E.R., Castañeda, M.T., Banuelos, C., Perez-Cordova, M.G., Hernandez, S. & Colom, L.V. (2006). Septal GABAergic neurons are selectively vulnerable to pilocarpine-induced status epilepticus and chronic spontaneous seizures. *Neuroscience.* 142(3), 871-83.
- Garbelli, R., Milesi, G., Medici, V., Villani, F., Didato, G., Deleo, F., D'Incerti, L., Morbin, M., Mazzoleni, G., Giovagnoli, A.R., Parente, A., Zucca, I., Mastropietro, A. & Spreafico, R. (2012). Blurring in patients with temporal lobe epilepsy: clinical, highfield imaging and ultrastructural study. *Brain.* 135 (Pt. 8), 2337-49.
- Gass, A., Niendorf, T. & Hirsch, J.G. (2001). Acute and chronic changes of the apparent diffusion coefficient in neurological disorders—Biophysical mechanisms and possible underlying histopathology. *J Neurol Sci.* 186, S15-23.
- Gaykema, R.P.A., van der Kuil, J. Hersh, L.B. & Luiten, P.G.M. (1991). Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-diagonal band complex: anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunohistochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience.* 43 (2-3), 349-60.
- George, R., & Griffin, J.W. (1994). Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiclotomy model. *Exp Neurol.* 129, 225-36.
- Gloor, P., Salanova, V. Olivier, A. & Quesney, L.F. (1993). The human dorsal hippocampal commissure. *Brain,* 116 (Pt 5), 1249-73.
- Goffin, K., Nissinen, J., Van Laere, K. & Pitkänen, A. (2007). Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *Exp Neurol.* 205, 501-5.
- Gross, D.W., Concha, L. & Beaulieu, C. (2006). Extratemporal white matter abnormalities in mesial temporal lobe epilepsy demonstrated with diffusion tensor imaging. *Epilepsia.* 47 (8), 1360-3

H

- Hangya, B., Borhegyi, Z., Szilágyi, N., Freund, T.F. & Varga, V. (2009). GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *J Neurosci.* 29(25), 8094-102.
- Hauser W.A., Annegers, J.F. & Kurland L.T. (1993). Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia.* 34(3), 453-68.
- Hauser, W.A. (2008). Epidemiology of acute symptomatic seizures. En: *Epilepsy: a comprehensive textbook*. 2nd edition (pp. 71-75). Philadelphia, United States of America. Lippincott, Williams and Wilkins.
- Horsley, V. (1886). Brain surgery. *BMJ.* 2, 670-75.
- Houser, C.R. (1990). Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 535(2), 195-204.
- Huh, C.Y.L., Goutagny, R. & Williams, S. (2010). Glutamatergic neurons of the mouse medial septum and diagonal band of Broca synaptically drive hippocampal pyramidal cells: Relevance for hippocampal theta rhythm. *J Neurosci.* 30 (47), 15951-61.

I

- ILAE Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1981). Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia.* 22, 489-501.
- ILAE Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1985). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia.* 26(3), 268-78.
- Immonen, R.J., Kharatishvili, I., Sierra, A., Einula, C., Pitkänen, A. & Gröhn, O.H. (2008). Manganese enhanced MRI detects mossy fiber sprouting rather than neurodegeneration, gliosis or seizure-activity in the epileptic rat hippocampus. *Neuroimage.* 40(4), 1718-30.
- Isokawa, M. (1998). Remodeling dendritic spines in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett.* 258, 73-76.
- Itoh, T., Satou, T., Nishida, S., Hashimoto, S. & Hiroyuki Ito. (2007). Immature and mature neurons coexist among glial scars after rat traumatic brain injury. *Neurol Res.* 29, 734-42.

J

- Jackson, J.H. (1870). A study of convulsions. *Transactions of the St. Andrews Medical Graduates Association.* 3, 162-204. (Reprinted in Taylor J. Selected Writings of John Hughlings Jackson. Vol. 1. London: Staples Press; 1958: 8-36).
- Jackson, J.H. (1932). Selected Writings, 2 vol. London: Hodder & Stoughton.
- Jackson, G.D., Berkovic, S.F., Tress, B.M., Kalnins, R.M., Fabinyi, G.C. & Bladin, P.F. (1990). Hippocampal sclerosis can be reliably detected by magnetic resonance imaging. *Epilepsia.* 40(12), 1869-75.
- Jefferys, J.G.R. (2010). Advances in understanding basic mechanisms of epilepsy and seizures. *Seizure.* 19, 638-46.
- Jørgensen, M.R., Finsen, B.R., Jensen, M.B., Castellano, B., Diemer, N.H. & Zimmer, J. (1993). Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp Neurol.* 120, 70-88.

K

- Kamphius, W., Gorter, J.A. & da Silva, F.L. 1991. A long-lasting decrease in the inhibitory effect of GABA on glutamate responses of hippocampal pyramidal neurons induced by kindling epileptogenesis. *Neuroscience*. 41, 425-31.
- Kerschensteiner, M., Schwab, M.E., Lichtman, J.W. & Misgeld, T. (2005). In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med*. 11, 572-77.
- Kiernan, J.A. (2007). Histochemistry of staining methods for normal and degenerating myelin in the central and peripheral nervous systems. *J Histotechnol*. 30, 87-106.
- Kim, J.A., Koyama, R., Yamada, R.X., Yamada, M.K. Nishiyama, N., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. (2004). Environmental control of the survival and differentiation of dentate granule neurons. *Cereb Cortex*. 14(12), 1358-64.
- Kitchigina, V.F. & Butuzova, M.V. (2009). Theta activity of septal neurons during different epileptic phases: the same frequency but different significance? *Exp Neurol*. 216 (2), 449-58.
- Kitchigina, V., Popova, I., Sinelnikova, V., Malkov, A., Astasheva, E., Shubina, L. & Aliev, R. (2013). Disturbances of septohippocampal theta oscillations in the epileptic brain: Reasons and consequences. *Exp Neurol*. 247, 314-27
- Klüver, H. & Barrera, E. (1953). A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 12 (4), 400-3.
- Knopp, A., Frahm, C., Fidzinski, P., Witte, O.W. & Behr, J. (2008). Loss of GABAergic neurons in the subiculum and its functional implications in temporal lobe epilepsy. *Brain*. 131, 1516-27.
- Kullman, D.M. 2002. The neuronal channelopathies. *Brain*. 125, 1177-95.
- Kuo, L.W., Lee, C.Y., Chen, J.H., Wedeen, V.J., Chen, C.C. Liou, H.H. & Tseng, W.Y. (2008). Mossy fiber sprouting in pilocarpine-induced status epilepticus rat hippocampus: a correlative study of diffusion spectrum imaging and histology. *Neuroimage*. 41(3), 789-800.
- Kuzniecky, R., Bilir, E., Gilliam, F., Faught, E., Martin, R. & Hugg, J. (1999). Quantitative MRI in temporal lobe epilepsy: evidence for fornix atrophy. *Neurology*. 53 (3), 496-501.
- Kuzniecky, R., y Jackson G. (2004). Temporal lobe epilepsy. En: Magnetic resonance in epilepsy. 2nd edition. (pp. 99-176) New York. Elsevier.

L

- Lai, C.W. & Lai, Y.H. (1991). History of epilepsy in Chinese traditional medicine. *Epilepsia*. 32 (3), 299-302.
- Latarjet, M. & Ruiz Liard, A. (2007). Encéfalo. Generalidades y definiciones. En: Anatomía humana (Tomo 1). 4^a edición. (pp. 154- 202). Buenos Aires, Argentina. Editorial médica panamericana.
- Le Duigou, C., Holden, T. & Kullmann, D.M. (2011). Short- and long-term depression at glutamatergic synapses on hippocampal interneurons by group I mGluR activation. *Neuropharmacology*. 60, 748-56.
- Lee, M.G. Chrobak, J.J., Sik, A., Wiley, R.G. & Buzsáki, G. (1994). Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience*. 62 (4), 1033-47.

- Leite, J.P. & Cavalheiro, E.A. (1995). Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. *Epilepsy Research*. 20, 93-104.
- Lemos, T. & Cavalheiro, E.A. (1995). Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res*. 102, 423-8.
- Li, W., An, D., Tong, X., Liu, W., Xiao, F., Ren, J., Niu, R., Tang, Y., Zhou, B., Lei, D., Jiang, Y., Luo, C., Yao, D., Gong, Q. & Zhou, D. (2019). Different patterns of white matter changes after successful surgery of mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroimage Clin*. 21, 101631.
- Lillis, K.P., Wang, Z., Mail, M., Zhao, G.Q., Berdichevsky, Y., Bacskai, B. & Staley, K.J. (2015). Evolution of Network Synchronization during early epileptogenesis parallels synaptic circuit alterations. *J Neurosci*. 35 (27), 9920-34.
- Liu, M., Gross, D.W., Wheatley, B.M., Concha, L. & Beaulieu, C. (2013). The acute phase of Wallerian degeneration: Longitudinal diffusion tensor imaging of the fornix following temporal lobe surgery. *Neuroimage*. 74, 128-139.
- Liu, Z., Nagao, T., Desjardins, G.C., Gloor, P. & Avoli, M. (1994). Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures. *Epilepsy Res*. 17, 237-47.
- Liu, Z., Yang, Y., Silveira, D.C., Sarkisian, M.R. Tandon, P. Huang, L.T., Stafstrom, C.E. & Holmes, G.L. (1999). Consequences of recurrent seizures during early brain development. *Neuroscience*. 92(4), 1443-54.
- Llinas, R.R. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science*. 242, 1654-64.
- Lowenstein, D.H. (2015). Seizures and Epilepsy. En: Harrison's principles of internal medicine. 19th edition. (pp. 2542-2559). United States of America. Mc Graw-Hill Education.
- Löscher, W. (2005). How to explain multidrug resistance in epilepsy? *Epilepsy Curr*. 5, 107-12.
- Löscher, W. & Schmidt, D. (2011). Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia*. 52 (4), 657-78.
- Löscher, W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 20, 359-68.
- Lübke, J., Deller, T. & Frotscher, M. (1997). Septal innervation of mossy cells in the hilus of the rat dentate gyrus: an anterograde tracing and intracellular labeling study. *Exp Brain Res*. 114(3), 423-32
- Luna-Munguia, H., Orozco-Suarez, S. & Rocha, L. (2011). Effects of high frequency electrical stimulation and R-Verapamil on seizures susceptibility and glutamate and GABA release in a model of phenytoin-resistant seizures. *Neuropharmacology*. 807-14.
- Luna-Munguía, H., Starski, P., Chen, W., Gliske, S. & Stacey, W.C. (2017). Control of in vivo ictogenesis via endogenous synaptic pathways. *Sci Rep*. 7, 1311. 1-13.

M

- Maccaferri, G., Mangoni, M., Lazzari, A. & DiFrancesco, D. (1993). Properties of the hyperpolarization activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol*. 69, 2129-36.

- MacDonald, R.L. & Mody, I. (2008). GABAA and GABAB receptor-mediated inhibitory synaptic transmission. En: *Epilepsy: a comprehensive textbook*. 2nd edition (pp. 246-52). United States of America. Lippincott Williams & Wilkins.
- Makris, G. (1995). Zur Epilepsie in Byzanz. *Byzantinische Zeitschrift*. 88(2), 363-404.
- Manyam, B.V. (1992) Epilepsy in ancient India. *Epilepsia*. 33(3), 473-5.
- Marchi, N., Angelov, L., Masaryk, T., Fazio, V., Granata, T., Hernandez, N., Hallene, K., Diglaw, T., Franic, L., Najm, I. & Janigro, D. (2007a). Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia*. 48 (4), 732-42.
- Marchi, N., Oby, E., Batra, A., Uva, L., De Curtis, M., Hernandez, N., Van Boxel-Dezaire, A., Najm, I. & Janigro, D. (2007b). InVivo and In Vitro Effects of pilocarpine: Relevance to ictogenesis. *Epilepsia*. 48, 1934-46.
- Mathern, G.W., Babb, T.L., Vickrey, B.G. Melendez, M. & Pretorius, J.K. (1995). The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain*. 118 (Pt. 1), 105-18.
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Leite, J.P., Kornblum, H.I., Mendoza, D., Lozada, A. & Bertram III, E.H. (1998a). Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res*. 32, 154-71.
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Leite, J.P., Kornblum, H.I., Mendoza, D., Lozada, A. & Bertram III, E.H. (1998b). Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res*. 32, 154-71.
- Mathern, G.W., Mendoza, D., Lozada, A., Pretorius, J.K., Dehnes, Y., Danbolt, N.C., Nelson, N., Leite, J.P., Chimelli, L., Born, D.E., Sakamoto, A.C., Assirati, J.A., Fried, I., Peacock, W.J., Ojemann, G.A. & Adelson, P.D. (1999). Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 52, 453-72.
- Mathern, G.W., Wilson, C.L. & Beck, H. (2008). Hippocampal sclerosis. En: *Epilepsy: a comprehensive textbook*. 2nd edition (pp. 121-136). Philadelphia, United States of America. Lippincott, Williams and Wilkins.
- McBain, C.J. (1995). Hippocampal inhibitory neuron activity in the elevated potassium model of epilepsy. *J Neurophysiol*. 73 (2), 2853-63.
- McDonald, C.R., Hagler Jr., D.J., Girard, H.M., Pung, C., Ahmadi, M.E., Holland, D., Patel, R.H., Barba, D., Tecoma, E.S., Iragui, V.J., Halgren, E. & Dale, A.M. (2010). Changes in fiber tract integrity and visual fields after anterior temporal lobectomy. *Neurology*. 75, 1631-8.
- McIntyre, D.C. & Schwartzkroin, P.A. (2008). Limbic Anatomy and Physiology. En: *Epilepsy: a comprehensive textbook*. 2nd edition. (pp. 337-52) Philadelphia, United States of America. Lippincott, Williams and Wilkins.
- Meinardi H., Scott R.A., Reis R. & Sander J.W. AS, on behalf of the ILAE Commission on the Developing World. (2001). The treatment gap in epilepsy: the current situation and ways forward. *Epilepsia*. 42, 136-49.
- Méndez, P. & Bacci, A. (2011). Assortment of GABAergic plasticity in the cortical interneuron melting pot. *Neural Plast*. 2011, 1-9.
- Miller, J.W., Turner, G.M. & Gray, B.C. (1994). Anticonvulsant effects of experimental induction of hippocampal theta activity. *Epilepsy Res*. 18, 185-204.

- Morimoto, K., Fahnestock, M. & Racine, R.J. (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol.* 73, 1-60.
- Moshé, S.L., Perucca, E., Ryvlin P. & Tomson, T. (2015) Epilepsy: new advances. *The Lancet.* 385 (9971), 884-98.
- Mott, D.D., Xie, C.W., Wilson, W.A., Swartzwelder, H.S. & Lewis, D.V. (1993). GABAB autoreceptors mediate activity-dependent disinhibition and enhance signal transmission in the dentate gyrus. *J Neurophysiol.* 69(3), 674-91.

N

- Nadler, J.V. (2003). The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochem Res.* 28, 1649-58.
- Nakasu, Y., Nakasu, S., Morikawa, S., Uemura, S., Inubushi, T. & Handa, J. (1995). Diffusion-weighted MR in experimental sustained seizures elicited with kainic acid. *Am J Neuroradiol.* 16, 1185-92.
- Nashef L., So E.L., Ryvlin P. & Tomson T. (2012). Unifying the definitions of sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsia.* 53, 227-33.
- Nair, D.R., Mohamed, A., Burgess, R., y Luders, H. (2004). A critical review of the different conceptual hypotheses framing human focal epilepsy. *Epileptic Disord.* 6 (2), 7-83.
- Neligan A., Bell, G.S., Shorvon, S.D. & Sander, J.W. (2010). Temporal trends in the mortality of people with epilepsy: a review. *Epilepsia.* 51, 2241-46.
- Ngugi, A.K., Bottomley C., Kleinschmidt I., Sander J.W. & Newton C.R. (2010). Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia.* 51, 883-90.
- Nguyen, D., Vargas, M.I., Khaw, N., Seeck, M., Delavelle, J., Lovblad, K.O. & Haller, S. (2011). Diffusion tensor imaging analysis with tract-based spatial statistics of the white matter abnormalities after epilepsy surgery. *Epilepsy Res.* 94, 189-97.

O

- Olafsson E., Ludvigsson P., Gudmundsson, G., Hersdorffer, D., Kjartansson, O. & Hauser, W.A. (2005). Incidence of unprovoked seizures and epilepsy in Iceland and assessment of the epilepsy syndrome classification: a prospective study. *The Lancet Neurology.* 4(10), 627-34.
- Organización Mundial de la Salud. (2006). Epilepsy. En: Neurological disorders: public health challenges, Geneva. World Health Organization (pp. 56-69). Sitio web: <http://www.who.int/iris/handle/10665/43605>
- Organización Mundial de la Salud. Epilepsia: Nota descriptiva. Fecha de recuperación: Febrero de 2019 de la URL, sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
- Organización Panamericana de la Salud. (2013). Informe sobre la epilepsia en América Latina y el Caribe. Washington, DC.
- Ozdogmus, O., Cavdar, S., Ersoy, Y., Ercan, F. & Uzun, I. (2009). A preliminary study, using electron and light-microscopic methods, of axon number in the fornix in autopsies of patients with temporal lobe epilepsy. *Anat Sci Int.* 84, 2-6.

P

- Parekh, M.B., Carney, P.R., Sepulveda, H., Norman, W., King, M., y Mareci, T.H. (2010). Early MR diffusion and relaxation changes in the parahippocampal gyrus precede the onset of spontaneous seizures in an animal model of chronic limbic epilepsy. *Exp Neurol.* 224(1), 258-70.
- Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H, Sloviter, R.S. & Lowenstein, D.H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 17 (10), 3727-38.
- Pierpaoli, C., Barnett, A., Pajevic, S., Chen, R., Penix, L., Virta, A. & Basser, P. (2001). Water diffusion changes in wallerian degeneration and their dependence on white matter architecture. *Neuroimage.* 13, 1174-85.
- Pitkänen, A. & Sutula, T.P. (2002). Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol.* 1, 173-81
- Pitkänen, A. & Lukasiuk, K. (2009). Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav.* 14, 16-25.
- Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Dudek, F.E. & Staley, K.J. (2015). Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 5 (10), 1-17
- Pitkänen, A., Ndode-Ekane, X.E., Lapinlampi, N. & Puhakka, N. (2019). Epilepsy biomarkers – Toward etiology and pathology specificity. *Neurobiol Dis.* 123, 42-58.
- Powell, T.P.S., Guillery, R.W. & Cowan, W.M. (1957). A quantitative study of the fornix-mamillo-thalamic system. *J Anat.* 91(Pt 4), 419-37.
- Proper, E.A., Hoogland, S.M., Kappen, S.M., Jansen, G.H., Rensen, M.G.A., Schrama, L.H., van Veelen, C.W.M., van Rijen, P.C., van Nieuwenhuizen, O., Gispen, W.H. & de Graan, P.N.E. (2002). Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patient with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain.* 125, 32-43.
- Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. & Armed Forces Institute of Pathology (1992). Neuropathological histotechnology. En: Laboratory methods in histotechnology (pp. 81-104). Washington, D.C., United States of America. American Registry of Pathology.

R

- Racine, R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 32, 281-94.
- Richerson, G.B. & Wu, Y. (2004) Role of the GABA transporter in epilepsy. En: Binder D.K., Sharfman H.E. (eds). Recent advances in epilepsy research in experimental medicine and biology, vol 548. Springer, Boston, MA.
- Rigau, V., Morin, M., Rousset, M.C., De Bock, F., Lebrun, A., Coubes, P., Picot, M.C., Baldy-Moulinier, M., Bockaert, J., Crespel, A. & Lerner-Natoli, M. (2007). Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain.* 130, 1942-56.
- Righini, A., Pierpaoli, C., Alger, J.R. & Di Chiro, G. (1994). Brain parenchyma apparent diffusion coefficient alterations associated with experimental complex partial status epilepticus. *Magn Reson Imaging.* 12 (6), 865-71.
- Rubio, F. (2016). Epilepsia: un problema de salud pública. Desarrollo histórico y conceptual. En: Epilepsia. 3ª edición. (pp. 1-16). México, editorial alfil.

S

- Salo, R.A., Miettinen, T., Laitinen, T., Gröhn, O. & Sierra, A. (2017). Diffusion tensor MRI shows progressive changes in the hippocampus and dentate gyrus after status epilepticus in rat – histological validation with Fourier-based analysis. *Neuroimage*. 152, 221-36.
- Sander, J.W. (2003). The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol*. 16, 165-70.
- Scanlon, C., Mueller, S.G., Cheong, I., Hartig, M., Weiner, M.W. & Laxer, K.D. (2013). Grey and white matter abnormalities in temporal lobe epilepsy with and without mesial temporal sclerosis. 260 (9), 2320-9.
- Scharfman, H.E., Goodman, J.H. & Sollas, A.L. (2000). Granule-like at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci*. 20 (16), 6144-58.
- Scharfman, H.E., Goodman, J.H., Sollas, A.L. & Croll, S.D. (2002). Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol*. 174 (2), 201-14.
- Scharfman, H.E. (2007). The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci*. 7 (4), 348-54.
- Scheffer, I.E, Berkovic S., Capovilla, G., Connolly, M.B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D.R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang Y.H. & Zuberi, S.M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 58 (4), 512-21.
- Scorza, F.A., Arida, R.M., Naffah-Mazzacoratti, M.G., Scerni, D.A., Calderazzo, L. & Cavalheiro, E.A. (2009). The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc*, 81(3), 345-65.
- Segal, M. (1988). Synaptic activation of a cholinergic receptor in the rat hippocampus. *Brain Res*. 452, 79-82.
- Seidenberg, M., Kelly, K.G., Parrish, J., Geary, E., Dow, C., Rutecki, P. & Hermann, B. (2005). Ipsilateral and contralateral MRI volumetric abnormalities in chronic unilateral temporal lobe epilepsy and their clinical correlates. *Epilepsia*. 46 (3), 420-30.
- Sierra, A. Gröhn, O. & Pitkänen, A. (2015). Imaging microstructural damage and plasticity in the hippocampus during epileptogenesis. *Neuroscience*. 309, 162-72.
- Sloviter, R.S. (1987). Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*. 235, 73-6
- Sloviter, R.S. (1991). Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*. 1(1) 41-66.
- Sloviter, R.S., Zappone, C.A., Harvey, B.D. & Frotscher, M. (2006). Kainic acid-induced recurrent mossy fiber innervation of dentate gyrus inhibitory interneurons: possible anatomical substrate of granule cell hyper-inhibition in chronically epileptic rats. *J Comp Neurol*. 494, 944-60.
- Somjen, G.G. (2002). Ion regulation in the brain: implication for pathophysiology. *Neuroscientist*. 8, 254-67.

- Song, S.K., Sun, S.W., Ju, W.K., Lin, S.J., Cross, A.H. & Neufeld, A.H. (2003). Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia. *Neuroimage*. 20, 1714-22.
- Sotty, F., Danik, M., Manseau, F., Laplante, F., Quirion, R. & Williams, S. (2003). Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol*, 551(Pt 3), 927-43.
- Staley, K. (2015). Molecular mechanisms of epilepsy. *Nature Neuroscience*. 18 (3), 367-72.
- Stevens, D.R. & Cotman, C.W. (1986). Excitatory amino acid antagonist depress transmission in hippocampal projections to the lateral septum. *Brain Res*. 382(2), 437-40.
- Stuart, G., Spruston, N., Sakmann, B. & Hausser, M. (1997). Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci*. 20, 125-31.
- Sutula, T., He, X.X., Cavazos, J. & Scott, G. (1988). Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science*. 239, 1147-50.
- Sun, S.W., Neil, J.J. & Song, S.K. (2003). Relative indices of water diffusion anisotropy are equivalent in live and formalin-fixed mouse brains. *Magn Reson Med*. 50(4), 743-8.
- Sun, S.W., Neil, J.J., Liang, H.F., He, Y.Y., Schmidt, R.E. Hsu, C.Y. & Song, S.K. (2005). Formalin fixation alters water diffusion coefficient magnitude but not anisotropy in infarcted brain. *Magn Reson Med*. 53(6), 1447-51.
- Swanson, L.W. & Cowan, W.M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol*. 172 (1), 49-84.
- Swanson, L.W. & Cowan, W.M. (1979). The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol*. 186(4), 621-55.

T

- Tang, F.R. & Lee, W.L. (2001) Expression of the group II and III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurocytol*. 30(2),137-43.
- Teles-Grilo Ruivo, L.M. & Mellor, J.R. (2013). Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Front Synaptic Neurosci*. 5:2, 1-15.
- Temkin, O. (1971). The falling sickness: a history of epilepsy from the Greeks to the beginnings of modern neurology. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- Thurman, D.J., Beghi, E., Begley, C.E., Berg, A.T., Buchalter, J.R., Ding, D., Hesdorffer, D.C., Hauser, W.A., Kazis, L., Kobau, R., Kroner, B., Labiner, D., Liow, K., Logroscino, G., Medina, M.T., Newton, C.R., Parko, K., Paschal, A., Preux, P.M., Sander, J.W., Selassie A., Theodore, W., Tomson, T. & Wiebe, S. (2011). ILAE Epidemiology commission report. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia*. 52 (Suppl. 7), 2-26.
- Tóth, K., Borhegyi, Z. & Freund, T.F. (1993). Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *J Neurosci*. 13 (9), 3712-24.

- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z. & Turski, L. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 9. 315-35.

U

- Unal, G., Joshi, A., Viney, T.J., Kis, V. & Somogyi, P. (2015). Synaptic targets of medial septal projections in the hippocampus and extrahippocampal cortices of the mouse. *J neurosci.* 35(48), 15812-26.

V

- Vaillend, C., Mason, S.E., Cuttle, M.F. y Alger, B.E. 2002. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na⁺-K⁺-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. *J Neurophysiol.* 88, 2963-78.
- van der Hel, W.S., Notenboom, R.G.E, Bos, I.W.M., van Rijen, P.C., van Veelen, C.W.M., & de Graaf, P.N.E. (2005). Reduced glutamine synthetase in hippocampal areas with neuron loss in temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 64, 326-33.
- van Eijsden, P., Otte, W.M., van der Hel, W.S., van Nieuwenhuizen, O., Dijkhuizen, R.M., de Graaf, R.A., y Braun, K.P.J. (2011). In vivo diffusion tensor imaging and ex vivo histologic characterization of white matter pathology in a post-status epilepticus model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 52 (4). 841-45.
- Veliskova, J. (2006). Behavioural characterization of seizures in rats. En: Models of seizures and epilepsy, (pp. 601-11). Burlington: Elsevier Academic Press.
- Veraart, J., Fieremans, E. & Novikov, D.S. (2016a). Diffusion MRI noise mapping using random matrix theory. *Magn Res Med.*76(5), 1582-93.
- Veraart, J., Novikov, D.S., Christiaens, D., Ades-aron, B., Sijbers, J. & Fieremans, E. (2016b). Denoising of diffusion MRI using random matrix theory. *Neuroimage.* 142. 394-406.
- Verhaert, K. & Scott, R.C. (2010). Acute symptomatic epileptic seizures. En: Atlas of epilepsies. 1st edition (pp. 69-78). London, England. Springer Science & Business Media.
- Vezzani, A., French, J., Bartfai, T. & Baram T.Z. (2011) The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 7 (1), 31-40.

W

- Wall, C.J., Kendall, E.J. & Obenaus, A. (2000). Rapid alterations in diffusion-weighted images with anatomic correlates in a rodent model of status epilepticus. *Am J Neuroradiol.* 21, 1841-52.
- Wang, Y., Majors, A., Najm, I., Xue, M., Comair, Y., Modic, M. & C. Ng, T. (1996). Postictal alteration of sodium content and apparent diffusion coefficient in epileptic rat brain induced by kainic acid. *Epilepsia.* 37 (10), 1000-6.
- Werring, D.J., Toosy, A.T, Clark, C.A., Parker, G.J.M., Barker, G.J., Miller, D.H. & Thompson, A.J. (2000). Diffusion tensor imaging can detect and quantify corticospinal tract degeneration after stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 69, 269-72.
- Wiebe, S., Blume, W.T., Girvin, J.P. & Eliasziw, M. (2001). A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med.* 345 (5). 311-18.

- Wilson, J.V.K. & Reynolds, E.H. (1990). Text and documents. Translation and análisis of cuneiform text forming part of a Babylonian treatise on epilepsy. *Med Hist.* 34, 185-98.
- Wolf, P. (2014). History of epilepsy: nosological concepts and classification. *Epileptic Disor.* 16 (3), 261-9.
- Wyss, J.M., Swanson, L.W. & Cowan, W.M. (1980). The organization of the fimbria, dorsal fornix and ventral hippocampal commissure in the rat. *Anat Embryol.* 158 (3), 303-16.

X

- Xu, J., Sun, S.W., Naismith, R.T., Snyder, A.Z., Cross, A.H. & Song, S.K. (2008). Assessing optic nerve pathology with diffusion MRI: from mouse to human. *NMR Biomed.* 21, 928-40.

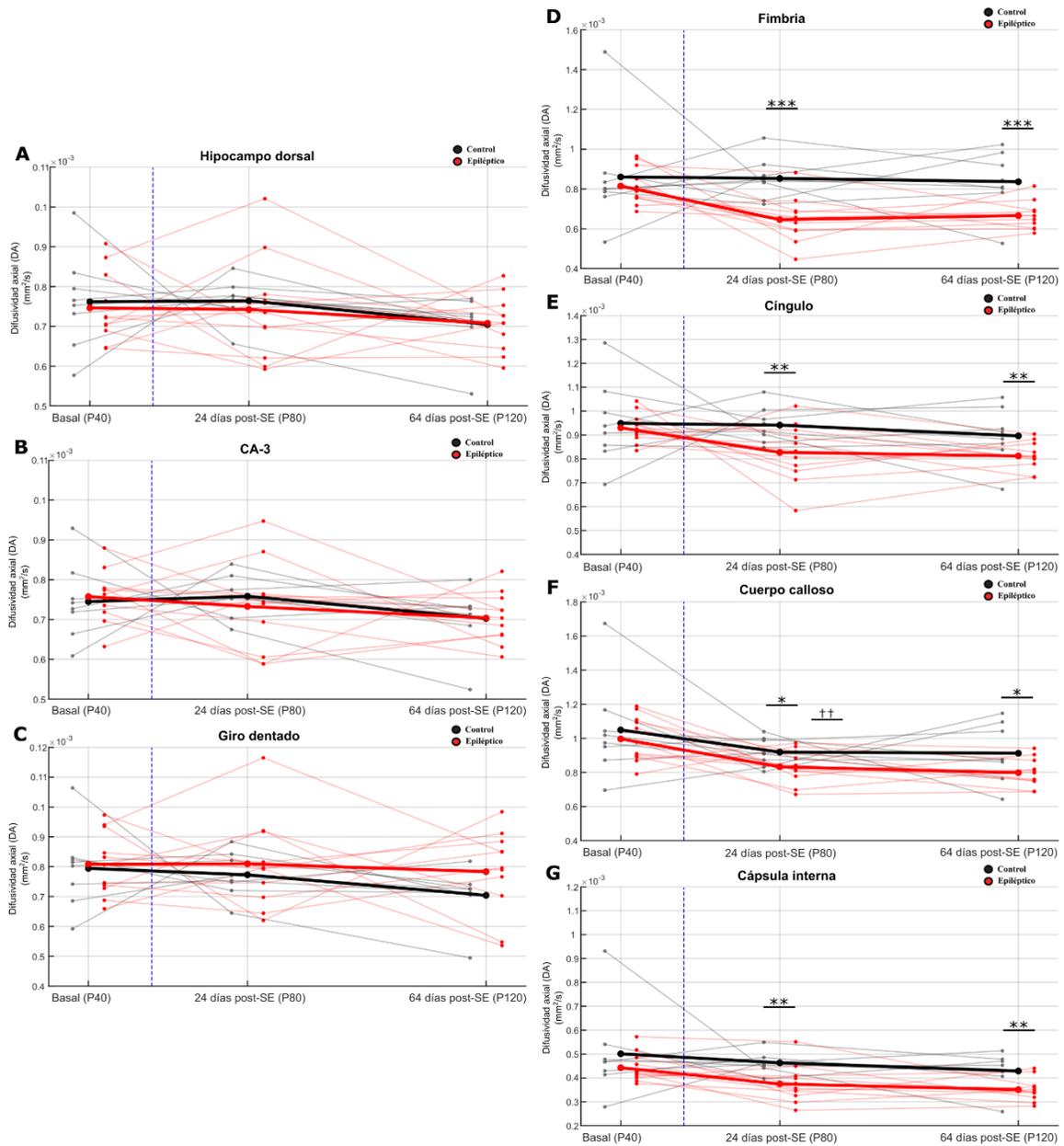
Y

- Yang, S., Liu, Z.W., Wen, L., Qiao, H.F., Zhou, W.X. & Zhang, Y.X. (2005). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated current but inhibits excitatory synaptic transmission. *Brain Res.* 1034, 172-9.
- Yogarajah, M., Focke, N.K., Bonelli, S.B., Thompson, P., Vollmar, C. McEvoy, A.W., Alexander, D.C., Symms, M.R., Koepp, M.J. & Duncan, J.S. (2010). The structural plasticity of white matter networks following anterior temporal lobe resection. *Brain.* 133 (Pt 8), 2348-64.
- Yu, J.T. & Tan, L. (2008). Diffusion-weighted magnetic resonance imaging demonstrates parenchymal pathophysiological changes in epilepsy. *Brain Res Rev.* 59, 34-41

Z

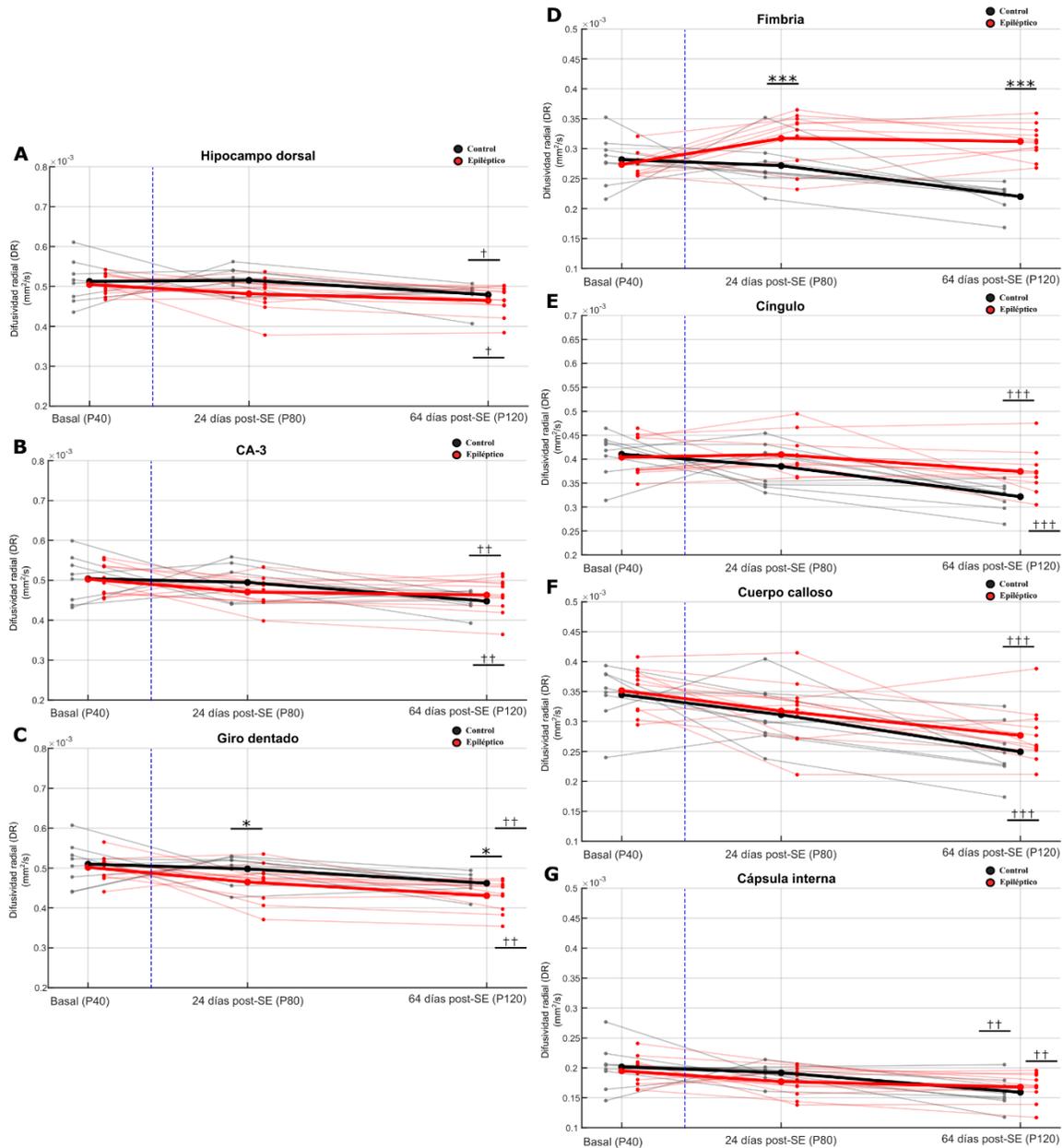
- Zhang, L. & McBain C.J. (1995). Potassium conductances underlying repolarization and after hyperpolarization in rat CA1 hippocampal interneurons. *J Physiol.* 488 (Pt.3), 661-72.

11. ANEXOS



Anexo 1. Cambios longitudinales en la difusividad axial (DA) de estructuras tanto de sustancia gris (hipocampo dorsal (A), CA3 (B) y giro dentado (C)) como de sustancia blanca (fimbria (D), cíngulo (E), cuerpo calloso (F) y cápsula interna (G)) del grupo control (negro) y epiléptico (rojo). Las líneas tenues representan a cada uno de los individuos que integran los grupos; las líneas gruesas representan la media de cada grupo. La línea punteada en azul indica el momento de la inducción del *status epilepticus*. La comparación entre grupos indica una diferencia significativa en fimbria ($***p <$

0.001), cíngulo (** $p < 0.01$), cuerpo calloso (** $p < 0.05$) y cápsula interna (** $p < 0.05$). La comparación longitudinal en cuerpo calloso entre P40 y P80 muestra diferencias significativas ($\dagger\dagger p < 0.01$).



Anexo 2. Cambios longitudinales en la difusividad radial (DR) de estructuras tanto de sustancia gris (hipocampo dorsal (A), CA3 (B) y giro dentado (C)) como de sustancia blanca (fimbria (D), cíngulo (E), cuerpo calloso (F) y cápsula interna (G)) del grupo control (negro) y epiléptico (rojo). Las líneas tenues representan a cada uno de los individuos que integran los grupos; las líneas gruesas representan la media de cada grupo. La línea punteada en azul indica el momento de la inducción del *status*

epilepticus. La comparación entre grupos indica una diferencia significativa en giro dentado ($*p < 0.05$) y fimbria ($*p < 0.001$). La comparación longitudinal entre la medición basal vs P80 y P120 muestra diferencias significativas en el grupo control y epiléptico en hipocampo dorsal ($^{\dagger}p < 0.05$), CA3 ($^{\dagger\dagger}p < 0.01$), giro dentado ($^{\dagger\dagger}p < 0.01$), cíngulo ($^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$), cuerpo calloso ($^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$) y cápsula interna ($^{\dagger\dagger}p < 0.01$).