



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**Organización y características funcionales de la glía de Bergmann en un
modelo experimental de displasia cortical**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Cynthia Alejandra Rodríguez Arzate

Tutor principal

Dr. Ataúlfo Martínez Torres
Instituto de Neurobiología, UNAM

Comité Tutor

Dr. Jorge Antonio Larriva Sahd
Instituto de Neurobiología, UNAM

Dr. Arturo Hernández Cruz
Instituto de Fisiología, UNAM

Querétaro, Qro., México, 2022



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.

RESUMEN

Las displasias corticales son alteraciones en la organización de las capas del cerebro debido a problemas en la migración neuronal durante el desarrollo. La glía de Bergmann es esencial para la migración neuronal durante el desarrollo y, en la vida adulta, la transmisión glutamatérgica mediada por estas células es importante para que las células de Purkinje ejecuten el control de movimientos finos. El componente neuronal ha sido ampliamente estudiado en modelos experimentales de displasias corticales, en contraste, se sabe muy poco sobre cómo se ve afectada la glía. El objetivo de este estudio fue caracterizar la morfología y la dinámica del calcio intracelular de la glía de Bergmann y los astrocitos del cerebelo y sus modificaciones en el modelo de displasia cortical inducida por carmustina. Para ello, se trataron con carmustina ratones GFAP-GFP en el día 13 embrionario y se evaluó su coordinación motora y equilibrio en la vida adulta. Se clarificó el cerebelo de ratones tratados con carmustina y se observó bajo un microscopio de hoja de luz para determinar los sitios de displasias corticales. La técnica de Golgi-Cox reveló la morfología de la glía de Bergmann y los astrocitos. Por medio de microscopía de epifluorescencia se determinaron los eventos transitorios espontáneos de calcio en rebanadas de cerebelo y en astrocitos de cerebelo en cultivo primario.

Las pruebas motoras revelaron deficiencias en la coordinación. La microscopía fluorescente de hoja de luz mostró la presencia de displasias corticales y heterotopias principalmente en el lóbulo X del cerebelo. La morfología de la glía de Bergmann y los astrocitos se vio afectada, al igual que los transitorios espontáneos de calcio, que incrementaron su actividad en ambos grupos celulares, los astrocitos mantenidos *in vitro* se vieron afectados en su red de sincronización global.

Este trabajo muestra cómo la morfología y función del componente glial del cerebelo es severamente afectado en un modelo de displasia cortical y sienta las bases para futuros experimentos en los que se aborde farmacológicamente la función glial para mitigar los efectos de la desorganización funcional de la corteza del cerebelo.

ABSTRACT

Cortical dysplasias are alterations in the organization of the layers of the brain due to problems in neuronal migration during development. Bergmann glia is essential for neuronal migration during development, and in adult life the glutamatergic transmission mediated by these cells is important for Purkinje cells to execute the control of fine movements. The neuronal component has been widely studied in experimental models of cortical dysplasias, in contrast very little is known about how glia is affected. The aim of this study was to characterize the morphology and intracellular calcium dynamics of the Bergmann glia and astrocytes of cerebellum and its modifications in the model of cortical dysplasia induced by carmustine. Mice (GFAP-eGFP) treated with carmustine in embryo day 13 were evaluated in adult life for motor coordination and balance. Whole cerebellum from BCNU mice were clarified and observed under a light sheet microscope to determine the sites of cortical dysplasias. The Golgi-Cox technique revealed the morphology of Bergmann glia and astrocytes. Calcium imaging in slices and in astrocytes from cerebellum *in vitro* determined the spontaneous calcium transients.

Motor tests revealed deficiencies in coordination. Light sheet fluorescent microscopy showed the presence of cortical dysplasias and heterotopias on the lobule X. Morphology of Bergmann cells and astrocytes was affected, as were their spontaneous calcium transients in slice preparation and *in vitro*.

This work shows how the morphology and function of the glial component of the cerebellum is severely affected in a model of cortical dysplasia and lays the foundations for future experiments in which glial function is approached pharmacologically to mitigate the effects of functional disorganization of the cerebellum cortex.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular (D15) del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Ataúlfo Martínez Torres. Contó con el apoyo de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM No. de cuenta: 517024313. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Becario: 620212, Fondos para investigación: A1S7659, Red de biofónica: F0003-2018-03-244910. PAPIIT-DGAPA-UNAM IN204520.

AGRADECIMIENTOS

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Instituto de Neurobiología (INB)

Tutor

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Comité Tutor

Dr. Jorge Antonio Larriva Sahd

Dr. Arturo Hernández Cruz

Miembros del jurado de examen de grado

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Dr. Luis Concha Loyola

Dra. Mónica Andrea López Hidalgo

Laboratorio de Neurobiología Molecular y celular D15

Dra. Ángeles Edith Espino Saldaña

Auxiliar de laboratorio Marina Ramírez Romero

Dra. María Alejandra González González

Marianne Lizeth Martínez Mendoza

Dra. Gabriela Gómez González

Dr. Adán Hernández Cruz

Compañeros de laboratorio... A todos!

Bioterio

Dra. Alejandra Castilla León

MVZ. José Martín García Servín

MVZ. María Antonieta Carbajo

Unidad de Microscopía

Dra. Elsa Nydia Hernández Ríos

Ma. Lourdes Palma Tirado

Unidad de Conducta

Dra. Deysi Gasca

Unidad de Videoconferencia

Lic. Lourdes Lara Ayala

Unidad de posgrado y enseñanza

M en C. Leonor Casanova Rico

Dra. Nuri Aranda López

Ma. Del Carmen Mendoza López

Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada (CICESE)

Departamento de Física y Óptica

Laboratorio de óptica

Dr. Israel Rocha Mendoza

Dr. Jacob Licea Mendoza

Yryx Luna Palacios

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Fondos para la investigación: CONACyT A1S7659, Red biofónica F0003-2018-03-244910. Becario: 620212. PAPIIT-DGAPA-UNAM IN204520

Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM

No. de cuenta: 517024313

Gracias a mi familia...

A mis papás Elvis y Rafa, a mis hermanos Dany, Rafa y Pao, a los amores de mi vida Emma y Tavo... porque soy lo que soy gracias a ustedes, a sus esfuerzos y sacrificios, por darme tanto de todo y todo de ustedes. No existen palabras que puedan expresar cuan agradecida me siento por tenerlos conmigo, por el apoyo incondicional que me brindan e impulsarme a querer ir por más. No entiendo nada de esta vida, pero agradezco todo de ella porque están ustedes... Los amo bastante!

INDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Displasia cortical.....	17
2.1.2 Modelos experimentales.....	17
2.1.2.1 Carmustina 1-3-bis-cloroetil-nitrosurea (BCNU).....	19
2.2 Cerebelo.....	20
2.2.2 Anatomía.....	20
2.2.2 Función.....	21
2.2.3 Organización celular.....	22
2.2.3.1 Componente neuronal.....	22
2.2.3.2 Componente glial.....	25
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	31
5. METODOLOGÍA	32
5.1 Materiales.....	32
5.1.1 Manejo de animales.....	32
5.2 Métodos.....	32
5.2.1 Inducción de displasia cortical.....	32
5.2.2 Evaluación de la coordinación motriz y equilibrio.....	33

5.2.3 Técnica CLARITY.....	33
5.2.3.1 Microscopía fluorescente de hoja de luz.....	34
5.2.3.2 Adquisición de imágenes.....	35
5.2.3.3 Procesamiento y reconstrucción de imágenes.....	36
5.2.4 Tinción Golgi-Cox.....	36
5.2.5 Imagen de calcio.....	37
5.2.5.1 Preparación en rebanada.....	37
5.2.5.2 Cultivo primario de astrocitos.....	38
5.2.5.3 Adquisición de imágenes.....	39
5.2.5.4 Análisis de datos.....	39
5.3 Análisis estadístico.....	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1 Evaluación de la coordinación motriz y equilibrio.....	42
6.2 Análisis de displasia cortical en el cerebelo por LSM.....	46
6.3 La carmustina reduce la complejidad morfológica de los astrocitos y las células de Bergmann.....	49
6.4 La carmustina indujo un mayor número de células de Bergmann involucradas en oscilaciones espontáneas de calcio.....	51
6.5 La carmustina indujo una reducción en la complejidad de la morfología de los astrocitos que muestra más oscilaciones de calcio espontáneas <i>in vitro</i>	54
6.6 Las oscilaciones de calcio de los astrocitos <i>in vitro</i> muestran una red de sincronización global interrumpida.....	56
7. DISCUSIÓN.....	60
8. CONCLUSIONES.....	66

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO	67
10. REFERENCIAS	70

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Organización celular de la corteza cerebelar y su circuito.....	28
2. Displasia cortical inducida por carmustina.....	29
3. Efecto de la carmustina en la organización de la glía de Bergmann.....	29
4. Cambios en las protuberancias de la glía de Bergmann.....	30
5. Deficiencias en la coordinación motriz de ratones tratados con carmustina.....	44
6. Análisis de varianza intragrupos en coordinación motriz.....	45
7. Evidencia morfológica de displasia cortical en el cerebelo.....	48
8. El tratamiento con carmustina redujo la complejidad morfológica de la glía de Bergmann y astrocitos.....	50
9. La actividad basal de la glía de Bergmann aumenta en la displasia cortical.....	53
10. Disminución de la complejidad morfológica de los astrocitos tratados con carmustina <i>in vitro</i>	55
11. Actividad basal de astrocitos del cerebelo en cultivo.....	57
12. Sincronización de la red global en astrocitos de cerebelo en cultivo.....	58

Videos

1. Evaluación de la coordinación motriz en equipo Rotarod.....	43
2. Reconstrucción de cerebelo por seccionamiento óptico adquirido con microscopía fluorescente de hoja de luz.....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Modelos experimentales para inducción de displasia cortical.....	18

ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
BCNU	1-3-bis-cloroetil-nitrosurea (carmustina)
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína astrocítica glial fibrilar (por sus siglas en inglés)
GFP	Proteína verde fluorescente (por sus siglas en inglés)
LSFM	Microscopía fluorescente de hoja de luz (por sus siglas en inglés)
NMDA	N-metil-D-aspartato
RAD	Radiación ionizante
SNC	Sistema Nervioso Central
SPIM	Microscopía de iluminación de plano selectivo

1. INTRODUCCIÓN

Las displasias corticales son un tipo de trastorno del desarrollo cerebral que se asocian frecuentemente con manifestaciones clínicas como las convulsiones epilépticas (Luhmann, 2016). Se caracterizan por una organización anormal de las capas del cerebro y la presencia de heterotopias, grupos de células que no son necesariamente disfuncionales sino que se encuentran en posiciones anormales. Diversos factores genéticos y adquiridos dan lugar a displasias corticales, estando involucradas múltiples vías de señalización. Como regulador central de la arquitectura de la corteza en desarrollo, la vía de la diana de rapamicina de mamíferos (mTOR), mantiene la organización y andamiaje de la glía radial, controlando la proliferación celular y el metabolismo en respuesta a una amplia gama de estímulos extracelulares (Li et al., 2015). Mutaciones en los genes de dicha vía modifican la morfología, migración y el comportamiento mitótico celular, dando lugar a una variedad de malformaciones del desarrollo cortical (Andrews et al., 2020), relacionadas con la aparición o desarrollo de enfermedades neurológicas como la epilepsia. Aunque se han propuesto múltiples causas que dan lugar a las displasias corticales y se han revelado varios mecanismos epileptogénicos, actualmente su etiología no está del todo clara. Además, existe escasa información sobre displasias corticales en el cerebelo.

Los modelos experimentales de malformaciones corticales empleados más comúnmente son: 1) físicos: lesión por congelación en neonatos (Jacobs et al., 1996) y exposición a radiación gamma a *in utero* (Roper et al., 1998) y 2) químicos: inyección de ácido iboténico a neonatos (Innocenti & Berbel, 1991), metilación de ácidos nucleicos por metilazoximetanol en ratas preñadas (Germano & Sperber, 1998) y carmustina (Bernardette & Kriegstein, 2002) y, 3) manipulaciones que interfieren con la generación y migración celular (Luhmann, 2016). En este estudio utilizamos el modelo experimental de carmustina, que se administra mediante inyección intraperitoneal a ratonas gestantes.

La carmustina es un agente alquilante del ADN que, como consecuencia, bloquea la división celular. Debido a su alta lipofilicidad, puede penetrar el sistema nervioso central (SNC) (Bernardette & Kriegstein, 2002), interrumpiendo la proliferación de células precursoras dando lugar a malformaciones en la corteza cerebral (Moroni et al., 2008; Bernardette & Kriegstein, 2002; Moroni et al., 2011; Inverardi et al., 2013) y en cerebelo (González-González et al., 2015).

El componente neuronal se ha estudiado ampliamente en modelos experimentales de displasia cortical. Se han reportado varias anomalías en estos modelos, incluida la desorganización laminar, presencia de neuronas citomegálicas, grupos heterotópicos de células

de Cajal-Retzius y neuronas piramidales dismórficas de las capas II y III (Moroni et al., 2008) con alteraciones fisiológicas que mostraban hiperexcitabilidad neuronal y disminución de la sensibilidad al ácido γ -aminobutírico (GABA) (Bernardette & Kriegstein, 2002; Moroni et al., 2011). En el hipocampo, las neuronas heterotópicas tienen una respuesta aumentada al N-metil-D-aspartato (NMDA), lo que genera corrientes iónicas con una constante de tiempo con inactivación reducida (Calcagnotto et al., 2005) y una potenciación a largo plazo aumentado asociado con un aumento de la excitabilidad (Inverardi et al., 2013).

A diferencia de lo que se conoce del componente neuronal, la información sobre cómo las células gliales del cerebro se ven afectadas en la displasia cortical es escasa. Un componente destacado observado en la displasia cortical focal son las células globosas, que expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un filamento intermedio de astrocitos (Roper, 1998). Los astrocitos parecen adaptarse funcionalmente en pacientes con epilepsia intratable asociada con displasia cortical focal, mostrando cambios en la expresión de componentes moleculares críticos para la comunicación neuronal y de astrocitos que están vinculados a modificaciones en la activación de cascadas de calcio intracelular e interacciones neurona-glía que contribuyen a la epileptogénesis (Jacobs et al., 1996). Otro estudio de la función astrocítica relacionada con la displasia cortical mostró una reducción del acoplamiento de las uniones comunicantes (gap) entre astrocitos de la neocorteza displásica inducida por lesiones por congelación (Germano et al., 1998).

El cerebelo es considerado el principal centro de coordinación motora del sistema nervioso central, involucrado en el procesamiento final de los estímulos provenientes de los núcleos cerebelosos, siendo la única vía eferente de la corteza cerebelosa, controlando la señalización motora y modulando procesos cognitivos como el lenguaje, la percepción y memoria espacial (Reeber et al., 2013). La complejidad anatómica y funcional del cerebelo no solo se debe a la gran variedad de células neuronales que se encuentran en él, sino también a la variedad de células astrogliales y oligodendrogliales, las cuales también se caracterizan por tener morfologías y funciones específicas, algunas de las cuales son exclusivas del cerebelo (Buffo & Rossi, 2013).

Las células gliales cerebelosas juegan un papel importante en varios procesos neuronales como la proliferación, migración y diferenciación a lo largo del desarrollo y la maduración (Araujo et al., 2019). Dado que están estrechamente asociadas con las neuronas, están implicadas en la sinaptogénesis, y parecen jugar cierto papel en varias enfermedades neurológicas, entre las que podemos mencionar: la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, epilepsia y accidentes cerebrovasculares y traumáticos (Shigetomi et al., 2019; Zhou et al., 2019).

Los astrocitos representan el tipo más abundante de células gliales en el SNC y participan en múltiples funciones tales como la formación, función y eliminación de las sinapsis (Chung et al., 2015) y la regulación de los circuitos de alimentación hipotalámicos, al estar involucrados en un complejo conjunto de respuestas fisiológicas ligadas al comportamiento y metabolismo (García-Cáceres et al., 2019; Escartin et al., 2021) y en la remodelación morfológica, molecular y funcional en respuesta a una lesión, infección o enfermedad del SNC (Verkhatsky & Nedergaard, 2018; Escartin et al., 2021).

La glía de Bergmann se considera un tipo especializado de astrocito derivado de la glía radial y exclusiva del cerebelo. Esta glía es muy versátil en su función y está altamente integrada en el circuito cerebeloso (De Zeeuw & Hoogland, 2015). La glía de Bergmann se encuentra desde etapas muy tempranas del desarrollo, coordinando la invaginación de los precursores de células granulares con la capa de células de Purkinje y la membrana pial (Leung & Li, 2018), formando un andamio estructural para la migración de células granulares en estado posnatal, así como en el crecimiento dendrítico de las células de Purkinje (Bellamy, 2006), demostrando con ello ser esenciales para la foliación cerebelosa (Leung & Li, 2018). Además, la peculiar morfología que adopta a lo largo de sus procesos, conformada por pequeñas unidades compartimentalizadas independientes, contribuyen con la capacidad de actuar en la remoción de glutamato dando lugar a corrientes sinápticas rápidas y lentas, modulando la eficacia de la transmisión sináptica de un grupo o incluso sinapsis individuales (Marcaggi et al., 2003); participan además en liberación tónica de GABA (Lee et al., 2010) y en la regulación del K^+ extracelular (Wang et al., 2012), dando lugar a una estrecha relación de las neuronas con las que interactúan (De Zeeuw & Hoogland, 2015).

En un estudio previo, encontramos que la carmustina induce cambios dramáticos en la organización de las capas de la corteza del cerebelo y en las células de Bergmann (González-González et al 2015). Más allá de esto, se sabe poco sobre cómo se ve afectada la función de la glía de Bergmann y los astrocitos en este modelo de daño. En el presente estudio mostramos mediante microscopía fluorescente de hoja de luz cómo las folias del cerebelo están desorganizadas en el modelo de displasia cortical inducido por carmustina y proporcionamos evidencia de que la señalización de calcio entre las células gliales es anormal y puede ser una fuente potencial de transmisión sináptica normal interrumpida.

2. ANTECEDENTES

2.1. Displasia Cortical

El término displasia cortical es usado de manera genérica para describir una variedad de malformaciones cerebrales estructurales (Rickert, 2006). Reconocidas por los neuropatólogos desde finales del siglo XIX, las displasias corticales son consideradas un grupo heterogéneo de alteraciones anatómicas, las cuales pueden ser focales o difusas y dependen en gran medida de anomalías surgidas durante el proceso de desarrollo (Spreatico et al., 2002; Inverardi et al., 2013). Dichas anomalías, dan lugar a trastornos que afectan principalmente la proliferación, diferenciación y migración de células neuronales y gliales, lo que produce un tamaño, morfología y posicionamiento celular anormal (Guerrini et al., 2015; Iffland & Crino, 2017).

Las displasias corticales se caracterizan principalmente por poseer laminaciones anormales y la presencia de heterotopias, concepto que se refiere a cúmulos de células que no necesariamente deben ser disfuncionales, sino que se encuentran situadas en una posición anómala, dando lugar a la desorganización de las láminas de la corteza cerebral y cerebelar (Moroni et al., 2005; Rickert, 2006). Potencialmente las lesiones estructurales que afectan la corteza cerebral o cerebelar puede provocar convulsiones y epilepsia (Balestrini et al., 2021). Sin embargo, la semiología de las convulsiones dependerá de otros factores en conjunto además de la displasia (Iffland & Crino, 2017; Balestrini et al., 2021).

De manera colectiva, una gran cantidad de observaciones clínicas han confirmado que pacientes con displasias corticales, incluso con malformaciones corticales discretas, muestran ineficiencias generalizadas en mayor o menor grado también en el desarrollo neurológico, cognitivo y motor (Inverardi et al., 2013). La mayoría de las veces no está claro cómo dichas malformaciones y lesiones estructurales conducen a manifestaciones en la actividad convulsiva, cognitiva y motora. Para ello, se han desarrollado diversos modelos animales que ayuden a comprender los mecanismos de la aparición y patología de las displasias corticales (Luhmann, 2015).

2.1.2 Modelos experimentales

Se han desarrollado varios modelos experimentales para reproducir distintos aspectos de las malformaciones corticales (Moroni et al., 2008). Algunos modelos se basan en lesiones inducidas en cerebros de animales inmaduros por diversos medios: 1) congelación, 2) socavación, 3) irradiación, 4) exposición a teratógeno (Tabla 1).

Tabla 1. Modelos experimentales para inducción de displasia cortical

Modelo de inducción	Especie animal	Características patológicas	Hiperexcitabilidad <i>in vitro</i>	Referencias
Lesión por congelamiento	Rata Ratón	Afectación laminar cortical	Sí	Rosen et al., 1992 Jacobs et al., 1996 Rosen et al., 1998 Jacobs et al., 1999
Radiación <i>in utero</i>	Rata Ratón	Difusa laminación cortical Neuronas heterotópicas	Sí	Algan & Rakic, 1997 Roper, 1998 Marín-Padilla et al., 2003
Metilazoximetanol	Rata Ratón	Afectación laminación cortical Neuronas heterotópicas	Sí	Colacitti et al., 1998 Colacitti et al., 1999 Noctor et al., 1999 Penschuck et al., 2006
Ibotenato neonatal	Rata Ratón Hamster	Afectación laminación cortical Microgiria	Sí	Marret et al., 1995 Redecker et al., 1998 Takano et al., 2004
Carmustina <i>in utero</i> (BCNU)	Rata Ratón	Afectación laminación cortical Microcefalia Neuronas dismórficas Heterotopias	Sí	Bernadete & Kriegstein, 2002 Moroni et al., 2008 Moroni et al., 2011 Moroni et al., 2013

Las lesiones por congelamiento cortical dan como resultado una región focal de microgiria de cuatro capas (Rosen et al., 1992; Jacobs et al., 1996); la irradiación intrauterina o la exposición al acetato de metilazoximetanol causan adelgazamiento y desorganización de la neocorteza y la heterotopia periventricular y del hipocampo (Algan & Rakic, 1997; Roper, 1998; Colacitti et al., 1998; Noctor et al., 1999). Aunque se han propuesto múltiples causas que afectan el desarrollo cortical y se han revelado varios mecanismos epileptogénicos, la etiología de la displasia cortical focal y su relación con las convulsiones crónicas todavía no son claros.

Los modelos experimentales de displasia cortical no replican completamente las características complejas de la patología humana; por lo tanto, se requiere precaución para transferir datos experimentales a trastornos clínicos y patológicos humanos. Sin embargo, a pesar de algunas limitaciones, el desarrollo de nuevos modelos puede proporcionar conocimientos sobre aspectos específicos de la etiopatogenia de la displasia y herramientas experimentales para evaluar la relación causal entre la displasia cortical y la epileptogénesis.

Uno de estos modelos experimentales para inducir displasia cortical se desarrolló para estudiar la fisiología de la corteza displásica (Benardete & Kriegstein, 2002). En este método el fármaco empleado es carmustina, el cual se administra en el útero de ratas preñadas en el día 15 embrionario, induciendo alteraciones en la organización de la corteza. Al igual que otros métodos, la exposición a carmustina conduce a muchas características morfológicas similares a la displasia cortical humana (Bernardet & Kriegstein, 2002).

2.1.2.1 Carmustina 1-3-bis-cloroetil-nitrosurea (BCNU)

La carmustina es un agente alquilante del ADN que afecta la proliferación de precursores neuronales y gliales cuando se administra en un período embrionario crítico. Ésta se administra en el útero de ratas preñadas, induciendo en las crías alteraciones histológicas importantes como adelgazamiento de la corteza, desorganización laminar y heterotopias, además de inducir hiperexcitabilidad cortical y disminuir la sensibilidad neuronal a GABA. (Benardete & Kriegstein, 2002). En dicho estudio además se encontró que las anomalías citoarquitectónicas eran similares a las observadas en la displasia cortical focal humana tipo IIA, caracterizada por la presencia de neuronas dismórficas y ectópicas estando fuertemente asociada con epilepsia intratable (Benardete & Kriegstein, 2002).

En este modelo experimental de displasia cortical, el componente neuronal se ha estudiado ampliamente. En el hipocampo, las neuronas heterotópicas tienen una respuesta aumentada al NMDA, lo que genera corrientes con una constante de tiempo de inactivación reducida (Calcagnotto et al., 2005). En el cerebelo, el grado de malformación cortical está asociado a una disminución de la expresión del factor de crecimiento transformante $\beta 1$, la cual puede ser revertida por la administración de melatonina (Uyanikgil, 2007). En 2008, Moroni y colaboradores investigaron por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, la disrupción de las capas corticales y la composición neuronal de la heterotopia en la corteza, evidenciando el patrón de expresión de factores de transcripción específicos de diferentes capas. Años más tarde, en 2013, Inverardi demostró en la región CA1 del hipocampo una disminución en la eficiencia de la transmisión sináptica y una potenciación a largo plazo aumentada, asociada con un aumento de la excitabilidad. En el mismo año, Moroni, mediante electroporación en útero, dilucidó el origen de

la heterotopía periventricular en el modelo de carmustina, demostrando que era causado por una pausa en la migración de las células precursoras neuronales en la zona ventricular y su maduración posterior en neuronas de la capa superior. En 2015, Pennacchio y colaboradores, demostraron la aparición de descargas epileptiformes espontáneas en el modelo de carmustina, evidenciando además que el aumento de la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), resultaba un biomarcador fiable en epileptogenicidad. Por otro lado, Yue y colaboradores, en 2018, agregaron al modelo de carmustina pilocarpina, para inducir convulsiones agudas y evidenciar el desplazamiento del segmento inicial del axón de las neuronas somatosensoriales, demostrando, que el tratamiento con nifedipina ejerce un efecto protector dependiente de dosis contra dicho desplazamiento, sugiriendo a este compuesto como un agente terapéutico potencial.

Por tanto, el modelo de displasia cortical inducida por carmustina, es un modelo de estudio que reproduce las características de las lesiones de la displasia cortical humana de manera evidente y reproducible, siendo además un modelo validado en diferentes estudios.

2.2 Cerebelo

2.2.1 Anatomía

El cerebelo es una estructura que se encuentra localizada en la parte posterior del cerebro, de manera dorsal al tronco encefálico. Éste, está sujeto al tallo cerebral por tres pares de pedúnculos cerebelosos: inferior, medio y superior, los cuales consisten en extensos haces de fibras denominados tractos eferentes y aferentes. El pedúnculo inferior une al cerebelo con la médula oblonga, mientras que los pedúnculos medio y superior se encuentran unidos a dicha estructura mediante el puente y el mesencéfalo (Sotelo, 2004).

La superficie externa del cerebelo se conforma de dos hemisferios plegados que forman fisuras y surcos, los cuales se encuentran divididos por el vermis, una porción medial que los une. Dichos hemisferios se encuentran divididos en tres regiones principales: anterior, posterior y floculonodular, que dividen al cerebelo en una serie de pliegues que se extienden mediante fisuras transversales en dirección rostrocaudal llamados lóbulos. (Kandel et al., 2000). El cerebelo murino se compone por diez lóbulos o folias (Inouye & Oda, 1980) denominados cada uno como se menciona a continuación: (I) lingula, (II) lóbulo ventral del lóbulo central, (III) lóbulo dorsal del lóbulo central, (IV) lóbulo ventral del culmen, (V) lóbulo dorsal del culmen, (VI) declive, (VII) túber, (VIII) pirámide, (IX) úvula y (X) nódulo (Inouye & Oda, 1980; Paxinos & Watson, 2007).

2.2.2 Función

El cerebelo es considerado el principal centro de coordinación motora, además está involucrado en una diversa serie de funciones como el reflejo vestibulo-ocular, funciones de tipo somato-sensorial, funciones cognitivas de nivel superior, mecanismos de memoria y procesamiento emocional (Ito, 2006; Stoodley, 2016; Strata, 2015 y Schmahmann, 2019).

Durante los años 1970 y 1990, el cerebelo estaba considerado como un centro de aprendizaje motor (Ito, 2006), involucrado en la coordinación y adquisición de habilidades, funcionando como un sistema de control adaptativo (Barlow, 2002), término que engloba una serie de movimientos y reflejos compuestos, los cuales se orquestan en el tronco encefálico y la médula espinal (Barlow, 2002), entre los que podemos encontrar: el condicionamiento del parpadeo (Optican y Robinson, 1980); coordinación de los miembros inferiores durante la locomoción (Andersson y Armstrong, 1987) y la respuesta de seguimiento ocular durante reflejo vestibulo-ocular (Shidara et al., 1993; Ito, 2006). Años más tarde, se asoció con el procesamiento de estímulos sensoriales de la periferia, y con funciones de tipo somato-sensorial, encargándose de controlar los movimientos finos y el balance (Wang & Zhogbi, 2001). Pero fue hasta a principios del siglo XXI, que los campos de la neurociencia cognitiva y la neuropsicología clínica dieron un nuevo enfoque a las funciones asociadas a éste, estableciendo una relación entre el cerebelo y el procesamiento intelectual y emocional (Schmahmann, 2019). El cerebelo muestra una trayectoria de desarrollo similar a la de la corteza cerebral, contando con regiones funcionalmente diferentes, unas asociadas a funciones sensitivomotoras y otras asociadas a funciones cognitivas (Stoodley, 2016). La participación del cerebelo en las emociones se le atribuye principalmente a la región del vermis. Éste participa en mecanismos de memoria estrechamente relacionados con expresión de respuestas autónomas y aprendizajes motores involucrados en diversas emociones, principalmente el miedo (Strata, 2015).

Se ha propuesto con base en estas interacciones, que alguna interrupción en el desarrollo temprano del cerebelo, influye de manera importante en la estructura y función del mismo (Stoodley, 2016). Mientras que por otro lado, ahora parece evidente su relación con el desarrollo emocional y aprendizaje motor, cuando se asocian enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia y el autismo con el mal funcionamiento del mismo (Strata, 2015).

2.2.3 Organización celular

El cerebelo está constituido por la corteza y los núcleos profundos, formados de materia gris y materia blanca respectivamente, donde además, distribuidas a lo largo de éstos, se encuentran presentes diversos tipos celulares.

2.2.3.1 Componente neuronal

La corteza cerebelar está formada por seis tipos de neuronas, clasificadas como neuronas de tipo excitatorio o inhibitorio de acuerdo a su principal neurotransmisor, en el caso de las neuronas de tipo excitatorio nos referimos al glutamato mientras que para las neuronas de tipo inhibitorio nos referimos al ácido aminobutírico (GABA) y glicina (Voog & Ruigrok, 2012). Las neuronas de tipo excitatorio incluyen: las células granulares, células unipolares de cepillo y dos tipos de proyecciones aferentes cerebelosas adicionales provenientes de los núcleos cerebelosos profundos.

Las células granulares son pequeñas neuronas glutamatérgicas y son las células más numerosas en la corteza cerebelosa y del cerebro en general. Los axones de las células granulares no están mielinizados y ascienden hacia la capa molecular superficial de la corteza cerebelosa, donde típicamente se bifurcan para contactar a las dendritas de las células de Purkinje y las interneuronas (Ito, 2006; Voog & Ruigrok, 2012).

Las células unipolares en cepillo, deben su nombre a que contienen una sola dendrita en forma de cepillo, la cual recibe sinapsis excitadoras desde una sola terminal de fibra musgosa. El axón de estas células es ramificado, dando lugar a grandes terminales que contactan con las dendritas de células granulares. Por tanto, las células unipolares en cepillo actúan como un “sistema de refuerzo” para amplificar la entrada intracortical de fibras musgosas en el vestibulo-cerebelo (Ito, 2006; Voog & Ruigrok, 2012).

Dentro de las neuronas de tipo inhibitorio se encuentran: las células de Purkinje, las células de Golgi, las células de Lugaro, las células estrelladas y las células de cesta (Ito, 2006; Voog & Ruigrok, 2012).

Las células de Purkinje son neuronas grandes GABAérgicas, siendo la única eferencia de la corteza cerebelosa. Sus axones mielinizados terminan en las neuronas de los núcleos cerebelosos y núcleos del tronco encefálico. Las ramificaciones primarias y secundarias del árbol dendrítico de las células de Purkinje son relativamente lisas; mientras que las ramificaciones más distales poseen espinas dendríticas, las cuales inervan múltiples fibras paralelas (Ito, 2006; Voog & Ruigrok, 2012).

Las células de Golgi tienen dendritas que se extienden por completo hasta la capa granular, recibiendo entradas excitadoras de las fibras paralelas y en sus dendritas descendentes de las fibras musgosas. Su axón se encuentra ramificado y extendido ampliamente en la capa granular, orientado al eje longitudinal de la folia, contribuyendo a la sinapsis glomerular clásica al contactar a las dendritas de las células granulares e inhibiendo a las células unipolares en cepillo (Barmack & Yakhnitsa, 2008). Además reciben información de las fibras trepadoras, células en cesta, células de Lugaro y colaterales de las neuronas de Purkinje (Ito, 2006; Voog & Ruigrok, 2012).

Las células de Lugaro son neuronas que poseen un soma en forma de cigarro, del cual emergen largas dendritas situadas en cada extremo. Su arborización axonal se restringe a la capa molecular contactando a las células estrelladas y en cesta. Además, en dicha capa molecular, de manera profunda y paralela a las fibras paralelas, se extiende una larga rama axonal mielinizada que hace contacto con las dendritas apicales de las células de Golgi y también con las células de Purkinje, en donde se estima que por cada quince células de Purkinje se encuentra una célula de Lugaro. Por tanto, el soma, las dendritas y la arborización axonal de dichas células se encuentran delimitados en la capa molecular, estando orientadas de manera perpendicular al eje largo de la folia (Ito, 2006; Voog & Ruigrok, 2012). Dicha disposición permite que las células de Lugaro se puedan encontrar en bifurcaciones microvasculares, estando su soma situado en estas uniones mientras que sus dendritas se unen al endotelio vascular, envolviendo los vasos sanguíneos (Kalinichenko y Pushchin, 2018). De tal modo que las células de Lugaro actúan como un mecanismo inhibitorio específico de la corteza cerebelosa, inhibiendo las células en cesta en el plano vertical, al regular el flujo inhibitorio a los módulos cerebelosos (Barmack & Yakhnitsa, 2008).

Las células estrelladas son interneuronas inhibitorias que tienen cuerpos celulares pequeños (8-12 μm), sus dendritas se encuentran alrededor de su cuerpo celular, en el plano parasagital, intercalándose con las dendritas de las neuronas de Purkinje vecinas (Rizza et al. 2021). Su axón va de manera transversal siguiendo las fibras paralelas, a diferencia de las células de cesta, resultando en dos poblaciones diferentes ya que sus axones tienen dominios objetivo muy diferentes (Sotelo, 2015; Rizza et al. 2021). Las células estrelladas son abundantes y se sitúan en las capas más superficiales de la capa molecular (Voog & Ruigrok, 2012, Sotelo, 2015) donde los axones de éstas suministran sinapsis inhibitorias al contactar con las dendritas de las neuronas de Purkinje (Voog y Ruigrok, 2012; Sotelo, 2015; Rizza et al. 2021). Además, estas células reciben una señal que se correlaciona con la descarga de fibras trepadoras (Ohtsuki et al., 2004), donde un derrame de glutamato derivado de las sinapsis con las neuronas de Purkinje, aumenta la actividad en las células estrelladas, lo cual de manera alterna puede influir

indirectamente en las células estrelladas a través de su asociación con astrocitos, glía de Bergmann y glía NG2 (Barmack & Yakhnitsa, 2008).

Las células en cesta se ubican justo por encima de las células de Purkinje, poseen pocas dendritas apicales, las cuales se encuentran relativamente no ramificadas y ascienden a la capa molecular (Barmack & Yakhnitsa, 2008); mientras que el axón de éstas se extiende desde la capa molecular a la capa de células de Purkinje, proyectando lateralmente (Ito, 2006; Voog & Ruigrok, 2012). Las células en canasta se sitúan en el tercio más profundo de la capa molecular (Sotelo, 2015), y proporcionan la mayor parte axosomática y entrada axo-axónica sináptica a las células de Purkinje, dando lugar a una serie de múltiples cestas axonales, las cuales envuelven los somas de las células de Purkinje adyacentes, formando una sintonía axo-axónica parecida a un pincel, como lo denominó Ramón & Cajal (Tigyi, 1990), siendo conocido hoy en día, dicho complejo como “pinceau”, una sinapsis única y compleja formada entre los terminales de la célula de cesta y el segmento inicial del axón de la célula de Purkinje (Tigyi, 1990).

El circuito cerebeloso principal se basa en las dos aferencias principales a la corteza cerebelosa: las fibras trepadoras y las fibras musgosas. Estas fibras aferentes ingresan al cerebelo por medio de los pedúnculos cerebelosos medio e inferior (oliva inferior, pontocerebelo y neocerebelo), al terminar dentro de la corteza del cerebelo, pierden su vaina de mielina, terminando como fibras. Del núcleo paracerebellar se recibe la mayor entrada de señales por medio de las fibras musgosas, las cuales contactan con las dendritas de las células granulares transmitiendo la información por medio de sus axones (denominados fibras paralelas) a las dendritas de las neuronas de Purkinje, siendo en última instancia estas señales transportadas a los núcleos cerebelares. Mientras que de la oliva inferior también se reciben entradas de señales por parte de las fibras trepadoras, las cuales hacen sinapsis con las partes proximales de los árboles dentríticos de las neuronas de Purkinje (Voog 1998; Ito, 2006). Por tanto, la corteza cerebelar, se encuentra organizada formando una estructura laminar, delimitada por la diversidad de células presentes en ésta. Así que partiendo de la capa externa a la interna, la corteza cerebelar se encuentra dividida en: capa molecular, capa de células de Purkinje y capa granular.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, podemos resumir que la capa molecular contiene a las células de Lugaro, células estrelladas y células en cesta. Además de contener los axones de las células granulares, las dendritas de las células de Purkinje, los procesos de la glía de Bergmann y a las fibras paralelas. Mientras que la capa de células de Purkinje contiene los somas de las células de Purkinje y los somas de la glía de Bergmann (de los cuales hablaremos más adelante). Por último, en la capa molecular se localizan las células granulares, células unipolares en cepillo, células de Golgi e interneuronas (Voog 1998; Voog & Ruigrok, 2012).

2.2.3.2 Componente glial

Una vez concluida la etapa de neurogénesis en el estadio embrionario E13-E15 en rata, la capa germinal del neuroepitelio ventricular del primordio cerebeloso da lugar exclusivamente a células no neuronales, siendo identificados principalmente dos sitios de proliferación: uno anterior, cerca del pedúnculo cerebeloso superior y próximo al istmo; y uno posterior, situado frente al labio rómbico. Sitios de los cuales deriva toda la glía cerebelosa de acuerdo con estudios realizados por Ramón & Cajal en 1911 (Buffo & Rossi, 2013). Por lo tanto, durante el desarrollo postnatal, se da lugar al patrón de foliación característico del cerebelo, estando involucrados procesos esenciales de diferenciación celular y morfogénesis (Tanaka & Maronuchi, 2005; Sudarov & Joyner, 2007).

La glía del cerebelo fue descrita y clasificada de acuerdo con la morfología que presenta y por la posición que adopta en el tejido, estando conformada por los siguientes tipos celulares: oligodendrocitos, microglía, células endociliales, astrocitos y glía radial (Buffo & Rossi, 2013; Verkhratsky & Butt, 2007).

Los oligodendrocitos son pequeñas y redondeadas células gliales, situados en la materia blanca. Poseen procesos orientados a lo largo de los tractos neuronales, situándose en regiones con fibras mielinizadas (Verkhratsky & Butt, 2007).

La microglía es una población de células que participa en diversas funciones para el desarrollo normal del cerebro, ya que está involucrada en procesos tales como: fagocitosis, liberación de moduladores, respuestas a lesiones y liberación de citocinas inflamatorias. Esta población celular, reside dentro del parénquima en el SNC (Prinz & Priller, 2014).

Las células endociliales son una población de células epiteliales multiciliadas que derivan de la glía radial y están situadas en las cavidades ventriculares. Una de sus principales funciones es la de impulsar el líquido cerebroespinal a través del sistema ventricular, mediante el movimiento de sus cilios, regulando el flujo normal del mismo, actuando a su vez como guía direccional para la migración específica de nuevas células (Sawamoto et al., 2006; Liu et al. 2014).

Los astrocitos, también conocidos como astroglia son una población heterogénea de células, las cuales representan el tipo más abundante de células gliales en el SNC y participan activamente en una variedad de funciones biológicas, tales como la formación y regulación de la ramificación dendrítica de las neuronas; migración y diferenciación neuronal (Zhu et al., 2016); regulación del flujo sanguíneo cerebral; control metabólico de la concentración extracelular de potasio, modulación de la formación, función y eliminación de las sinapsis (Chung et al., 2015), regulación de los circuitos de alimentación hipotalámicos (García-Cáceres et al., 2019; Escartin

et al., 2021); además contribuyen significativamente a la poda sináptica y otras funciones fagocíticas (Sloan & Barres, 2018) y por último involucrados en la remodelación morfológica, molecular y funcional en respuesta a una lesión, infección o enfermedad del SNC (Verkhratsky & Nedergaard, 2018; Guttenplan et al., 2020; Escartin et al., 2021).

En general, su morfología presenta múltiples procesos primarios que se originan a partir del soma. Además, este tipo de células gliales se caracterizan por la presencia de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés), el principal filamento intermedio que conforma el citoesqueleto en los astrocitos (Verkhratsky & Butt, 2007).

Los astrocitos se han clasificado en dos subtipos principales: protoplásmicos y fibrosos, según las diferencias en su morfología y localización. Los astrocitos protoplásmicos se encuentran en la materia gris y exhiben una multiplicidad de procesos complejos y finamente ramificados (~50 µm de diámetro). Los astrocitos fibrosos se encuentran en la sustancia blanca y exhiben largos procesos (300 µm) y menos complejos que los astrocitos protoplásmicos (Verkhratsky & Butt, 2007). Los estudios neuroanatómicos clásicos y recientes indican que ambos subtipos de astrocitos hacen contactos extensos con los vasos sanguíneos y forman uniones entre los procesos distales del astrocito vecino (Oberheim et al., 2012). Además, los procesos complejos de los astrocitos protoplásmicos envuelven las sinapsis, mientras que los procesos de los astrocitos fibrosos entran en contacto con los nodos de Ranvier (Oberheim et al., 2012; Sofroniew & Vinters, 2010).

La glía de Bergmann, también llamada "célula epitelial de Golgi" se considera un tipo especializado de astrocito, derivado de la glía radial y exclusivo del cerebelo (Palay & Chan-Palay, 1974). Cajal postuló que la glía radial derivada de la zona ventricular, participa en procesos fundamentales para llevar a cabo la corticogénesis del cerebelo, siendo éstas muy versátiles en su función y estando altamente integradas en el circuito cerebeloso (De Zeeuw & Hoogland, 2015).

La glía de Bergmann se encuentra desde etapas muy tempranas en el desarrollo, coordinando la invaginación de los precursores de células granulares con la capa de células de Purkinje y la membrana pial (Leung & Li, 2018). En estado postnatal, las fibras gliales de Bergmann, las cuales atraviesan la capa molecular en desarrollo, forman un andamio estructural para la migración de células granulares, guiada por interacciones mediadas a lo largo de sus procesos (Rakic, 1971 a y b; Komuro & Rakic, 1988; Komuro et al., 2001). Participan además en el crecimiento dendrítico de las células de Purkinje (Bellamy, 2006), demostrando con ello ser esenciales para la foliación cerebelosa (Leung & Li, 2018). Después de sufrir una serie de cambios morfológicos esta glía radial, retrae sus procesos y desplaza su soma de manera paulatina hacia la corteza cerebelar, dando lugar a la proliferación y diferenciación de la glía

radial como glía de Bergmann (Yamada & Watanabe, 2002; Buffo & Rosi, 2013). Además, la peculiar morfología que adopta a lo largo de sus procesos, conformada por pequeñas unidades compartimentalizadas de manera independiente, contribuyen con la capacidad de actuar en la remoción de glutamato dando lugar a corrientes sinápticas rápidas y lentas, modulando la eficacia de la transmisión sináptica de un grupo o incluso sinapsis individuales (Marcaggi et al., 2003), participan además en liberación tónica de GABA (Lee et al., 2010) y en la regulación del K^+ extracelular (Wang et al., 2012), dando lugar a una estrecha relación de las neuronas con las que interactúan (De Zeeuw & Hoogland, 2015).

En el roedor adulto, el soma de la glía de Bergmann tiene un diámetro de aproximadamente 15 μm y está en la capa de células de Purkinje, los somas rodean estas neuronas en una proporción de 6 a 8 células de Bergmann por cada neurona de Purkinje. La glía de Bergmann exhibe múltiples procesos, aproximadamente 6, cada uno con numerosas protuberancias laterales llamadas microdominios, estos procesos pasan a través de la capa molecular formando en su región más distal los pies terminales cónicos (Rakic, 1972; Rakic, 2003). El plano de los procesos de glía de Bergmann está organizado como una empalizada, orientada en paralelo al eje longitudinal de la folia y perpendicular al plano formado por los árboles dendríticos de las células de Purkinje (Buffo & Rossi, 2013).

Los bordes y las cubiertas de la glía de Bergmann cubren los árboles dendríticos de las neuronas de Purkinje con las fibras paralelas; envolviendo entre 2000 y 6000 sinapsis (Kettenmann & Ransom, 2005). Los microdominios de la glía de Bergmann responden a la actividad sináptica con cambios en la concentración de calcio, que eventualmente puede propagarse desde los procesos hacia diferentes regiones de la célula (Bellamy, 2006). Los microdominios se caracterizan por ser altamente dinámicos, mostrando patrones de motilidad similares a las espinas neuronales, ya que tienen la capacidad de formar nuevos procesos, crecer y retraerse lateralmente (Lippman et al., 2008, 2010).

Las protuberancias laterales que se encuentran en los procesos de la glía de Bergmann presentan receptores de glutamato tipo (AMPA), compuesto exclusivamente por las subunidades GluA1 / GluA4. Un estudio realizado por Saab et al. (2012), demostró la importancia de la glía de Bergmann en la integración sináptica y la transmisión de salida del cerebelo. En este estudio, se indujo un doble KO de las subunidades GluA1 y GluA4, provocando que los procesos de la glía de Bergmann se retrajeran y no cubrieran la sinapsis con las neuronas Purkinje, presentando un aumento tanto en la amplitud como en la duración de las corrientes evocadas además de la formación retardada de sinapsis glutamatérgicas. Estos cambios también fueron acompañados por deficiencias y alteraciones en la coordinación motora fina (Saab et al., 2012).

Este tipo de célula glial, debido a su localización y morfología durante la etapa adulta, se

relaciona estrechamente con las sinapsis que establecen las neuronas de Purkinje. La glía de Bergmann responde al glutamato a través de la activación de receptores AMPA, dando lugar a un incremento en la concentración de calcio intracelular, que puede propagarse a células gliales adyacentes y por largas distancias, mediando con ello la transmisión glutamatérgica, la cual es importante para que las neuronas de Purkinje lleven a cabo el control de movimientos finos (Lipmann et al., 2010).

Durante el desarrollo, la glía de Bergmann desempeña un papel esencial como andamiaje para la migración de diferentes tipos de células nerviosas hasta situarse en su zona de destino. Sin embargo, la migración y diferenciación son procesos extremadamente complejos, los cuales en ocasiones llegan a superponerse temporalmente durante la etapa embrionaria o postnatal afectando más de un evento de desarrollo, y por tanto, dando lugar a una amplia gama de alteraciones (Bernardete & Kriegstein, 2002). Dichas alteraciones en la migración neuronal generan modificaciones en la organización de la corteza cerebral y consecuente en la organización y función neuronal. Estos cambios se manifiestan muchas veces en epilepsia infantil y en déficits cognitivos (Bernardete & Kriegstein 2002; Guerrini 2005).

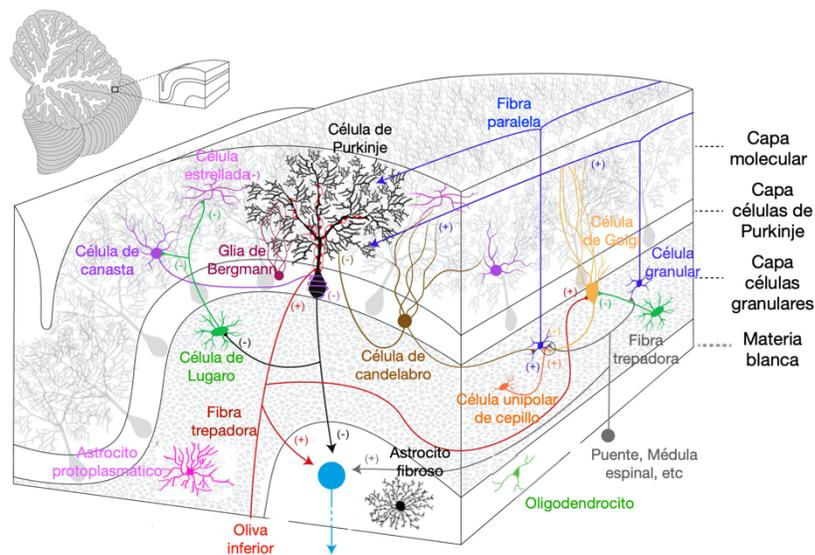


Figura 1. Representación de la organización neuronal y glial de la corteza cerebelar y su circuito. Los componentes excitatorios (+) e inhibitorios (-) se encuentran representados dentro de la corteza cerebelosa y los núcleos cerebelosos profundos (Modificado de Binda et al., 2020).

Previamente en nuestro laboratorio se empleó un modelo de displasia cortical inducido por el agente alquilante carmustina en donde se observaron las modificaciones que sufre la glía de Bergmann del lóbulo X del cerebelo (Figura 2 y 3, González-González et al., 2015).

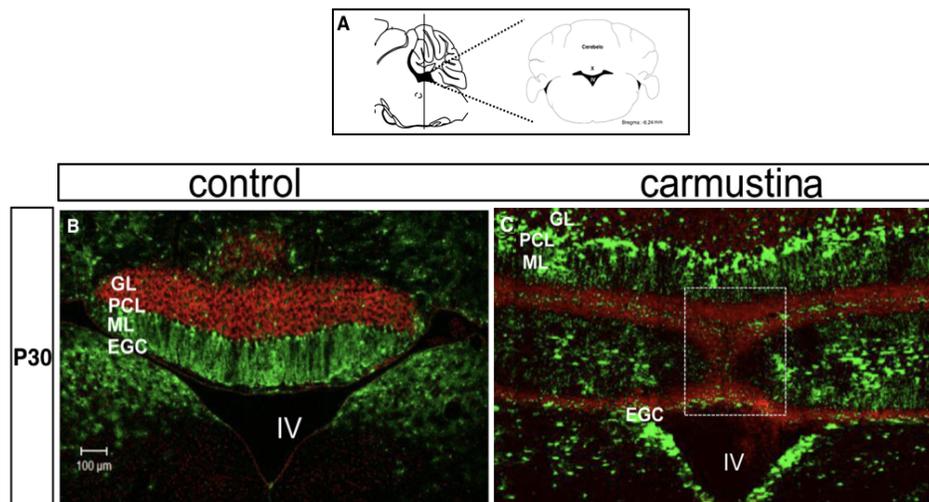


Figura 2. Displasia cortical inducida por carmustina. (A) Vista sagital (izquierda) y coronal (derecha) de la ubicación del lóbulo X. (B). Corte coronal del cerebelo a la altura del lóbulo X de un ratón GFAP-eGFP en edad postnatal 30 control, mostrando la correcta estratificación de las capas de la corteza del cerebelo. (C). Bicapa de células de Bergmann dividiendo el lóbulo X en dos folias. X: Lóbulo X, IV: cuarto ventrículo; GL: capa granular, PCL: capa de células de Purkinje, ML: capa molecular, EGC: células gliales endoteliales. Rojo: yoduro de propidio, verde: células gliales GFAP⁺. Modificado de (González-González et al., 2015).

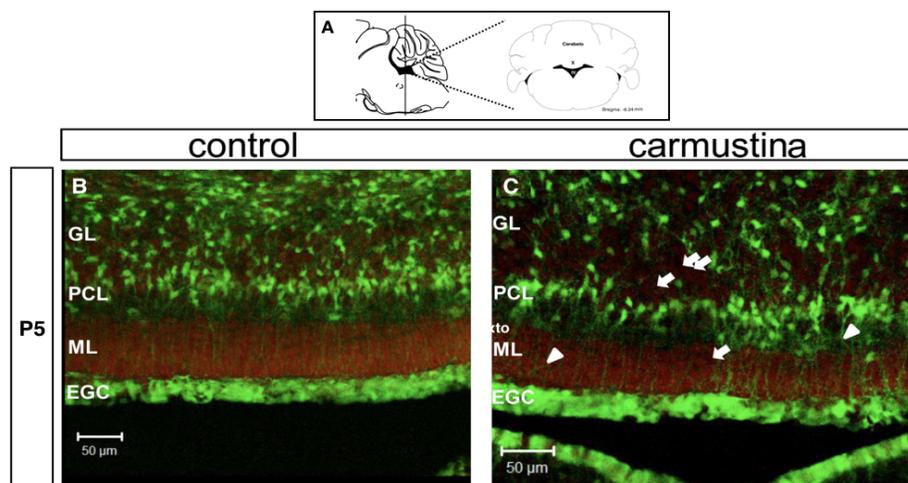


Figura 3. Efecto de la carmustina en la organización de la glía de Bergmann. (A) Vista sagital (izquierda) y coronal (derecha) de la ubicación del lóbulo X. (B). Corte coronal a la altura del lóbulo X de cerebelo de ratón postnatal 5, GFAP-eGFP. Se muestran los somas de la glía de Bergmann alineados y estratificados en la PCL, mientras que sus procesos proyectan de manera descendente atravesando la ML formando pies terminales cónicos. A diferencia de los tratados con carmustina (C) en donde los somas muestran cambios en su organización presentando un establecimiento disperso (flechas blancas), mientras que sus procesos muestran cambios en la dirección de proyección, siendo difusos y dispersos (cabezas de flechas blancas). GL: capa granular, PCL: capa de células de Purkinje, ML: capa molecular, EGC: células gliales endoteliales. Rojo: yoduro de propidio, verde: células gliales GFAP⁺. Modificado de (González-González et al., 2015).

El lóbulo X del cerebelo o *nodulus* es relevante para el control del reflejo vestibulo-ocular y el mantenimiento del balance corporal. Por su parte, la glía de Bergmann es fundamental para la migración neuronal durante el desarrollo, y en la vida adulta la transmisión glutamatérgica mediada por este grupo de células es importante para que las neuronas de Purkinje ejecuten el control de movimientos finos (Bellamy 2006, Saab et al., 2012). Actualmente es bien reconocida la relevancia que tiene la comunicación glía-neurona para la integración sináptica y para mantener el funcionamiento normal del sistema nervioso. Los microdominios de la glía de Bergmann responden a la actividad sináptica con variaciones en la concentración de calcio, el cual eventualmente puede propagarse a través de los procesos a distintas regiones de la célula, interaccionando con áreas particulares de las sinapsis a las que envuelven, siendo éstos los sitios principales de interacción entre glía-neurona (Bellamy, 2006).

Las modificaciones estructurales que sufran los microdominios de la glía de Bergmann pueden afectar directamente la función sináptica. En el modelo de displasia cortical inducida por carmustina se observó que la glía de Bergmann tiene procesos menos complejos ya que la longitud relativa y absoluta de las protuberancias es menor que la de los controles (Figura 4, González-González et al., 2015). Esto sugiere que la comunicación entre este tipo de células gliales puede verse afectada. Por tanto, un método para abordar el impacto funcional que tienen las modificaciones estructurales de la glía de Bergmann en la displasia cortical es mediante el registro de los cambios intracelulares de las concentraciones de calcio.

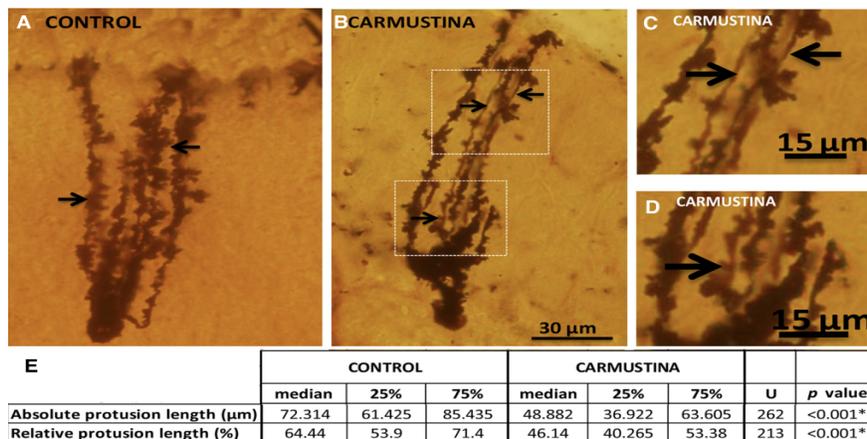


Figura 4. Cambios en las protuberancias de la glía de Bergmann. (A y B). Célula de Bergmann del lóbulo X de cerebelo de ratón postnatal 30 procesada mediante tinción de Golgi rápido. **(A).** Se muestra la complejidad de los procesos en una glía de Bergmann así como múltiples protuberancias (flechas negras) en éstos. A diferencia del tratado con carmustina **(B)** donde se muestran procesos menos complejos y con ello una disminución de protuberancias (flechas negras). **(C y D).** Se muestra una amplificación de las zonas delimitadas en **(B)**. **(E).** Análisis comparativo de la longitud absoluta y relativa de las protuberancias, mostrando diferencia significativa *($P < 0.001$). Modificado de (González-González et al., 2015).

Para describir con detalle los cambios morfológicos y funcionales que ocurren en la glía de Bergmann y en los astrocitos de cerebelo en el modelo experimental de displasia cortical inducida por carmustina, en este trabajo se aplicó microscopía de hoja de luz para examinar la organización del cerebelo en ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente en astrocitos y glía de Bergmann. Encontramos que la región más afectada corresponde al lóbulo X del cerebelo, por lo que usamos rebanadas de cerebelo de esta región para determinar si había cambios en la dinámica de calcio de las células de Bergmann y finalmente determinamos cómo los astrocitos de ratones tratados con carmustina modifican su morfología y dinámica de calcio *in vitro*.

3. HIPÓTESIS

Los cambios estructurales de la glía de Bergmann inducidos por la carmustina modifican la dinámica de calcio intracelular de este grupo celular.

4. OBJETIVOS

- Caracterizar anatómica y estructuralmente la glía de Bergmann en los diez lóbulos del cerebelo y sus alteraciones en el modelo experimental de displasia cortical inducida por carmustina en edad P5.
- Caracterizar la dinámica de calcio de la glía Bergmann en el lóbulo X del cerebelo y las modificaciones de ésta en el modelo de displasia cortical inducida por carmustina.
- Determinar si los astrocitos del cerebelo de ratones tratados con carmustina muestran modificaciones en su morfología y dinámica de calcio *in vitro*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

5.1.1 Manejo de animales

Todas las manipulaciones experimentales, protocolos y procedimientos se realizaron de acuerdo con las políticas de ética para el cuidado y manejo animal (INEU/SA/CB089), número de protocolo 048 aprobado por el comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, de acuerdo con las normas nacionales (NOM-062-ZOO-1999) y guías internacionales (Institutos Nacionales de Salud, EE. UU.). Para este estudio utilizamos el ratón transgénico GFAP-eGFP (Nolte et al., 2001) que expresa la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor GFAP que dirige la expresión en astrocitos y células de Bergmann. También usamos la cepa de ratón CD1 para aislar astrocitos del cerebelo.

5.2 Métodos

5.2.1 Inducción de displasia cortical

La inducción experimental de displasia cortical se realizó en ratones hembra gestantes transgénicas GFAP-eGFP y CD1 en E13 (día embrionario 13, que es el pico de gliogénesis; se consideró E1 el día en que se observó el tapón vaginal). Se administró intraperitonealmente la carmustina (Carmustina, Sigma) a una dosis de 20 mg/kg. La solución se preparó al disolver el reactivo en solución de glucosa al 5% en agua estéril a una concentración de 4 mg/ml. Para los animales control, se inyectó intraperitonealmente a hembras gestantes, la solución vehículo (glucosa al 5% en agua estéril) en el mismo día embrionario, de acuerdo con el método previamente reportado (Bernadette & Kriegstein, 2002; Moroni et al., 2011, González-González et al 2015). Las hembras gestacionales inyectadas se alojaron en el bioterio del INB-UNAM con ciclos de luz:oscuridad de 12:12 h y se les permitió comida y agua *ad libitum*. Las crías se utilizaron para los siguientes estudios. El día de nacimiento de las crías se consideró como día posnatal cero (P0).

5.2.2 Evaluación de la coordinación motriz y equilibrio

El impacto en la coordinación motriz y equilibrio, funciones atribuidas al cerebelo, se evaluó en un equipo Rotarod (Rota-Rod series 8, IITC Life Science). El Rotarod evalúa la habilidad que presentan los ratones para mantener su postura sobre un rodillo giratorio, así como el rendimiento motor y aprendizaje durante el tiempo que dura la prueba.

Se evaluaron ratones transgénicos GFAP-eGFP machos de 30 días de edad (Control n=6 y tratados con carmustina n=6). Para llevar a cabo este estudio se realizaron dos sesiones, en días consecutivos (Crawley, 1999). Cada sesión de prueba por día consistió en 3 ensayos de entrenamiento (5 RPM), seguido de 3 ensayos de aceleración (40 RPM por 2 minutos). Los ratones se habituaron al cuarto de conducta durante 30 minutos antes de cada una de las sesiones (Carter et al., 2001).

Dicha prueba conductual, nos permitió determinar la latencia de caída, concepto que se refiere al tiempo que transcurre desde que el ratón inicia la prueba sobre el rodillo giratorio del Rota-Rod hasta que comete un error. El error es considerado como la incapacidad que tiene el ratón para mantenerse corriendo sobre el rodillo giratorio y se aprecia cuando éste se sujeta del rodillo y da una vuelta completa o bien cae del mismo. Se registró y promedió la distancia, el tiempo y la aceleración máxima de cada ratón en cada prueba para cada sesión.

5.2.3 Técnica CLARITY

Se utilizaron ratones transgénicos GFAP-eGFP machos de 5-7 días de edad (Control n=5 y tratados con carmustina n=5). Se utilizó la técnica de CLARITY (González-González et al., 2017) con el fin de remover los lípidos del tejido, sustituyéndolos por una matriz de polímero sintético, preservando la estructura celular del cerebelo y la fluorescencia de GFP, para determinar la frecuencia y sitios en los que ocurren las displasias corticales en los diez lóbulos del cerebelo en el modelo experimental de displasia cortical.

Los ratones fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (Cheminova) a una dosis de 30 mg/kg. Enseguida se perfundieron intracardiamente con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) seguido de una solución de hidrogel hasta mostrar rigidez corporal. La solución de hidrogel se mantuvo en hielo y se preparó al disolver 40 mL de acrilamida (40%, Bio-Rad laboratories), 10 mL de Bisacrilamida (2%, Bio-Rad laboratories), 1 g de iniciador VA-044 (0.25%, Alpha Laboratories), 40 mL de PBS 10X, 100 mL de PFA 16%, 200 mg de saponina (0.05%) y se aforó a 1L con H₂O, de acuerdo con el método reportado por Chung et al., (2013). Una vez realizada la perfusión, el ratón fue decapitado y se

extrajo cuidadosamente el encéfalo. El tejido se colocó en un tubo Falcon de 50 mL y se agregaron 20 mL de solución de hidrogel fría. Se dejó infundir la solución en la muestra por 3 días a 4°C. Después el tejido se colocó en un tubo Falcon de 15 mL y se llenó por completo con solución de hidrogel (es importante que el tubo esté completamente lleno, esto ayuda a “remover” el exceso de aire en el interior). Enseguida se cubrió la boca del tubo con parafilm y se cerró de manera rápida, sellando de igual modo la tapa con parafilm, evitando la entrada de aire, creando una especie de vacío, corroborando que no presentara burbujas. El tubo se incubó a 37°C en baño maría durante 3 horas para iniciar la polimerización del hidrogel. Una vez polimerizado, en una campana de extracción, se extrajo el tejido removiendo el exceso de hidrogel de éste. Se realizaron tres lavados con solución clarificadora por 24 horas a 37°C manteniendo en agitación la muestra (máximo 100 RPM). La solución se preparó al disolver 12.36 g de ácido bórico (Sigma Aldrich), 40 g de dodecilsulfatosódico (Sigma Aldrich) y se aforó a 1L con H₂O, ajustando el pH a 7.5 de acuerdo con el método reportado por González-González et al., 2017.

Posteriormente el tejido se colocó en un tubo Falcon de 50 mL y se llenó con solución clarificadora (P5: 10 mL) a 37°C manteniéndolo en agitación para el método de clarificación pasiva. Se ajustó el pH a la solución clarificante cada semana, ajustando un máximo de tres veces y colocando nueva solución. El tiempo para la clarificación del tejido P5 fue aproximadamente de dos semanas. Una vez clarificado, se realizaron cuatro lavados con PBST por 30 min a 37°C en agitación (80 RPM), posteriormente se llevó a cabo un último lavado por 24 h en las mismas condiciones. El tejido se mantuvo en glicerol (80%) 24 h antes de ser procesado para microscopía (González-González et al., 2017). Además, para corroborar que el tratamiento fuera exitoso se procesaron por la técnica de Nissl (Apéndice 1), 3 cerebelos control y 3 cerebelos tratados con carmustina.

5.2.3.1 Microscopía fluorescente de hoja de luz

Se obtuvieron imágenes tridimensionales del cerebelo utilizando microscopía fluorescente de hoja de luz (LSFM). En LSFM, una hoja de luz excita un solo plano fluorescente dentro de la muestra, mientras que el plano fluorescente excitado se visualiza a través del objetivo y una cámara colocada ortogonal a la excitación de la hoja de luz. LSMF es capaz de realizar imágenes de corte óptico de campo amplio (tipo tomográfico) con buena resolución óptica sobre muestras volumétricas a diferentes escalas de longitud (Huisken et al., 2004; Olarte et al., 2018; Girkin & Carvalho, 2018; Licea-Rodríguez et al., 2019).

5.2.3.2 Adquisición de imágenes

Se implementaron dos sistemas LSFM diferentes bajo la configuración de microscopía de iluminación de plano selectivo (SPIM). El primer sistema, denominado macro-SPIM, se utilizó para obtener imágenes de grandes campos de visión (FoV) con un corte y una resolución ópticos moderados. El segundo sistema, llamado micro-SPIM, tomó imágenes con un campo de visión más pequeño, pero con un corte óptico y una resolución comparable a la microscopía láser confocal. Ambos sistemas utilizaron un láser de onda continua (Coherent, Obis), que emite a una longitud de onda de 488 nm para la excitación de la fluorescencia, y la hoja de luz se generó utilizando una lente cilíndrica acromática (Thorlabs, ACY254) de 50 mm de distancia focal. La muestra se introdujo en una cubeta de cuarzo montada en una etapa de traslación lineal xyz que permite la adquisición automatizada de pilas de imágenes en profundidad. Los ejes x y y corresponden al plano de muestra xy, mientras que el eje z corresponde a la profundidad de la muestra. La principal diferencia entre los sistemas SPIM fue la ruta de recolección óptica que tomó imágenes de los planos fluorescentes de las muestras de cerebelo.

Para macro-SPIM, utilizamos un sistema de lentes con zoom de gran aumento (Thorlabs, MVL6X12Z; con un tubo de extensión MVL20A) y una cámara de alta sensibilidad (CMOS) (Thorlabs, DCC3240N). La luz láser se separó por filtración de la señal de fluorescencia utilizando un filtro óptico multibanda interferométrico de alta calidad (Semrock, Em01-R488 / 568-25). La ampliación de la lente de zoom variable fue de 1.4 a 9. El sistema de campo de visión era de aproximadamente 5.7 mm, cubriendo alrededor de 4.5 a 3.4 mm². La resolución óptica máxima de este sistema es de alrededor de 4 μm. Se tomaron pilas compuestas por 3.600 imágenes de planos fluorescentes del cerebelo, que cubren un volumen aproximado de 4.5 x 3.4 x 3.6 mm³ (ancho x alto x profundidad). Cada plano se capturó a intervalos de 1 μm y el tamaño de la imagen fue de 640 x 512 píxeles². Por lo tanto, se almacenaron archivos de 5 GB de datos sin procesar para cada pila utilizando una computadora Dell Precision T5810BTX (Procesador Intel® Xeon® E5-1650 v3, 3.50 GHz), 16GB 2133 MHz, 2 discos SATA de 1TB con sistema operativo Windows de 64 bits.

Para micro-SPIM, se obtuvieron imágenes de los planos fluorescentes del cerebelo utilizando una lente de objetivo con corrección de infinito (Nikon, 10 ×; NA: 0,25; WD: 13 mm), una lente de tubo (Thorlabs TTL200) de 200 mm de distancia focal y la Cámara CMOS junto con el filtro multibanda interferométrico de alta calidad. Aquí, las imágenes obtenidas poseían una resolución óptica más alta (<1 μm). Los diferentes cuadrantes de muestra se apilaron y se realizó un “Stitching”, para construir una imagen de mosaico de la región de interés. Se adquirieron un total de 9.996 planos de 640 x 512 píxeles, que cubren un volumen aproximado de 3,5 x 3 x 0,7

mm³ (ancho x alto x profundidad), generando 10 GB de datos brutos. El tiempo de captura aproximado fue de 150 minutos.

5.2.3.3 Procesamiento y reconstrucción de imágenes

El procesamiento de imágenes fluorescentes, la concatenación del plano focal y las imágenes de mosaico en 3D se llevaron a cabo utilizando un script de software Image J Fiji. La reconstrucción completa del mosaico en 2D se realizó en dos secciones: alineación de columnas y alineación de filas. La alineación por columna se realizó emparejando los cuadrantes superiores correspondientes a cada fila, utilizando el plugin “Stitching por pares” del software Image J v.140, que usa una combinación lineal en el área de superposición, ajustando suavemente la intensidad entre las dos imágenes. La alineación de filas se realizó con el plugin “Grid fila por fila” de Image J v.140 que usa el área superpuesta por filas de acuerdo con los puntos de empalme designados.

5.2.4 Tinción con Golgi – Cox

Se utilizaron ratones transgénicos GFAP-eGFP machos de 5 días de edad (Control n=6 y tratados con carmustina n=6). Se desarrolló la técnica de Golgi-Cox para caracterizar fenotípicamente la glía de Bergmann y astrocitos del lóbulo X y compararla con el modelo experimental de displasia cortical.

Los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (Cheminova) a una dosis de 30 mg/kg. Enseguida se perfundieron intracardiamente con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%), seguido de una solución de PFA al 4% hasta mostrar rigidez corporal. La solución de PFA fue preparada en solución amortiguadora de fosfatos PBS 1X que contenía: Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 2 mM; KCl 2.7 mM y NaCl 137mM, ajustada a pH 7.2. Una vez realizada la perfusión, el ratón fue decapitado y se extrajo cuidadosamente el encéfalo. El encéfalo se mantuvo en solución de Golgi-Cox durante 4 semanas a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. El seccionamiento del tejido se llevó a cabo mediante el uso del vibratomo obteniendo cortes coronales de 250 µm, posteriormente los cortes fueron deshidratados con concentraciones crecientes de etanol y xileno (Das et al., 2013). Por último, el tejido se colocó en portaobjetos y se cubrió con medio de montaje Permount dejándolo secar durante 3 días antes de ser observado al microscopio.

Se obtuvieron varias imágenes de diferentes profundidades focales con un microscopio óptico (Olympus BX60). Las imágenes se procesaron con el software Helicon Focus probando tres algoritmos de enfoque: medias ponderadas (método A), mapa de profundidad (método B) y

pirámide (método C) según la profundidad de campo utilizada. Esto nos permitió reconstruir imágenes de alta resolución. Las imágenes procesadas se binarizaron y se evaluaron los siguientes parámetros: 1) diámetro y área del soma y 2) número y longitud de los procesos. Las células reconstruidas se evaluaron utilizando NeuronJ, un plugin de Image J v.140, que permite rastrear y medir el número y la longitud de los procesos gliales. Para el análisis se obtuvieron varias imágenes de diferentes profundidades focales (z-stack), pasando por pilas individuales, cuando fue necesario distinguir entre dos procesos que parecen superponerse en la proyección máxima. Por tanto, no se incluyeron en este análisis las células en las que los procesos no pudieron diferenciarse por plano focal. Después, las células se dibujaron a mano, utilizando la aplicación Camera Lucida del sistema operativo iOS. Para todos los datos, se calcularon la media aritmética, la desviación y el error estándar de la media.

5.2.5 Imagen de calcio

5.2.5.1 Preparación en rebanada

Se utilizaron ratones transgénicos GFAP-eGFP machos de 5-7 días de edad (Control n=6 y tratados con carmustina n=5, cada cría obtenida de una madre diferente, tratada con carmustina). Se desarrolló la técnica de imagen de calcio en rebanada para determinar la actividad basal de la dinámica de calcio intracelular de este grupo celular y sus cambios en el modelo experimental de displasia cortical en el lóbulo X, en el cual se tiene evidencia de la ocurrencia de displasias inducidas por carmustina.

Los ratones fueron sacrificados por decapitación, previa anestesia vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (Cheminova) a una dosis de 30 mg/kg. Una vez realizada la decapitación, se extrajo rápidamente el encéfalo y se mantuvo en solución fluido cerebroespinal artificial (ACSF, por sus siglas en inglés) libre de calcio en hielo con pH 7.4 y se mantuvo burbujeando en 95% O₂ y 5% CO₂. La solución ACSF contenía: NaCl 134 mM; KCl 2.5 mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂ 1.3 mM; NaHCO₃ 26 mM; K₂HPO₄ 1.25 mM y Glucosa 10 Mm (Thomas et al., 2000).

El seccionamiento del tejido se llevó a cabo mediante el uso de un vibratomo en solución ACSF libre de calcio en hielo, obteniendo cortes coronales de 250 µm, posteriormente los cortes se dejaron reposar por al menos 10 minutos en solución oxigenada ACSF a temperatura ambiente. Cada una de las rebanadas de la zona de interés se incubaron en caja de cultivo de pozos con el indicador de calcio Calcium Orange AM (ThermoFisher Scientific). Para garantizar una oxigenación adecuada de la rebanada sumergida durante la incubación del indicador de calcio, la caja de pozos se mantuvo cerrada en una incubadora a 37°C que se oxigenó

continuamente con 95% O₂ y 5% CO₂ en condiciones de oscuridad (Thomas et al., 2000; Metea y Newman, 2006).

El indicador de calcio Calcium Orange AM cell permeant (TermoFisher Scientific) se disolvió en DMSO (50 µg en 43 µl) con 20% de ácido plurónico-127 (Molecular Probes) y se sonicó durante 15 minutos. Se agregó al tejido, a una concentración final de 10 µM y se incubó durante 30 minutos a 37°C. (Thomas et al., 2000; Yuste et al, 2011; Cameron et al., 2016). Después de la incubación, se mantuvo la rebanada en oscuridad y se lavó por al menos 10 minutos en la solución ACSF oxigenada, manteniéndose en ésta hasta su uso. (Thomas et al., 2000; Yuste et al, 2011; Cameron et al., 2016). Se colocó la rebanada en la cámara de registro con perfusión continua con ACSF oxigenada a un caudal de 4–5 ml/min a temperatura ambiente y se llevó a cabo el registro de actividad basal de la dinámica de calcio intracelular. Para evitar que el tejido se mueva en la corriente de fluido, las rebanadas se mantuvieron debajo de un “arpa” (hecha de hilos de nailon pegados a través de una pieza de alambre de platino en forma de U).

5.2.5.2 Cultivo primario de astrocitos

Se utilizaron ratones de la línea CD1 machos de 2 días de edad (Control n=4 y tratados con carmustina n=4). Se desarrolló la técnica de imagen de calcio en cultivo primario de astrocitos de cerebelo para estudiar la dinámica de calcio intracelular de la organización de los circuitos formados por los astrocitos *in vitro* y sus cambios en el modelo experimental de displasia cortical.

Los ratones fueron sacrificados por decapitación, previa anestesia vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (Cheminova) a una dosis de 30 mg/kg. Una vez realizada la decapitación, se extrajo rápidamente el encéfalo, separando el cerebelo, el cual se mantuvo en solución fluido cerebroespinal artificial (ACSF, por sus siglas en inglés) en hielo con pH 7.4. La solución ACSF contenía: NaCl 150 mM; KCl 5.4 mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂ 1 mM; HEPES 5 mM y Glucosa 10 mM (Pétriz et al., 2014). Las células se obtuvieron por disociación mecánica de fragmentos del cerebelo con ayuda de una pipeta Pasteur previamente tratada con silicona (sigmacote, SIGMA). Este proceso se realizó en 1 mL de medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) adicionado con 10% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina (Pétriz et al., 2014).

De las células en suspensión en medio DMEM, se tomó una alícuota de 150 µL de la parte media y se colocó en una caja de pozos que contenía un cubreobjetos de 22 x 22 mm previamente tratado con poli-L-lisina (SIGMA). Una vez que las células sedimentaron, se agregaron 300 µL de medio de cultivo por las paredes del pozo y se mantuvieron en incubación a 37°C durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio de cultivo fue sustituido por medio

Neurobasal (Invitrogen Gibco) adicionado con 100 μ L de suplemento G5, 25 μ L de glutamina [200 mM] y 100 μ L de penicilina-estreptomina para favorecer la diferenciación, crecimiento y mantenimiento de los astrocitos (Reyes-Haro et al., 2005; Martínez-Delgado et al., 2011).

Antes de la obtención de imágenes de calcio, los astrocitos en 5, 6 y 7 DIV se cargaron con el fluoróforo sensible al calcio Fluo-4 AM (ThermoFisher Scientific) disuelto en DMSO con ácido plurónico-127 al 10% (Molecular Probes) para una concentración final de 5 μ M en condiciones de oscuridad (Kanner et al., 2018). Los cubreobjetos que contienen los astrocitos se colocaron en una cámara de lotes en perfusión constante con una solución de ACSF oxigenada a un caudal de 4-5 ml / min a temperatura ambiente.

5.2.5.3 Adquisición de imágenes

El registro de actividad de calcio se realizó con un microscopio de fluorescencia con un objetivo de inmersión en agua 20x (Olympus, 1,00 NA, 2,0 mm WD). Las secuencias de imágenes se recolectaron a 488 y 549 nm de excitación, usando una cámara PCO 4.2 sCMOS: 4 fps, imágenes por video: 1680-2400 imágenes, tiempo de exposición: 250 ms, tiempo de grabación: 420-600 segundos y resolución de 1024 x 1024 píxeles (Bierlein, 2013). Al final del experimento, se determinó el número total de células cargadas en el campo con un puff (2 mL de ATP 100 mM). El número total de células que respondieron a ATP (activas y silenciosas durante el experimento) se consideró como 100% (Pérez-Ortega et al., 2016).

5.2.5.4 Análisis de datos

Posteriormente, con el fin de caracterizar la actividad de este grupo celular y los cambios generados en el modelo de displasia cortical, se contabilizó el número de células involucradas en la actividad basal, se evaluó la frecuencia y duración de cada uno de los eventos transitorios de elevación de la concentración de calcio intracelular para cada uno de los grupos.

Las secuencias de imágenes se procesaron utilizando el software Fiji-ImageJ y el análisis para examinar los cambios espaciales y temporales en la fluorescencia (señal de calcio) se llevó a cabo utilizando un conjunto de rutinas en MATLAB (Matlab 2018a). Los plugins Template Matching y Turbo Reg de ImageJ se utilizaron para evaluar y eliminar los artefactos de movimiento de las secuencias de imágenes. Posteriormente, en la preparación en rebanada, la fluorescencia de fondo se restó eliminando el valor promedio de píxeles de fondo, obtenido de una región de interés (ROI, por sus siglas en inglés) seleccionado como la intensidad de una región no celular de todo el campo. Este valor de intensidad de fondo se restó a los datos numéricos crudos obtenidos mediante el análisis de la fluorescencia de las regiones celulares a

lo largo del tiempo, normalizando la señal de fluorescencia del registro. Mientras que en cultivo, la fluorescencia de fondo se restó digitalmente con el método de procesamiento de ImageJ-Fiji “subtract background”. Se seleccionaron ROI’s manualmente alrededor del soma de las células eGFP positivas y con respuesta a ATP. Esta selección se guardó y superpuso a la secuencia de imágenes de actividad basal. Se generó un código de Matlab para determinar la señal de calcio para cada ROI calculada por $\Delta F = \frac{Fb-F0}{F0}$, donde Fb era la señal normalizada y F0 era el promedio de fluorescencia durante el estado de reposo de la secuencia de imágenes en una ventana de tiempo de 30 segundos, seleccionado cuando no hubo un cambio significativo en la fluorescencia (evento transitorio de calcio). Se trazaron los datos y se seleccionaron las células que mostraban transitorios de calcio espontáneos. Los eventos de fluorescencia se consideraron transitorios de calcio, si excedían 2.5 veces la desviación estándar de la línea basal. Para cada experimento determinamos: 1) número de células con actividad espontánea por área, 2) número de eventos por célula en 7 minutos para rebanada o 10 minutos para cultivo y 3) duración de cada transitorio (en segundos). La duración corresponde al ancho del 50% de la amplitud máxima del trazo, tomando en consideración los puntos más cercanos a dicho valor. Además, para cada preparación, determinamos la cinética de subida y caída de cada transitorio. La cinética de subida se definió como el tiempo necesario para alcanzar del 10% al 90% de la amplitud máxima de cada evento de calcio, mientras que el tiempo de caída se definió como el tiempo necesario para decaer del 90% al 10% de la amplitud máxima de cada evento de calcio.

Para los astrocitos en cultivo primario, aplicamos el paquete interactivo Fluorescence Single Neuron and Network Analysis Package (FluoroSNNAP), un conjunto de rutinas en MATLAB que acepta directamente pilas de actividad de imagen .tif o archivos .csv preprocesados que contienen datos de fluorescencia frente a tiempo. Los pasos principales del análisis son la segmentación, la detección de eventos y la inferencia de red entre células. La segmentación es el proceso de identificación de células individuales en el campo de visión. La detección de eventos incluye métodos para detectar cuándo cada célula muestra un transitorio de calcio que es distinto de las fluctuaciones de ruido en la fluorescencia. La inferencia de red es una variedad de técnicas para estimar varias métricas de conectividad de red de un segmento de video. Todas estas tareas fueron automatizadas trabajando interactivamente en diferentes pasos de la librería del software de acuerdo con las necesidades del análisis mismo (Patel et al., 2015). Por último, para ambos casos, se realizó una proyección de la desviación estándar del conjunto de imágenes durante la serie temporal, donde podemos observar los pixeles cuyos valores tuvieron mayor fluctuación en la intensidad de la fluorescencia. Además se aplicó un LUT (Lookup table) para

convertir la imagen original en una imagen con diferentes colores asignados de acuerdo a los valores de intensidad de fluorescencia para cada pixel.

5.3 Análisis estadístico

Para todos los experimentos, los datos se representaron como la media \pm error estándar de la media y la significancia estadística. Para comparar distribuciones de conjuntos de datos, se utilizó la prueba de Shapiro Wilk o Kolmogorov-Smirnov. Para determinar la comparación entre las diferentes métricas entre los grupos, utilizamos pruebas t de Student paramétricas y pruebas no paramétricas según corresponda. Para el análisis intragrupos, se realizó un análisis de varianza unidireccional y un análisis de varianza bidireccional, seguido de la prueba de comparación múltiple post hoc de Tukey para determinar entre que ensayos existían las diferencias encontradas. El * indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** indica una diferencia significativa ($P < 0.001$).

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación de la coordinación motriz y equilibrio

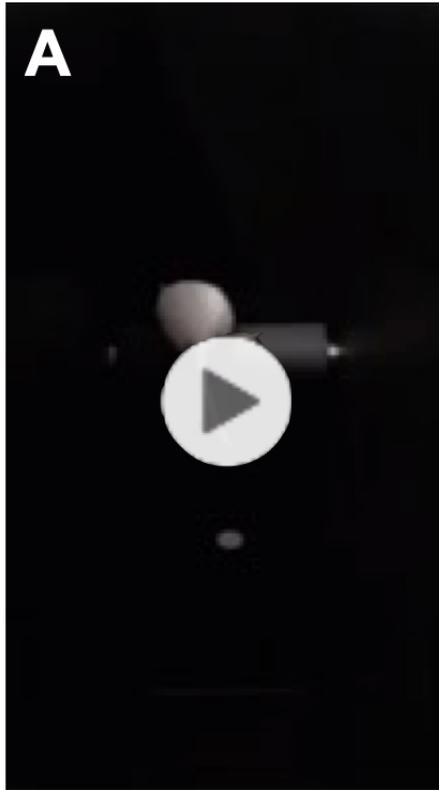
Para monitorear el efecto de la carmustina en los comportamientos asociados con el cerebelo, evaluamos ratones machos transgénicos eGFAP-GFP de 30 días de edad (P30) tratados con carmustina mediante la prueba Rotarod.

La evaluación motora evidenció que los ratones tratados con carmustina mantuvieron su postura sobre el rodillo giratorio por un tiempo menor (Video 1), mostrando diferencias significativas en la latencia promedio de caída : Control 37.64 ± 1.49 s, Carmustina 26.45 ± 1.86 s ($P=0.00013$) (Figura 5). La velocidad alcanzada en los ratones tratados con carmustina fue menor, en relación con el grupo control, mostrando diferencias significativas en la velocidad promedio: Control 16.03 ± 0.42 rpm, Carmustina 12.83 ± 0.59 rpm ($P=0.00044$). La distancia total registrada reveló que el grupo control recorrió una distancia mayor: Control 5.48 ± 0.31 m, Carmustina 3.26 ± 0.30 m ($P=0.00019$). Sin embargo, la exposición a la carmustina no afectó la capacidad de aprender la tarea motora, ya que la latencia de caída, velocidad y distancia mejoraron después de cada prueba (Figura 5).

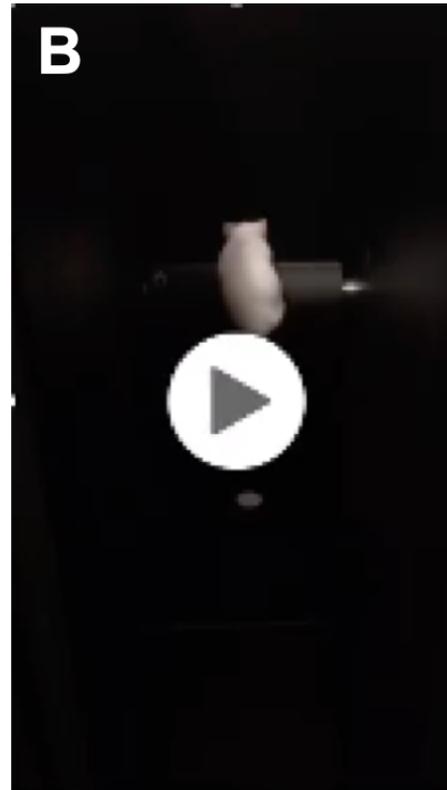
Además, realizamos una comparación intragrupos, donde no observamos diferencias significativas entre los ensayos 1 a 6 para el control (ANOVA F [5,30] = 1.95, P = 0.11519) (Figura 6A) y ratones tratados con carmustina (ANOVA F [5,30] = 0.86, P = 0.51536) (Figura 6B). Aunque notamos una tendencia a pasar más tiempo sobre el rodillo giratorio en el grupo tratado con carmustina con cada prueba, no hubo una diferencia significativa. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con carmustina sólo en el primer y sexto ensayo (ANOVA bidireccional F [11,60] = 3.19, P = 0.01506) (Figura 7C). Se realizó un análisis de varianza unidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey y un análisis de varianza bidireccional.

Finalmente, se analizaron los datos promediados de los seis ensayos de las tres pruebas Rotarod (Control n=6, Carmustina n=6). Una prueba t de Student reveló diferencias significativas ($P < 0.001$) en la latencia promedio para caer (Figura 5D), la velocidad promedio de caída (Figura 5E) y la distancia promedio en la barra (Figura 5F). En conjunto, estos datos confirman que el tratamiento con carmustina altera el comportamiento motor.

CONTROL



CARMUSTINA



Video 1. Video representativo de la evaluación de la coordinación motriz en equipo Rotarod. (A-B). Ratones transgénicos GFAP-eGFP machos de 30 días de edad en ensayo de aceleración (40 RPM por 2 minutos). **(A).** Se muestra la habilidad motora y equilibrio del ratón control para mantenerse por mayor tiempo sobre el rodillo giratorio. A diferencia del ratón tratado con carmustina **(B)** donde se observan alteraciones en la coordinación motriz, cometiendo un error durante la prueba al caer del rodillo.

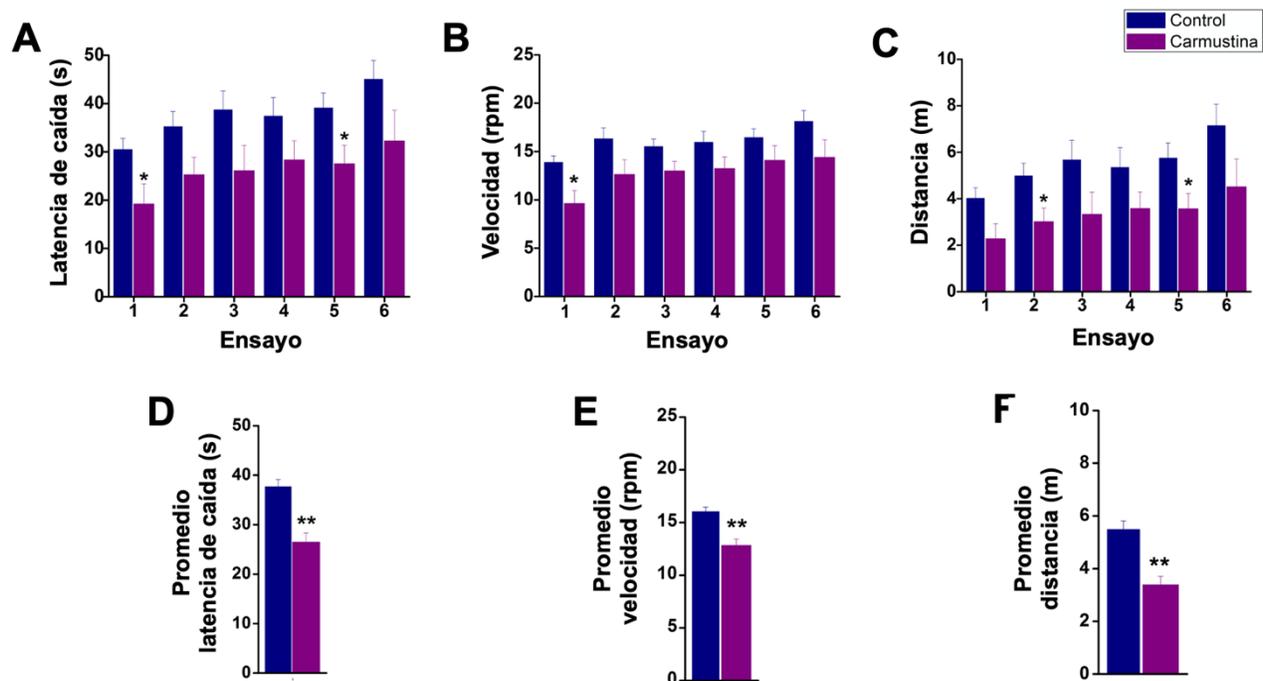


Figura 5. Deficiencias en la coordinación motriz de ratones tratados con carmustina. (A-F) Análisis comparativo entre los grupos control y tratados con carmustina. **(A)** Los ratones tratados con carmustina pasaron menos tiempo en una varilla giratoria acelerada; esto fue significativamente diferente en los ensayos 1 y 5 ($P < 0.05$). **(B)** La velocidad a la que cayó el grupo tratado con carmustina fue más lenta en los seis ensayos, pero estadísticamente significativa sólo en el ensayo 1 ($P < 0.05$). **(C)** El grupo tratado con carmustina viajó una distancia más corta durante la prueba, pero estadísticamente significativa en las pruebas 2 y 5 ($P < 0.05$). **(D)** La latencia promedio para caer se muestra para cada grupo (Control 37.64 ± 1.49 s, Carmustina 26.45 ± 1.86 s) **. **(E)** La velocidad media de caída se muestra para cada grupo (Control 16.03 ± 0.42 rpm, Carmustina 12.83 ± 0.59 rpm) **. **(F)** Se muestra la distancia promedio recorrida para cada grupo (Control 5.48 ± 0.31 m, Carmustina 3.26 ± 0.30 m) **. (Control $n=6$, Carmustina $n=6$). Los datos se representan como la media \pm el error estándar de la media. El * indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** indica una diferencia significativa ($P < 0.001$) ambos en comparación con el grupo de control.

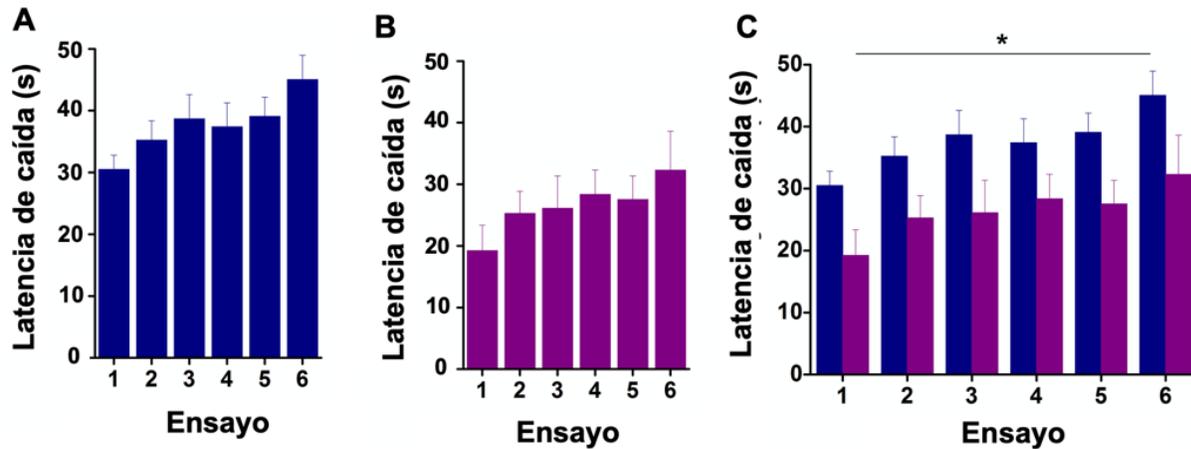
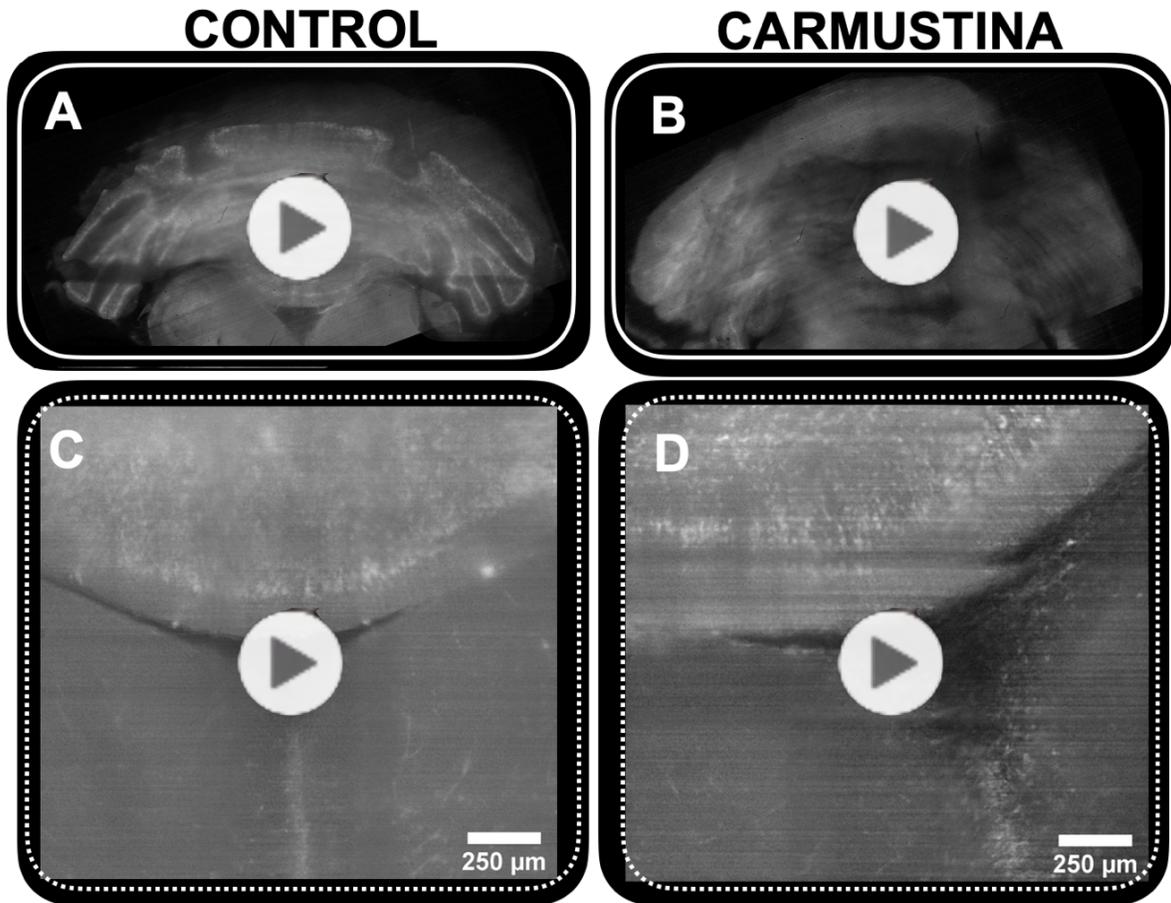


Figura 6. Análisis de varianza intragrupos. (A). La comparación intragrupos no mostró diferencias significativas entre los ensayos 1 a 6 para el control (ANOVA F [5,30] = 1,95, p = 0,11519) y (B) ratones tratados con carmustina (ANOVA F [5,30] = 0.86, p = 0.51536). Aunque notamos una tendencia en el grupo tratado con carmustina a pasar más tiempo en la barra con cada prueba, no hubo una diferencia estadística significativa. (C) Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con carmustina solo en el primer y sexto ensayo (ANOVA bidireccional F [11,60] = 3.19, p = 0.01506). (Control n=6, Carmustina n=6). Los datos se representan como la media ± el error estándar de la media. El * indica una diferencia significativa (P <0.05) y ** indica una diferencia significativa (P <0.001) ambos en comparación con el grupo control.

6.2 Análisis de displasia cortical en el cerebelo por LSM

Para investigar el alcance del efecto de la carmustina en el cerebelo, analizamos la descendencia de ratones transgénicos GFAP-eGFP machos P5-P7 usando microscopía de hoja de luz (Figura 7A-C). Recolectamos datos de cinco cerebelos y determinamos que el área más afectada estaba en contacto con el cuarto ventrículo. Encontramos que las displasias inducidas experimentalmente por carmustina reproducían diversas características morfológicas de las displasias corticales en muestras patológicas humanas (Figura 7D-G), incluyendo: 1) interrupción de la laminación, 2) heterotopias y 3) grupos de complejidad morfológica reducida (Moroni et al., 2008; González,-González et al., 2017). Se observaron múltiples grupos heterotópicos de células gliales, así como la presencia de células de Bergmann y astrocitos velados desplazados a las capas moleculares y granulares (Figura 7E). La desorganización de las células de Bergmann fue evidente: un gran número de somas se estratificaron en la capa granular y no alcanzaron su posición normal en la capa de células de Purkinje; los procesos estaban retraídos y desorganizados, proyectándose lateralmente y no posicionados en la empalizada característica orientada paralela al eje longitudinal de la folia y perpendicular al plano formado por los árboles dendríticos de las neuronas de Purkinje. El efecto de la carmustina fue más evidente en el techo del cuarto ventrículo donde el lóbulo X está en contacto con el líquido cefalorraquídeo, como se muestra en las reconstrucciones adquiridas por sistema microSPIM (Video 2C-D).



Video 2. Reconstrucción de cerebelo por seccionamiento óptico adquirido con microscopía fluorescente de hoja de luz. (A-B) Reconstrucción del cerebelo de un ratón transgénico GFAP-eGFP adquirido con sistema macroSPIM. (B) Se muestra la presencia de displasias corticales en las folias del cerebelo, mostrando una desorganización anatómica evidente, así como en el lóbulo X, donde el tamaño del ventrículo se expande y atrofia. **(C-D)** Reconstrucción del cuarto ventrículo adquirido con sistema microSPIM. **(C)** Vista coronal del techo del cuarto ventrículo donde se muestra el patrón de organización normal de las células de Bergmann, mientras que en el tratado con carmustina se muestra la alteración espacial de las células de Bergmann **(D)**.

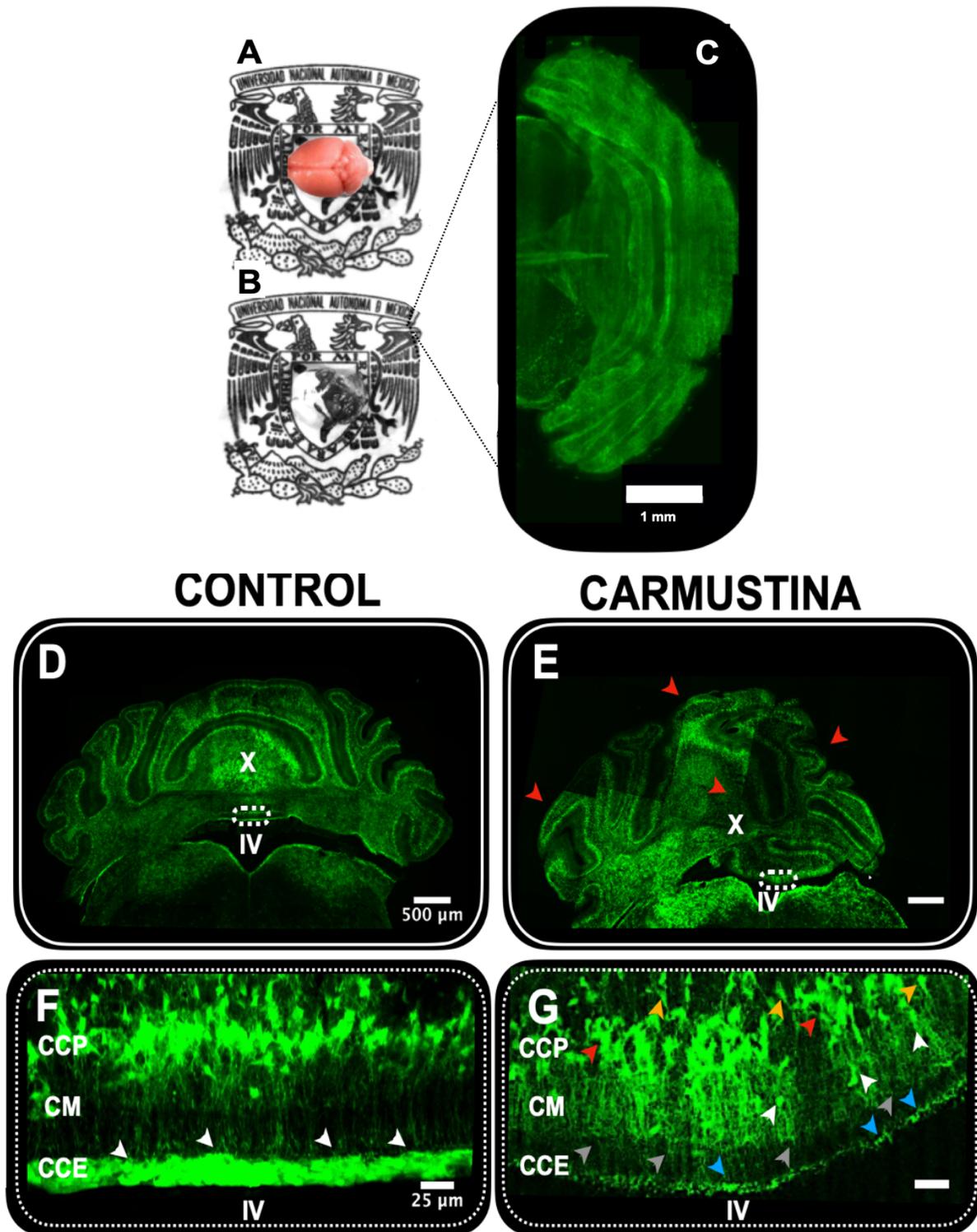


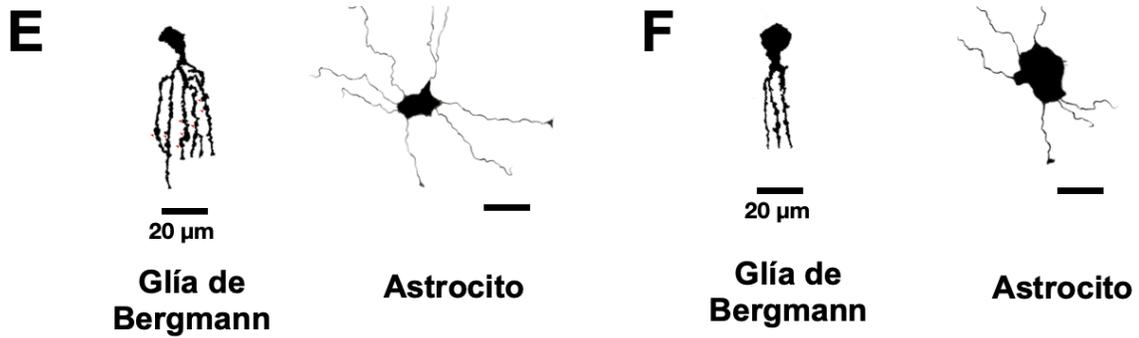
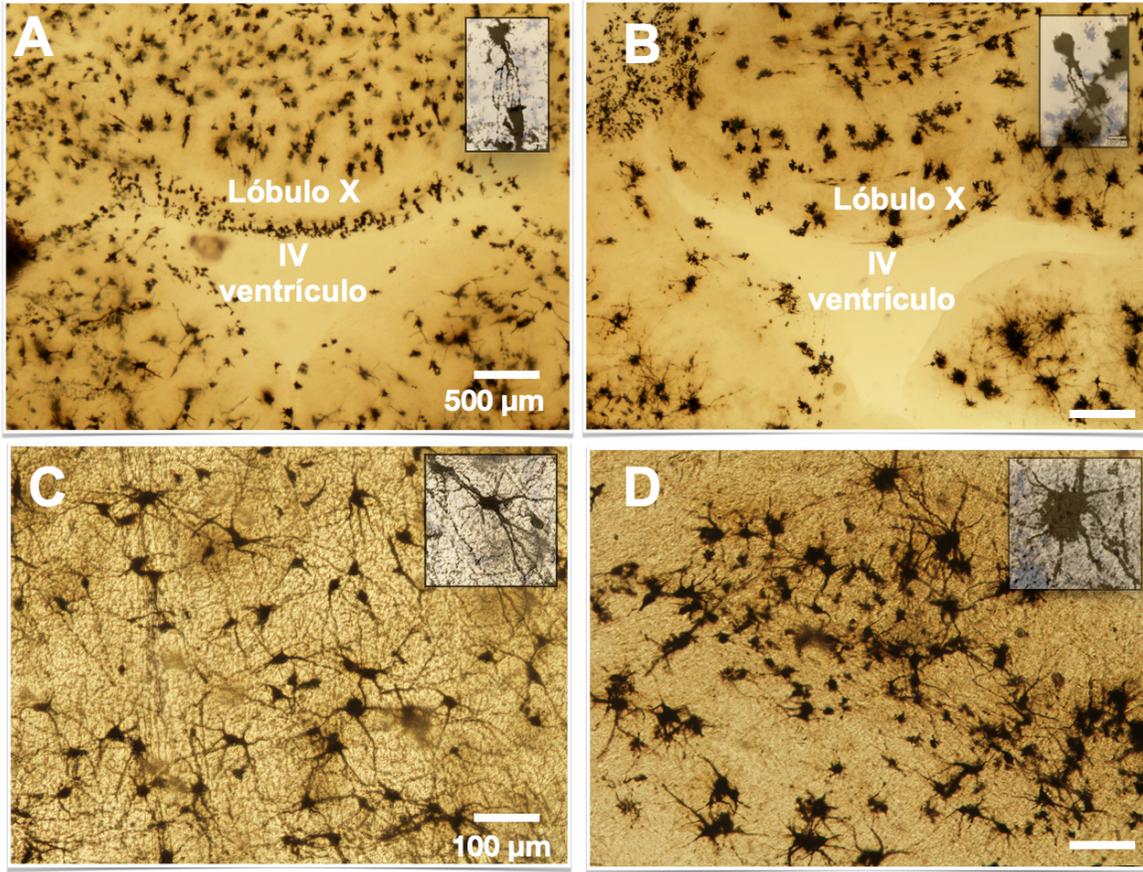
Figura 7. Evidencia morfológica de displasia cortical en el cerebelo por LFSM. (A) Cerebro de ratón transgénico GFAP-eGFP macho de cinco días de edad, antes **(A)** y después de ser clarificado **(B)**. **(C)** Vista dorsal del cerebelo reconstruida por microscopía de hoja de luz. **(D)** Corte óptico del cerebelo de un ratón de control transgénico macho P5 GFAP-eGFP. **(E)** Corte óptico del cerebelo de un ratón transgénico macho P5 GFAP-eGFP tratado con carmustina que muestra la presencia de displasias en los lóbulos en contacto con el IV ventrículo (punta de flecha roja). **(F)** Ampliación del cuadro en **(D)**; aquí las células de Bergmann están situadas en la capa de células de Purkinje, proyectando sus procesos a través de la capa molecular (punta de flecha blanca). **(G)** Ampliación del cuadro en **(E)**, donde las células de Bergmann se ven desplazadas hacia la capa granular (puntas de flecha naranja) y la capa molecular (punta de flecha blanca) con procesos retraídos (punta de flecha gris); así como la presencia de agrupaciones celulares y heterotopias evidenciadas en la capa de células de Purkinje (punta de flecha roja) y capa de células ependimarias (punta de flecha azul). (Control n=5, Carmustina n=5) Verde: GFAP + células gliales. CM: capa molecular, CCP: capa de células de Purkinje, CCG: capa de células granulares, CCE: capa de células ependimarias.

6.3 La carmustina reduce la complejidad morfológica de los astrocitos y las células de Bergman

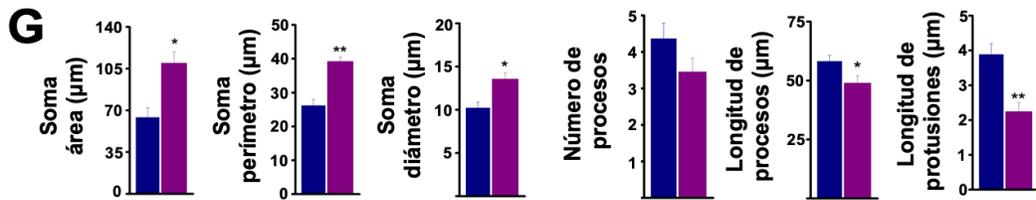
Las células de Bergmann fueron evidentemente afectadas por el tratamiento con carmustina como se observa en la Figura 8. Esto puede sugerir que otras células gliales, como los astrocitos, también pueden verse alteradas por el tratamiento. Por lo tanto, para determinar si este daño se extiende a los astrocitos, preparamos secciones histológicas para la tinción de Golgi-Cox. Este procedimiento confirmó la prevalencia de displasia cortical en el techo del cuarto ventrículo y reveló un aumento en el tamaño del soma y una atrofia en la complejidad de las células de Bergmann y los procesos de astrocitos (Figura 8). Tanto la glía de Bergmann como los astrocitos mostraron cambios morfológicos en el soma y los procesos, los cuales se encontraron retraídos y difusos (Figura 8E-F). La medición de las diferentes características evidenció lo siguiente: la glía de Bergmann mostró diferencias significativas para el diámetro del soma Control $10.20 \pm 0.68 \mu\text{m}$, Carmustina $13.55 \pm 0.72 \mu\text{m}$ ($P=0.00309$); área Control $63.99 \pm 7.95 \mu\text{m}^2$, Carmustina $109.60 \pm 9.33 \mu\text{m}^2$ ($P=0.00135$) y perímetro del soma Control $26.14 \pm 1.78 \mu\text{m}$, Carmustina $39.20 \pm 1.33 \mu\text{m}$ ($P=0.00097$), así como la longitud de los procesos Control $58.11 \pm 2.56 \mu\text{m}$, Carmustina $48.92 \pm 3.09 \mu\text{m}$ ($P=0.03131$) y la longitud de las protuberancias de los procesos (Control $3.88 \pm 0.30 \mu\text{m}$, Carmustina $2.24 \pm 0.26 \mu\text{m}$) ($P=0.000776$); no se encontraron diferencias significativas en el número de procesos Control 4.36 ± 0.43 , Carmustina 3.45 ± 0.36 ($P=0.12408$). Se analizaron de 1 a 3 glía de Bergmann por cada experimento, $n=6$ para ratones de control y $n=6$ para ratones tratados con carmustina. En astrocitos, el análisis mostró que hay una diferencia significativa para el diámetro del soma Control $16.42 \pm 0.69 \mu\text{m}$, Carmustina $23.48 \pm 0.55 \mu\text{m}$ ($P=0.0002998$), área Control $142.65 \pm 7.61 \mu\text{m}^2$, Carmustina $253.79 \pm 8.37 \mu\text{m}^2$ ($P=0.000940$) y perímetro Control $45.76 \pm 1.58 \mu\text{m}$, Carmustina $58.95 \pm 1.17 \mu\text{m}$ ($P=0.000741$), así como el número Control 7.68 ± 0.26 , Carmustina 5.31 ± 0.14 ($P=0.000307$) y la longitud de los procesos Control $61.04 \pm 1.30 \mu\text{m}$, Carmustina $33.29 \pm 0.74 \mu\text{m}$ ($P=0.0000162$). Se analizaron de 6 a 8 astrocitos para cada experimento, $n=6$ para ratones control y $n=6$ para ratones tratados con carmustina. Los datos se representan como la media \pm el error estándar de la media.

CONTROL

CARMUSTINA



Glía de Bergmann



Astrocytos

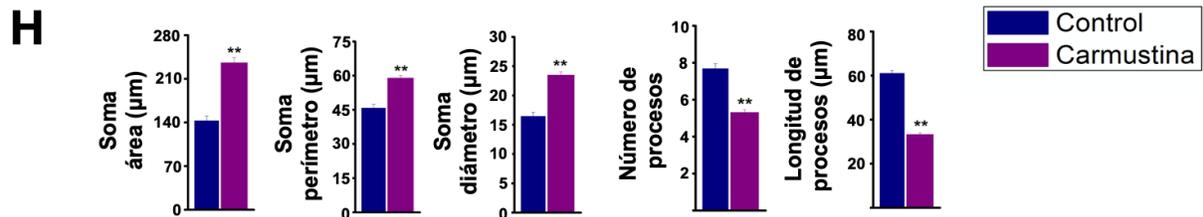


Figura 8. El tratamiento con carmustina redujo la complejidad morfológica de la glía de Bergmann y astrocitos. (A-D) Corte coronal del cerebelo procesado por tinción de Golgi-Cox. En la parte superior derecha se muestran células impregnadas representativas. A nivel del lóbulo X en contacto con el ventrículo se presenta una displasia cortical **(B)** y se observa la presencia de heterotopias en los astrocitos cerebelosos **(D)**. **(E-F)**. Dibujos representativos con cámara lucida de una célula de Bergmann del lóbulo X y un astrocito de la corteza cerebelosa, control y carmustina respectivamente. En el grupo control se observa la complejidad y extensión de los procesos de los astrocitos, lo que contrasta con el grupo tratado con carmustina, ya que se observan menos procesos, los cuales además son difusos, así como un aumento en el tamaño del soma. **(G y H)**. Análisis comparativo entre el grupo control y el grupo tratado con carmustina (se analizaron de 1 a 3 glía de Bergmann para cada experimento; Control n=6, Carmustina n=6 y se analizaron de 6 a 8 células de astrocitos para cada experimento; Control n=6, Carmustina n=6). Los datos se representan como la media \pm el error estándar de la media. * indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** indica una diferencia significativa ($P < 0.001$) ambos en comparación con el grupo de control.

6.4 La carmustina indujo un mayor número de células de Bergmann involucradas en oscilaciones espontáneas de calcio

La excitabilidad de las células gliales se mide en relación con la señalización del calcio intracelular. Dado que las células de Bergmann se vieron afectadas morfológicamente por el tratamiento con carmustina, se predijo que podrían haber ocurrido cambios en su comunicación. La glía de Bergmann genera transitorios espontáneos de calcio que se sabe que modulan las interacciones funcionales con las células de Purkinje (Metea y Newman, 2006; Mathiesen et al., 2013). Para probar si los cambios morfológicos de las células de Bergmann están relacionados con cambios funcionales, determinamos la actividad basal de la dinámica del calcio intracelular de este grupo de células. Los cambios en la actividad del calcio se determinaron en grabaciones de imágenes de 7 minutos en rebandas de cerebelo cargadas con Calcium Orange, AM, en las que observamos poca actividad en la glía de Bergmann (Figura 9, Control), en línea con observaciones anteriores (Metea y Newman, 2006; Nimmerjhan et al., 2009; Bierlein, 2013; Mathiesen et al., 2013). La mayoría de las células de Bergmann permanecieron inactivas durante los registros y solo unas pocas 2.5 ± 0.28 células de 83.5 ± 6.11 en la rebanda control y 4.5 ± 0.57 células de 76.25 ± 2.39 células en la rebanda tratada con carmustina estaban activas. Al final de las grabaciones, se aplicó ATP $100 \mu\text{M}$, lo cual incrementó la concentración de calcio evocando un cambio en la intensidad de la fluorescencia (dF/F_0) en todas las células de Bergmann, corroborando así la viabilidad de la rebanda y la capacidad de las células de Bergmann para evocar actividad de calcio. La Figura 9 muestra un mapa de calor, obtenido de una proyección máxima de la desviación estándar del conjunto de imágenes durante la serie temporal, donde podemos observar los pixeles cuyos valores tuvieron mayor fluctuación en la intensidad de la fluorescencia (rojo) representando una mayor actividad de calcio, mientras que el color azul representa el valor mínimo de cambio en la intensidad de la fluorescencia. La imagen revela una mayor actividad en el cerebelo tratado con carmustina, principalmente en las células de Bergmann, astrocitos de la capa granular y células ependimarias (Figura 9B). El análisis

comparativo mostró que la glía de Bergmann del grupo tratado con carmustina participa más en la actividad espontánea Control 2.5 ± 0.28 , Carmustina 4.5 ± 0.57 ($P=0.00271$), con un número reducido de eventos transitorios de calcio por célula Control 2.28 ± 1.06 , Carmustina 1.07 ± 0.07 ($P=0.000562$), una duración reducida de eventos transitorios (Control 10.71 ± 5.99 s, Carmustina 5.71 ± 2.83 s) ($P=0.00347$) y diferentes cinéticas de activación e inactivación para cada transitorio: cinética de activación, Control 3.54 ± 0.37 , Carmustina 1.95 ± 0.45 s ($P=0.01478$); cinética de inactivación, Control 4.09 ± 0.73 , Carmustina 2.84 ± 0.63 s ($P=0.20682$).

Además, el incremento de calcio dependiente de ATP en la glía de Bergmann mostró diferencias significativas en el análisis comparativo entre el grupo de control y el grupo tratado con carmustina para la duración transitoria (Figura 9H): Control 3.8 ± 0.37 s, Carmustina 25.8 ± 4.2 s ($P=0.0008051$). Se reclutaron un promedio de 83.5 ± 6.11 células de Bergmann en actividad en el área registrada de cada corte experimental ($n=6$ crías de ratones de control), mientras que se reclutaron 76.25 ± 2.39 células de Bergmann en rebanadas tratadas con carmustina ($n=5$ crías, cada cría de una madre diferente tratada con carmustina). Los datos en la Figura 9G se representan como la media \pm error estándar de la media. Estos resultados muestran que los cambios morfológicos en las células de Bergmann afectan gravemente a sus propiedades funcionales; no obstante, existe un incremento de calcio dependiente de ATP.

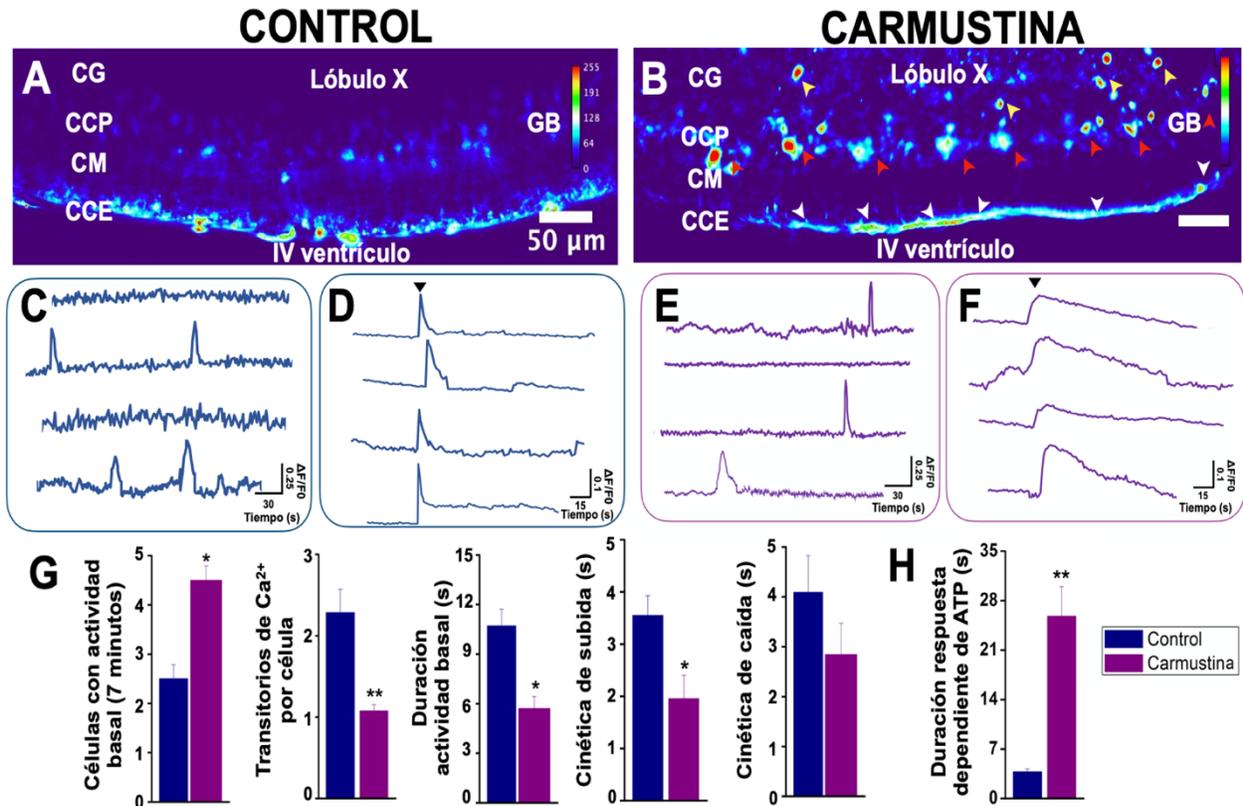


Figura 9. La actividad basal de la glía de Bergmann aumenta en la displasia cortical. (A y B) Mapa de calor de la máxima proyección de la actividad basal de la glía de Bergmann de una sección coronal del lóbulo X del cerebelo cargado con el indicador de calcio Calcium orange AM. **(B)** La imagen revela una mayor actividad en el cerebelo tratado con carmustina, principalmente en la glía de Bergmann (puntas de flecha rojas), astrocitos de la capa granular (puntas de flecha amarillas) y células ependimales (puntas de flecha blancas). **(C y E)** Trazos representativos de la actividad basal de calcio de células de Bergmann en registros de 7 minutos, control y tratado con carmustina respectivamente. Más células participaron en la actividad de calcio en los animales tratados con carmustina. Obsérvense las diferencias en la cinética de actividad. **(D y F)** Al final de los registros, la aplicación de ATP (punta de flecha negra) aumentó la respuesta de fluorescencia de calcio (dF/F0) en todas las glías de Bergmann. **(G)** Análisis comparativo entre el grupo control y los grupos tratados con carmustina. Las glías de Bergmann de ratones tratados con carmustina presentaron más células con actividad espontánea de calcio, pero con un número reducido de eventos transitorios de calcio por célula. La glía de Bergmann también exhibió una duración más corta y una cinética de tiempo de activación e inactivación reducidas en tiempo. Un promedio de 83.5 ± 6.11 células de Bergmann respondieron al ATP en el área registrada de cada corte experimental (n=6), mientras que 76.25 ± 2.39 células de Bergmann respondieron al ATP en rebanadas tratadas con carmustina (Carmustina n=5 crías, cada una de una madre diferente tratada con carmustina). **(H)** Las respuestas de calcio dependientes de ATP en la glía de Bergmann presentaron mayor duración en los ratones tratados con carmustina: Control 3.8 ± 0.37417 s, Carmustina 25.8 ± 4.2 s mostrando diferencias significativas. Los datos se representan como la media \pm el error estándar de la media. El * indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** indica una diferencia significativa ($P < 0.001$) ambos en comparación con el grupo de control. CM: capa molecular, CCP: capa de células de Purkinje, CG: capa de células granulares, CCE: capa de células ependimales.

6.5 La carmustina indujo una reducción en la complejidad de la morfología de los astrocitos que muestran más oscilaciones de calcio espontáneas *in vitro*

Para evaluar el efecto de la carmustina en los astrocitos, utilizamos cultivos primarios de astrocitos de cerebelo aislados de la descendencia de ratones CD1 y evaluamos la dinámica de la actividad basal de calcio *in vitro*. Similar a las secciones histológicas, los astrocitos en cultivo en DIV5 mostraron una reducción en su complejidad morfológica: diámetro del soma Control $14.02 \pm 0.56 \mu\text{m}$, Carmustina $11.41 \pm 0.50 \mu\text{m}$ ($P=0.00248$), área del soma Control $277.73 \pm 17.11 \mu\text{m}^2$, Carmustina $189.46 \pm 20.72 \mu\text{m}^2$ ($P=0.000292$) y perímetro del soma Control $65.26 \pm 2.85 \mu\text{m}$, Carmustina $50.56 \pm 2.53 \mu\text{m}$ ($P=0.0000540$) así como en el número Control 3.71 ± 0.20 , Carmustina 2.80 ± 0.16 ($P=0.00000963$) y longitud de los procesos (Control $50.79 \pm 2.31 \mu\text{m}$, carmustina $26.69 \pm 1.28 \mu\text{m}$) ($P=0.000004491$). Se analizaron de 3 a 5 células de astrocitos de cada experimento; Control $n=4$, Carmustina $n=4$ (Figura 10).

A continuación, determinamos la dinámica intracelular de calcio (Figura 11). Inesperadamente, aunque la complejidad de los procesos de los astrocitos se redujo con el tratamiento con carmustina, observamos que estas células exhibieron una mayor actividad espontánea en registros de 10 minutos Control 26.5 ± 8.06 , Carmustina 32.75 ± 12.25 y mostraron un mayor número de eventos de transitorios de calcio por célula: Control 1.74 ± 0.23 , Carmustina 3.17 ± 0.29 ($P<0.05$), una duración reducida de eventos transitorios (Control 14.36 ± 0.30 s, Carmustina 12.15 ± 0.23 s ($P<0.05$)) y cinética de activación e inactivación de cada transitorio, cinética de activación Control 8.56 ± 0.29 , Carmustina 6.81 ± 0.19 s ($P<0.001$); cinética de inactivación Control 6.07 ± 0.19 , Carmustina 4.70 ± 0.14 s ($P<0.001$). En los cultivos control, se reclutaron 87.25 ± 15.36 astrocitos en el DIV5, $n=4$. Se utilizaron 8 crías, 2 para cada cultivo de control, mientras que se reclutaron 89.50 ± 12.29 astrocitos en el DIV 5, $n=4$. Se utilizaron 8 crías, 2 para cada cultivo de carmustina. Los datos trazados en la Figura 11G se representan como la media \pm error estándar de la media.

La Figura 13 muestra un análisis comparativo de la morfología celular y la cinética del calcio en 5-7 DIV. Juntos, estos datos sugieren que la actividad del calcio de los astrocitos se ve afectada por el tratamiento con carmustina y que los efectos permanecen incluso después de que las células se cultivan *in vitro*.

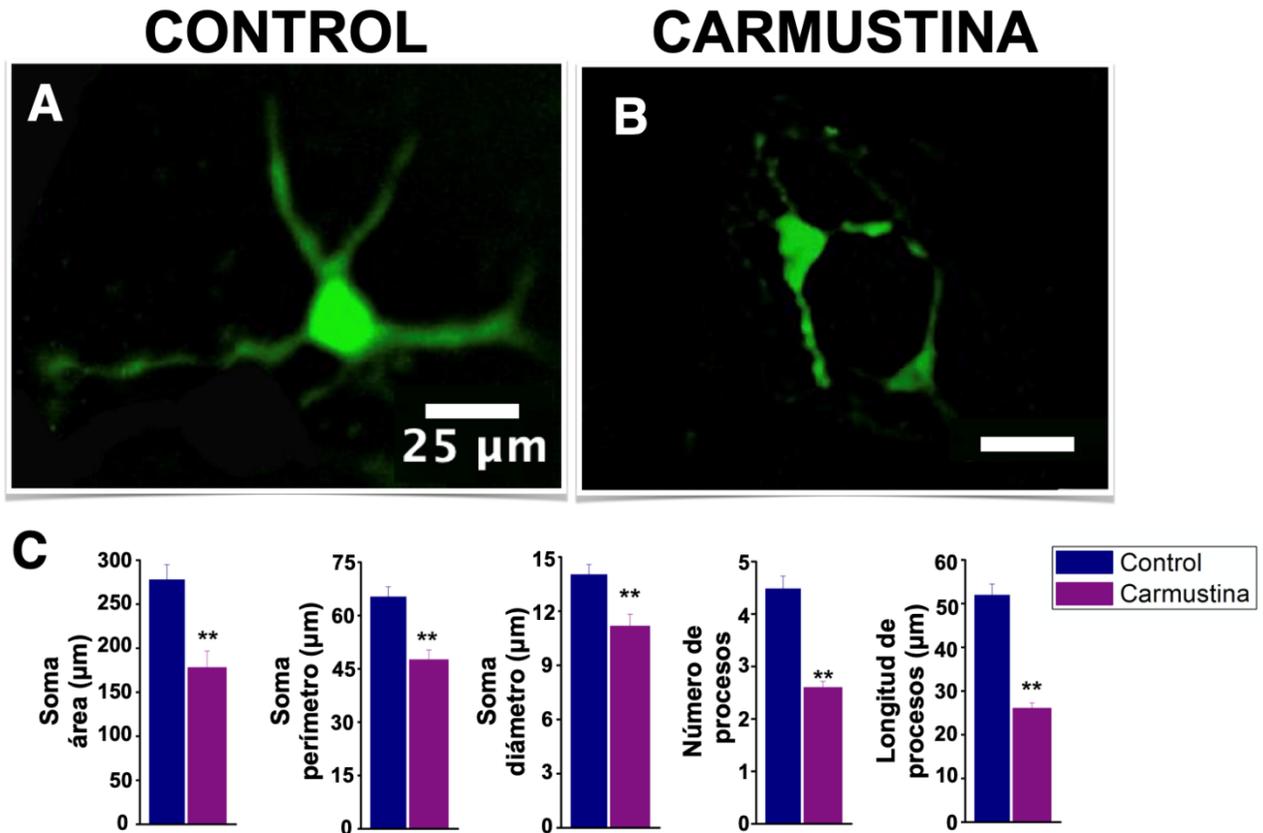


Figura 10. Disminución de la complejidad morfológica de los astrocitos tratados con carmustina *in vitro*. (A-B). Imágenes representativas de astrocitos *in vitro* obtenidos de cultivos primarios de cerebelo en DIV5. **(A)** La morfología y el alcance de los procesos de los astrocitos control son evidentes. **(B)** Los astrocitos de ratones tratados con carmustina mostraron un número reducido de procesos que se retrajeron. **(C).** Análisis comparativo entre el grupo control y el grupo tratado con carmustina para cada parámetro: área del soma, perímetro del soma, diámetro del soma, número de procesos y duración de los procesos. (Se analizaron de 3 a 5 células de astrocitos de cada experimento; Control n=4, Carmustina n=4). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media. El * indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** indica una diferencia significativa ($P < 0.001$).

6.6 Las oscilaciones de calcio de los astrocitos *in vitro* muestran una red de sincronización global interrumpida

Los astrocitos forman un fenómeno complejo de redes activas de sincronización global *in vitro* (Pérez-Ortega, 2016; Kanner et al., 2018). Para comprender si cambió la dinámica de las oscilaciones de calcio después del tratamiento con carmustina en la red astrocítica formada *in vitro*, estudiamos las interacciones entre el número de eventos transitorios de calcio simultáneos a lo largo del tiempo en el mismo campo de visión, utilizando el software FluoroSNNAP (Patel et al., 2015). Los patrones de actividad basal en astrocitos tratados con carmustina en DIV5 mostraron un menor nivel de matriz de sincronización (Control 0.13 ± 0.02 , Carmustina 0.05 ± 0.01 , revelando diferencias significativas ($P < 0.005$) usando una prueba t de student), independientemente del aumento en la frecuencia de las oscilaciones de calcio, que evidentemente no están en sincronía, ya que actúan independientemente de las células vecinas, mostrando así una matriz de sincronización escasa, Figura 12D. Esto está en consonancia con informes anteriores que indicaron que la sincronización global se interrumpe en los astrocitos con una morfología compleja reducida (Kanner et al., 2018; Mathiesen et al., 2013; Dong et al., 2018).

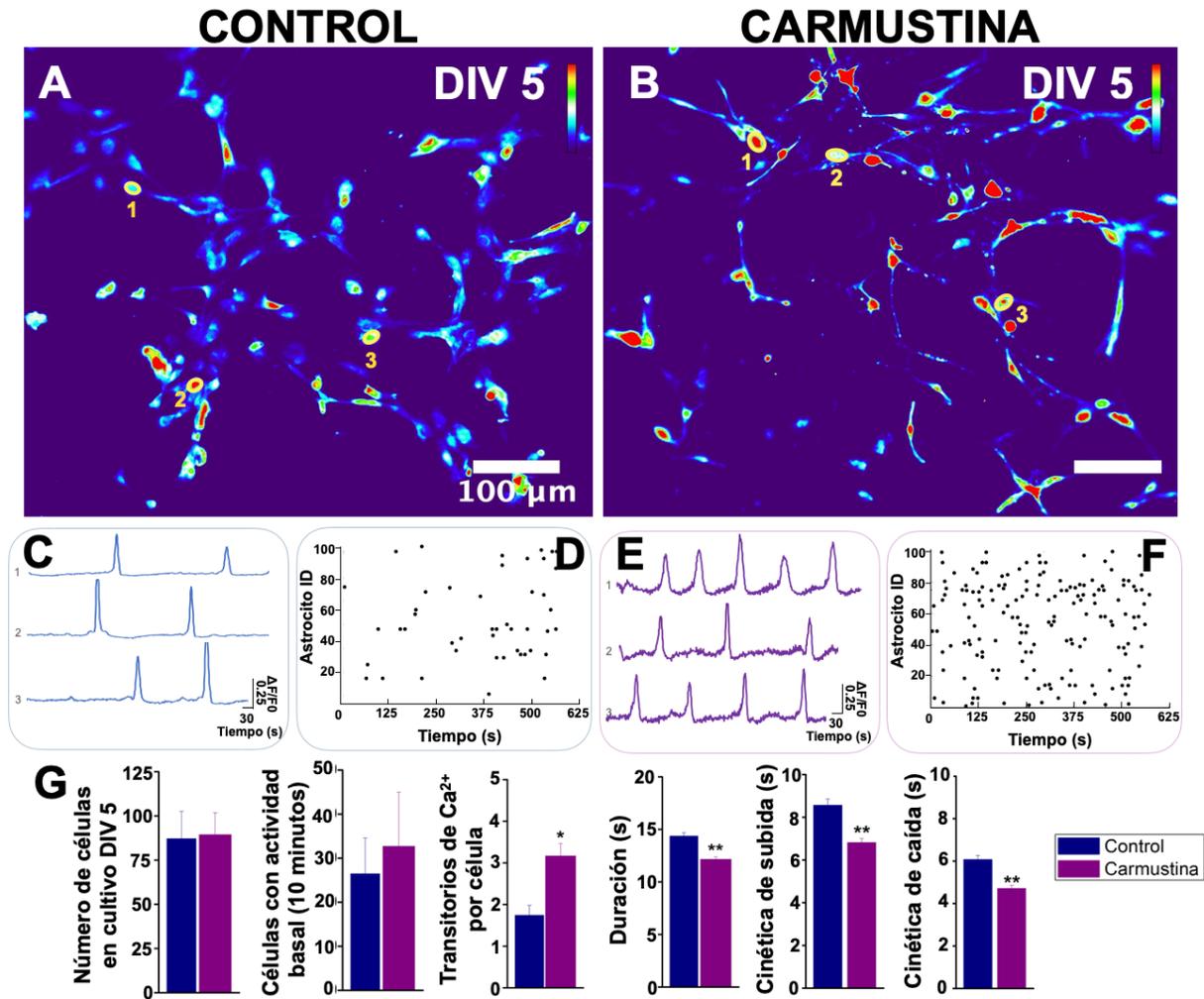


Figura 11. Actividad basal de astrocitos del cerebelo en cultivo. (A y B). Mapa de calor de las imágenes de proyección máxima de la actividad basal de cultivos primarios de astrocitos cerebelosos en DIV5 cargado con el indicador de calcio Fluo4 AM. Trazos representativos de la actividad basal de astrocitos de cerebelo en cultivos de 10 minutos de un ratón control y uno tratado con carmustina respectivamente. **(E y F).** Raster plot de la actividad basal de cada uno de los grupos. La actividad basal de los astrocitos individuales se muestra a lo largo del tiempo. El eje Y corresponde al ID de cada astrocito y un punto indica el tiempo en el que ocurrió un evento transitorio de calcio. **(F)** En donde se puede apreciar de acuerdo al raster que hay mayor actividad en el ratón tratado con carmustina a diferencia del control. **(G).** Análisis comparativo entre el control y el grupo tratado con carmustina. Los astrocitos del cultivo de ratones tratados con carmustina presentaron más células con actividad espontánea de calcio, con un mayor número de eventos transitorios de calcio por célula. Los astrocitos también mostraron una duración más corta y una cinética reducida del tiempo de subida y bajada de estos eventos. Un promedio de 87.25 ± 15.36 astrocitos respondieron al ATP en el cultivo DIV5, Control $n=4$, se utilizaron 8 crías, 2 para cada cultivo control; mientras que 89.50 ± 12.29 astrocitos respondieron a ATP en DIV 5, carmustina $n=4$, 8 crías, 2 por cada cultivo de carmustina). Los datos se representan como la media \pm el error estándar de la media. * indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** indica una diferencia significativa ($P < 0.001$) ambos en comparación con el grupo de control.

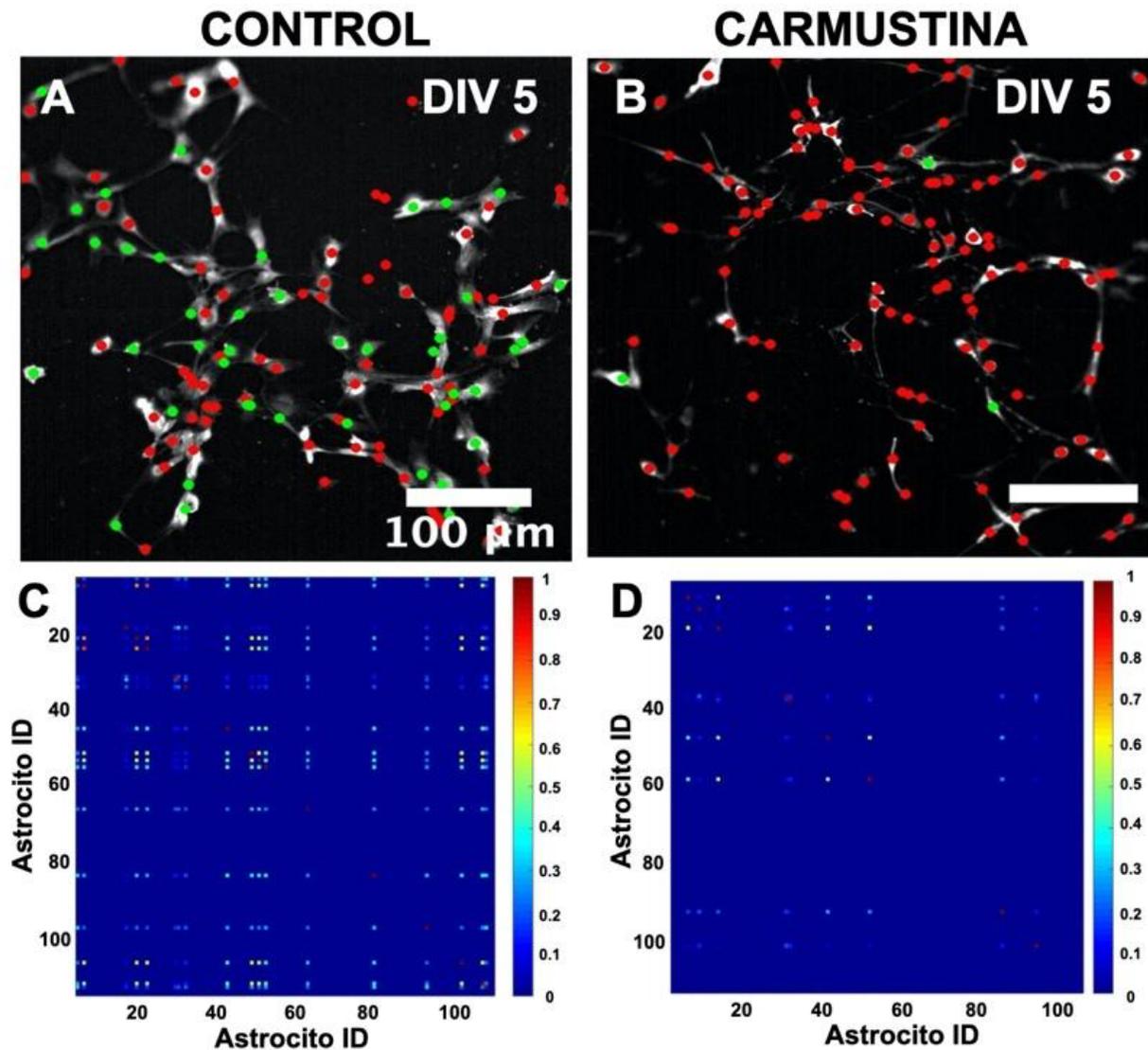


Figura 12. Sincronización de la red global en astrocitos de cerebelo en cultivo. (A y B). Imágenes representativas de astrocitos en cultivo donde se muestra una matriz de sincronización por pares. Los astrocitos que exhibieron coactivación se muestran en verde. **(C y D).** Imágenes representativas del conjunto central, definido como un grupo de astrocitos coactivos. Cada astrocito (círculo de color) es un nodo. Los nodos que se conservan en todos los conjuntos significativamente correlacionados están en verde y el resto en rojo. El conjunto central conserva la distribución espacial de los astrocitos en el cultivo. La barra de calibración corresponde a los eventos en los que los astrocitos se activaron juntos. 87.25 ± 15.36 astrocitos fueron reclutados en el DIV5, Control $n=4$, se usaron 8 crías, 2 para cada cultivo de control; mientras que 89.50 ± 12.29 astrocitos fueron reclutados en DIV 5, Carmustina $n=4$, 8 crías, 2 por cada cultivo de carmustina.

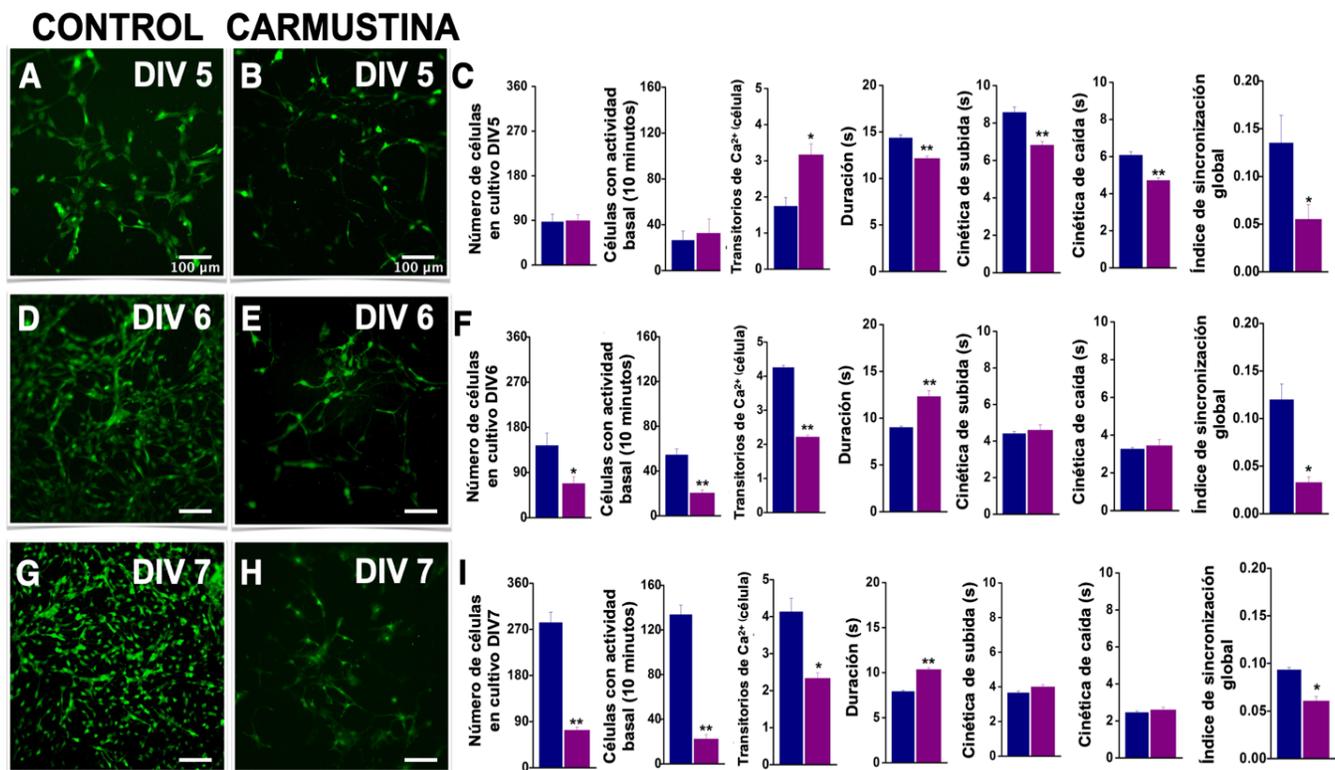


Figura 13. Resumen del crecimiento y actividad de astrocitos de cerebelo en cultivo DIV5-DIV7. Cultivo primario de astrocitos del cerebelo de ratones macho CD1 en DIV5 (A-B), DIV6 (D-E) y DIV7 (G-H) cargados con el indicador de calcio Fluo4 AM. (C, F, I). Análisis comparativo entre el grupo control y el grupo tratado con carmustina para cada uno de los criterios de evaluación. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media. El * indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) y ** indica una diferencia significativa ($P < 0.001$) ambos en comparación con el grupo de control.

7. Discusión

Empleando un modelo experimental de displasia cortical inducida por carmustina, hemos evaluado los efectos sobre astrocitos y glía de Bergmann del cerebelo. Durante el desarrollo embrionario, entre E13-E14, se derivan de células gliales radiales en la zona ventricular diversos precursores, entre ellos la glía de Bergmann (Buffo & Rossi, 2013). Elegimos E13 para administrar carmustina ya que este es el pico de gliogénesis que coincide con el aumento de células de Bergmann (Bernadette & Kriegstein, 2002). Estudios anteriores demostraron que los mecanismos que dan lugar a la foliación cerebelosa y la organización laminar dependen de la regulación del gen *Zeb2* en la glía de Bergmann durante el desarrollo del cerebelo (He et al., 2018). Por lo tanto, hipotetizamos que los cambios en la diferenciación de la glía de Bergmann interrumpirían la migración celular, produciendo una estratificación anormal de las capas celulares y una distribución espacial alterada que provocaría malformaciones en la corteza cerebelosa. Como se muestra en nuestros hallazgos con microscopia fluorescente de hoja de luz, se observaron alteraciones corticales en todo el cerebelo, pero con mayor frecuencia en el lóbulo que está en contacto con el cuarto ventrículo. La microscopía de hoja de luz, ha dado pauta a la adquisición de alto rendimiento de imágenes por seccionamiento óptico de una vista en 3D del cerebro, con una resolución de escala en micras (Frasconi et al. 2014), demostrando ser un método que permite definir detalles de la estructura del sistema nervioso, como lo fue el estudio de Silvestri y colaboradores en 2015, donde se logró mapear por completo a las células de Purkinje en todo el cerebelo del ratón. Este tipo de microscopía permitió observar la respuesta al precondicionamiento hipóxico de las células gliales del techo del cuarto ventrículo y una reducción en el número de somas de glía de Bergmann en los lóbulos del vermis y un mayor número de somas en los hemisferios (Becerra-González et al., 2019). Además en 2021, Ricci y su equipo de trabajo desarrollaron diversos métodos para mejorar la resolución óptica y el enfoque pos-procesamiento de manera digital. De tal modo que la microscopía basada en láminas de luz es un método de vanguardia para mapear las células con mayor contraste de definición sin perder información.

El análisis de las pruebas de comportamiento de los animales tratados con carmustina reveló un deterioro en la coordinación y la actividad locomotora, lo que proporciona evidencia del impacto de este tratamiento en la función motora coordinada por el cerebelo, pero no en el aprendizaje motor o la capacidad de aprender las tareas motoras (Figura 5). Los defectos y alteraciones en el desarrollo cortical cerebeloso son dos causas principales de déficits cognitivos y motores (Leung & Li, 2018).

Sin embargo, al observar los drásticos cambios en la citoarquitectura en edad joven y al ver los resultados del estudio locomotor realizado en edad adulta, suponemos que existe un posible restablecimiento de la citoarquitectura, al no verse dramáticamente afectado el comportamiento motor y no presentar crisis convulsivas como lo han reportado en estudios previos (Penacchio et al., 2015). Además se ha propuesto que la glía radial posee capacidad de célula troncal con capacidad de gliogénica y neurogénica (Ihrie y Álvarez-Buylla, 2008); mientras que los astrocitos tienen la capacidad de ser un precursor pluripotencial (Kettenman y Verkhratsky, 2008). De modo tal que podría postularse que la glía radial de la zona periventricular en respuesta a estímulos derivados del daño producido por la carmustina pueden contribuir a la plasticidad celular de dicha región cerebelar reestableciendo la citoarquitectura en edad adulta ó exista algún tipo de regeneración celular incluso en el componente neural, contribuyendo con ello a un mayor control en el comportamiento motor.

La formación adecuada de la glía de Bergmann durante el desarrollo es importante para la formación del cerebelo y cuando este desarrollo es perturbado conlleva a modificaciones en la organización celular. Por ejemplo, el parto prematuro inducido por cesáreas en cerdos redujo el desarrollo de la glía de Bergmann y precursores de células granulares (Iskusnykh et al., 2018). Además, recién nacidos prematuros que murieron poco después del nacimiento mostraron un número reducido de glía de Bergmann (Haldipur et al., 2011).

Las células gliales son eléctricamente no excitables, pero muestran transitorios espontáneos de calcio intracelular en respuesta a la activación de receptores de membrana específicos (Piet & Jahr, 2007), las células de Bergmann expresan receptores glutamato tipo AMPA, compuestos por las subunidades GluA1 y GluA4 (Piet & Jahr, 2007). La actividad basal de calcio de las células es un fenómeno complejo que depende de los cambios en corrientes iónicas, la homeostasis del entorno extracelular y la maduración celular (Kanner et al., 2018). La obtención de imágenes de células cargadas con indicadores fluorescentes es un método eficaz para detectar la actividad de calcio celular con una buena resolución espacial y temporal, por ello existen una amplia variedad de indicadores de calcio disponibles, con diferentes espectros de excitación y emisión, permeabilidad celular y además de diferencias en la afinidad del calcio. En consecuencia, la elección de los indicadores de calcio que utilizamos se evaluó en relación con la señalización de calcio que deseábamos medir. Tanto para los experimentos en rebanada como en cultivo, utilizamos indicadores derivados de éster AM, los cuales se utilizan para enmascarar las cargas negativas, lo que hace que las moléculas indicadoras sean más lipófilas y permeables a la membrana (MacLean & Yuste, 2009), lo que les permite ingresar a la célula con mayor facilidad, dando como resultado una eficiencia en el cargado.

Además en el caso de las rebanadas, al utilizar el ratón trasgénico que expresa GFP bajo el control del promotor GFAP para seleccionar las células gliales de interés, empleamos el indicador de calcio Calcium Orange AM ya que nos brindaba la ventaja de tener suficiente desplazamiento hacia el rojo en su emisión, por lo que se podía usar fácilmente en combinación con GFP sin necesidad de corrección espectral. Sin embargo, el régimen experimental al implicar una adquisición de imágenes de larga duración, dio como resultado el fotoblanqueo del fluoróforo, dando lugar a una pérdida irreversible de fluorescencia, siendo una de las principales limitaciones en el tiempo de registro en rebanada, logrando obtener registros de alrededor de 7 minutos en actividad basal, en comparación al cultivo celular, donde al emplear tejido de un ratón de cepa silvestre fue posible utilizar el indicador de calcio Fluo-4, el cual muestra una tasa de fotoblanqueo más lenta que otros indicadores, obteniendo tiempos de registro de alrededor de 10 minutos en actividad basal (MacLean & Yuste, 2009).

En este estudio, mostramos una mayor actividad basal de glía de Bergmann y astrocitos en ratones tratados con carmustina. La actividad basal en glía de Bergmann fue relativamente baja y en muchas células no detectamos ninguna respuesta durante el tiempo de registro basal. Estos hallazgos están en línea con informes anteriores (Metea & Newman, 2006; Mathiesen et al., 2013) que indicaron que las oscilaciones de calcio de las células de Bergmann son de hecho poco frecuentes, independientemente de la preparación. En contraste, en los animales tratados con carmustina la glía de Bergmann mostró más eventos de calcio, además, la duración de cada evento se redujo y la cinética se alteró. Aunque el incremento en el número de células de Bergmann en el modelo de carmustina es poco, es relevante respecto a la población celular total, ya que estudios previos han demostrado que incluso después de múltiples ensayos, la probabilidad de aumentos espontáneos de calcio sigue siendo muy bajo (Bierlein, 2013), lo cual no sucede así en el ratón tratado con carmustina. Este resultado fue inesperado ya que las células de Bergmann se vieron afectadas morfológicamente, como se evidencia en la preparación de Golgi-Cox (Figura 8), mostrando un aumento en el tamaño del soma y retracción de sus procesos. Como se mencionó anteriormente, la señalización del calcio depende de la activación de receptores de membrana específicos, las células de Bergmann expresan receptores glutamato tipo AMPA, compuestos por las subunidades GluA1 y GluA4 (Piet & Jahr, 2007). En un estudio de Saab en 2012, la delección de los genes que codifican para los receptores AMPA en glía de Bergmann, provocó cambios estructurales y la retracción de sus procesos, afectando las corrientes evocadas de neuronas de Purkinje dando lugar a alteraciones en la coordinación motora. Esto sugiere que posiblemente la retracción de los procesos de la glía de Bergmann afectó la función de los receptores AMPA, que son permeables al calcio lo que altera las sinapsis con las neuronas de Purkinje (Saab et al., 2012). De modo tal, que de haber realizado

un estudio con microscopía de dos fotones, debido a la resolución espacial que nos brinda, nos habría permitido detectar los aumentos locales rápidos de calcio mediados a través de los receptores AMPA permitiendo la caracterización de señales en los pequeños apéndices anteriormente descritos como microdominios (Grosche et al. 1999; Bierlein, 2013).

En pacientes con displasia cortical focal asociada a epilepsia intratable, los astrocitos muestran plasticidad funcional al aumentar la expresión de receptores purinérgicos (P2Y1, P2Y2, P2Y4), receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR1 y mGluR5) y canales de potasio (Kv4.2 y Kir4.1) (Sukigara et al., 2014). Los receptores P2Y1 también se expresan en la glía de Bergmann, donde son el principal blanco del ADP y ATP (Koizumi, 2010). Como tal, las respuestas al ATP son esenciales para la movilización del calcio intracelular de las reservas internas y se verían afectadas en nuestro modelo debido a los cambios morfológicos inducidos por la carmustina, siendo posible que exista una sobreexpresión de dichos receptores purinérgicos. Además, se ha reportado que la sobreexpresión de los receptores P2Y1 en astrocitos afecta la actividad de las ondas de calcio como en los casos de epilepsia y enfermedad de Alzheimer, lo que resalta la relevancia de la señalización purinérgica para preservar la función correcta de la transmisión sináptica (Delekate et al., 2014; Álvarez-Ferradas et al., 2015; Shigetomi et al, 2018; Kirischuk et al, 1995; Beirlein & Regehr, 2006; Rudolph et al., 2016; Andrews et al., 2020). En este estudio también evaluamos las respuestas de calcio de astrocitos *in vitro*. El uso de cultivos celulares brinda la oportunidad de estudiar nuevos aspectos de la biología de células de interés tanto durante el desarrollo como después de la maduración, siendo representativas del área de la que derivan, pudiéndose mantener durante períodos prolongados, en un tiempo más corto de estudio (Croft et al., 2019). Sin embargo, es cierto que las técnicas de cultivo celular muestran una reorganización anatómica y un perfil de expresión alterado de los canales iónicos y los receptores desarrollados con el tiempo, debido a la ausencia de su estructura anatómica celular conservado en conjunto (Eguchi et al., 2020).

Los astrocitos de ratones tratados con carmustina mostraron una mayor frecuencia de oscilaciones de calcio y un índice de sincronización global disminuido en DIV5. Un estudio anterior mostró que la ausencia de la proteína Ataxia Telangiectasia Mutada modifica la morfología de los astrocitos en cultivo, produciendo una reducción en la longitud y número de procesos, que a su vez regula negativamente la vía de la diana de la rapamicina (mTOR) (Kanner et al., 2018). Además, también se ha reportado que la manipulación de la señalización de mTOR interrumpe el andamio glial en cultivos primarios corticales y organoides (Andrews et al., 2020). Estos cambios estructurales están asociados con una maduración anormal del desarrollo que también altera la señalización del calcio y afecta las redes gliales y neuronales (Kanner et al., 2018; Pérez-Ortega et al., 2016; Patel et al., 2015). Estos hallazgos son consistentes con

informes previos que indican que en algunas enfermedades neurológicas los astrocitos presentan oscilaciones aberrantes de la señal de calcio debido a una homeostasis anormal de este ion (Patel et al., 2015).

Las redes de astrocitos muestran una actividad recurrente sincronizada, que es una característica importante de los sistemas dinámicos, ya que permite unir grupos de ensamblajes funcionales para comunicarse más fácilmente (Kanner et al., 2018; Patel et al., 2015). Aunque los astrocitos de ratones tratados con carmustina presentaron una mayor frecuencia de oscilaciones de calcio al DIV5, también presentaron una menor ocurrencia de sincronizaciones de red global. Esto puede deberse a la reducción de la longitud de los procesos celulares, que no permitirían la formación de conexiones funcionales óptimas con las células vecinas, interrumpiendo así la red funcional de los astrocitos.

Los astrocitos del grupo tratado con carmustina detuvieron su proliferación, permaneciendo en la confluencia celular del DIV5 y mostraron el mismo número de células con actividad basal a los días DIV6 y DIV7. Por el contrario, los astrocitos control en DIV6 y DIV7 mostraron un aumento en la frecuencia de actividad espontánea, seguido de una meseta de actividad coordinada y un mayor índice de sincronización global. Esta evolución en la actividad de la red es consistente con estudios previos que muestran que las células en cultivo experimentan un proceso de crecimiento y maduración morfológica y fisiológica (Patel et al., 2015). Esto sugiere que el tratamiento con carmustina afectó el desarrollo y maduración de los astrocitos, reduciendo su complejidad morfológica e impactando así la actividad del calcio y el nivel de sincronización global de las células. Sin embargo, estudios previos han informado que las oscilaciones de calcio astrocíticas están reguladas a través de mensajeros extracelulares derivados de otras células (Pasti et al., 1997; Morita et al., 2003). Por tanto, en nuestros cultivos, no está claro si los cambios inducidos en los astrocitos que muestran oscilaciones de calcio con un menor índice de sincronización, son causados por el recambio adaptativo de una reorganización celular debido a la carmustina o bien por la ausencia de células neuronales en términos de conectividad conjunta, ya que la información de una población celular completa, no altera el patrón de expresión de los canales iónicos y los receptores, siendo esencial para la comprensión precisa de la dinámica de activación de un circuito (Tanaka et al., 2007), tal como lo observamos en la rebanada, ya que la preparación de cortes vivos de cerebro al conservar la citoarquitectura y la dinámica celular, permite investigar las características estructurales y funcionales de la conectividad de los circuitos celulares (Eguchi et al., 2020).

Se requiere de más estudios o co-cultivos (astrocitos-neuronas) para lograr comprender si dichos hallazgos representan lo que sucede en una población celular completa, y determinar si los astrocitos juegan un papel esencial en la regulación de la actividad, afectando los circuitos

neuronales en niveles que van desde la expresión sináptica hasta la dinámica de sincronización global (Kanner et al.,2018).

8. Conclusión

En el presente estudio mostramos que la administración de carmustina a ratones gestantes induce displasia cortical en la descendencia, alterando la morfología y la señalización del calcio en astrocitos y glía de Bergmann, células que mostraron una reducida complejidad morfológica de los procesos y soma celular. Los cambios morfológicos fueron asociados a una mayor frecuencia de transitorios espontáneos de calcio. Además, encontramos una disfunción de la red funcional astrocítica *in vitro* que mostraba un índice bajo de sincronización celular global (Figura 14); esto puede estar asociado a una acumulación multiescala de defectos estructurales y funcionales en los circuitos cerebelosos. En los ratones tratados con carmustina, las alteraciones del comportamiento relacionadas con la función cerebelosa se vieron afectadas, incluida la coordinación motora y el aumento de la latencia de caída en la varilla giratoria. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar los componentes moleculares alterados en las células gliales que conducen a cambios en la función neuronal relacionados con los cambios de comportamiento.

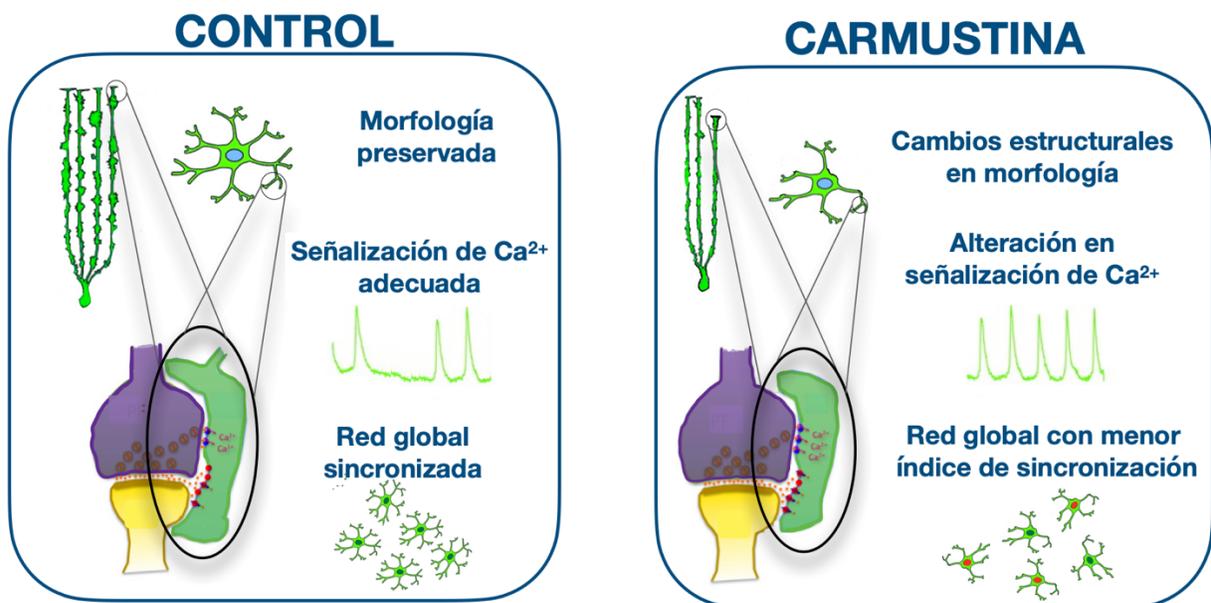


Figura 14. Representación gráfica de la conclusión. En el panel de la derecha se muestra la alteración de la morfología en astrocitos y glía de Bergmann debido al efecto de la carmustina mostrando una reducida complejidad morfológica en los procesos y soma celular, dichos cambios morfológicos fueron asociados a una mayor frecuencia de transitorios espontáneos de calcio, debidos a una posible sobreexpresión o delección de receptores permeables a calcio. Además, encontramos una disfunción de la red funcional astrocítica *in vitro* que mostraba un índice bajo de sincronización celular.

9. Material suplementario

1. Análisis de las displasias por tinción de Nissl

Para lograr comprender si dichos hallazgos representan lo que sucede en una población celular completa y determinar si las células gliales juegan un papel esencial en la regulación de la actividad, afectando los circuitos neuronales. Se evaluó la asociación y comportamiento de la displasia cortical cerebelosa en el componente neuronal. Se procesaron los cerebros de ratones transgénicos eGFAP-GFP machos de 5 días de edad con tinción de Nissl (N=4 control y N=4 carmustina).

El análisis de la tinción con Nissl mostró la presencia de displasia cortical en el cerebelo en asociación con malformaciones y alteraciones en las neuronas de Purkinje (Figura Suplementaria 1). Demostrando con ello que las displasias inducidas experimentalmente por el agente alquilante carmustina reproducen las características morfológicas de displasias corticales en especímenes patológicos humanos, incluyendo: 1) la interrupción de la laminación, 2) heterotopias y 3) neuronas citomegálicas. Por lo tanto, las alteraciones funcionales observadas en la glía pueden ser consecuencia de los cambios morfológicos en éstas, además de deberse a una comunicación anormal en conjunto con el componente neuronal, derivado a alteraciones en la organización espacial y muy probablemente en las propiedades de neuronas individuales, estando afectado todo como un conjunto.

De tal modo que como perspectiva, queda trabajo por delante para descubrir los mecanismos patogénicos que conlleva la displasia cortical cerebelar, incluyendo ahora al componente neuronal para ampliar el conocimiento sobre este tipo de malformaciones en la corteza.

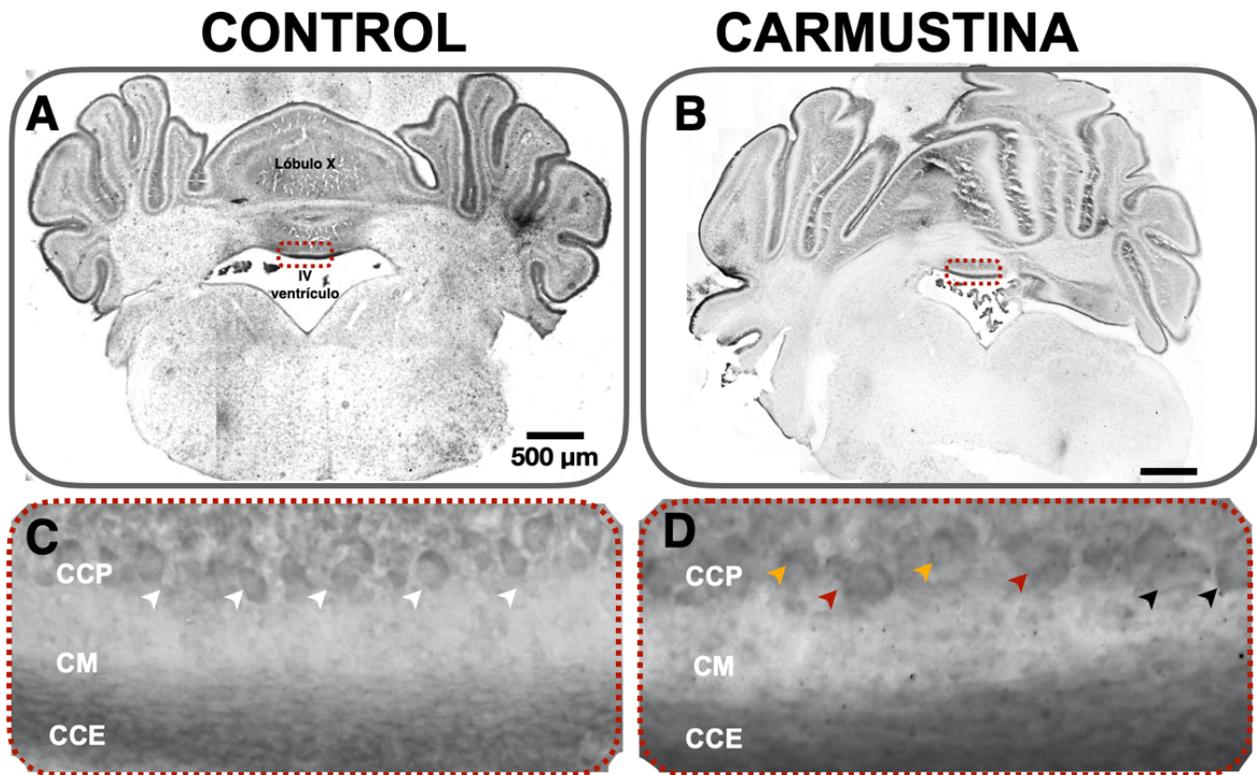


Figura Suplementaria 1. Alteración de la citoarquitectura del lóbulo X del cerebelo procesado mediante Tinción de Nissl. Cortes coronales de cerebelo de ratón transgénico GFAP-eGFP macho P5 control (A) y carmustina (B) procesados mediante tinción de Nissl. (B). Se muestra la presencia de una displasia en el techo del cuarto ventrículo (IV), modificando la estructura del lóbulo X del cerebelo. (C). Se muestra una ampliación del cuadro en (A) en donde se puede observar la estratificación de los somas de las neuronas de Purkinje (cabezas de flecha blanca). (D) Se muestra una ampliación del cuadro en (B) donde se observa el desplazamiento de algunas neuronas (cabeza de flecha amarilla) así como la presencia de heterotopias (cabezas de flecha roja) y somas de mayor tamaño (cabeza de flecha negra). CM: capa molecular, CCP: capa de células de Purkinje, CCE: capa de células endodiales.

2. Técnica de Nissl

Se utilizaron ratones transgénicos GFAP-eGFP machos de 5 días de edad (controles y tratados con carmustina). Se desarrolló la técnica de Nissl para describir la organización de los somas neuronales en el lóbulo X del cerebelo y observar los cambios en el modelo experimental de displasia cortical.

Los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (Cheminova) a una dosis de 30 mg/kg. Enseguida se perfundieron intracardiamente con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) (P5: 10 mL, P30: 20-30 mL), seguido de una solución de PFA al 4% hasta mostrar rigidez corporal (P5: 20 mL, P30: 30-50 mL). La solución de PFA fue preparada en solución amortiguadora de fosfatos PBS 1X (PBS 10X que contenía: [10mM] Na_2HPO_4 ; [2 mM] KH_2PO_4 [27 mM] KCl y [137mM] NaCl, pH 7.4) ajustada a pH 7.2. Una vez realizada la perfusión, el ratón fue decapitado y se extrajo cuidadosamente el encéfalo. El tejido se mantuvo en fijación dejando infundir la solución de paraformaldehído al 4 % pH 7.2 por 8 horas a 4° C. Una vez fijado el tejido, se mantuvo en soluciones crecientes de sacarosa (10%,20% y 30%) en PBS 1x a 4°C para su crioprotección. Posterior a la crioprotección los encéfalos fueron embebidos en medio Tissue Tek ® (Sakura) y se almacenaron a -80° C. El seccionamiento del tejido se llevó a cabo mediante el uso del criostato (Leica, CM3050S) a -25 °C obteniendo cortes coronales de 40 μm ; los cortes fueron recolectados en portaobjetos cargados manteniéndose a una temperatura de -80°C evitando su exposición a la luz hasta su procesamiento. Posteriormente los cortes fueron atemperados y se realizó un lavado con PBS 1X (2 minutos), seguido de un lavado con Agua milliQ (1 minuto), para después dejar secar (1 minuto); se tiñó con solución estable de violeta de cresilo 1% (1 minuto). La solución de violeta de cresilo estable se preparó al agregar 3 μL de ácido acético por cada 1 mL de solución violeta al 1%. En seguida se realizó un lavado con PBS 1X (2 minutos) y se deshidrató el tejido con concentraciones crecientes de etanol 70% (2 minutos), 96% (2 minutos, 1 minuto y 1 minuto) y xileno (1 minuto). Por último, se cubrió el tejido con cubreobjetos, empleando medio de montaje Entellan (Merck ®) dejándolo secar durante 1 día antes de ser observado al microscopio.

Se obtuvieron imágenes seriadas de diferentes profundidades focales mediante el uso del microscopio óptico (Olympus BX60). Las imágenes fueron procesadas con el programa Helicon Focus mediante un algoritmo de apilamiento de enfoque de acuerdo con la profundidad del campo empleado obteniendo la reconstrucción de la imagen. El análisis y procesamiento, se realizaron con el software ImageJ v.1.

10. Referencias

Algan, O. & Rakic, P. (1997). Radiation-induced, lamina-specific deletion of neurons in the primate visual cortex. *The Journal of comparative neurology*, 381, 335–352.

Álvarez-Ferradas, C., Morales, J.C., Wellmann, M., Nualart, F., Roncagliolo, M., Fuenzalida, M., Bonansco, C. (2015). Enhanced astroglial Ca²⁺ signaling increases excitatory synaptic strength in the epileptic brain. *Glia* 63, 1507–1521.

Andersson, G., Armstrong, D.M. (1987). Complex spikes in Purkinje cells in the lateral vermis (b zone) of the cat cerebellum during locomotion. *J. Physiol. (London)* 385, 107–134.

Andrews, M.G., Subramanian, L., Kriegstein, A.R. (2020). mTOR signaling regulates the morphology and migration of outer radial glia in developing human cortex. *eLife*, 9, e58737.

Araujo, A.P.B., Carpi-Santos, R., Gomes, F.C.A. (2019). The Role of Astrocytes in the Development of the Cerebellum. *Cerebellum* 18, 1017–1035.

Balestrini, S., Arzimanoglou, A., Blümcke, I., Scheffer, I. E., Wiebe, S., Zelano, J., & Walker, M. C. (2021). The aetiologies of epilepsy. *Epileptic disorders: international epilepsy journal with videotape*, 23, 1–16.

Barkovich, A.J., Kuzniecky, R.I. Jackson, G.D., Guerrini, R., Dobyns, W.B. (2005). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology*, 65, 1873–1887.

Barlow, J.S. (2002). *The Cerebellum and Adaptive Control*. Cambridge University Press, Cambridge.

Barmack, N. H., y Yakhnitsa, V. (2008) a. Functions of interneurons in mouse cerebellum. *Neuroscience*, 28, 1140–1152.

Barmack, N. H., y Yakhnitsa, V. (2008) b. Distribution of granule cells projecting to focal Purkinje cells in mouse uvula-nodulus. *Neuroscience*, 156, 216–221.

Becerra-González, M., Varman Durairaj, R., Ostos Valverde, A., Gualda, E. J., Loza-Alvarez, P., Portillo Martínez, W., Gómez-González, G. B., Buffo, A., y Martínez-Torres, A. (2020). Response to Hypoxic Preconditioning of Glial Cells from the Roof of the Fourth Ventricle. *Neuroscience*, 439, 211–229.

Beierlein, M., Regehr, W.G. (2006). Brief bursts of parallel fiber activity trigger calcium signals in bergmann glia. *J. Neurosci* 26, 6958–6967.

Beierlein, M. (2013). Imaging calcium waves in cerebellar Bergmann glia. *Cold Spring Harbor Protocols*.

Bellamy, T.C. (2006). Interactions between Purkinje neurons and Bergmann glia. *Cerebellum* 5, 116–126.

Benardete, E.A., Kriegstein, A.R. (2002). Increased excitability and decreased sensitivity to GABA in an animal model of dysplastic cortex. *Epilepsy* 43, 970–982.

Buffo, A., Rossi, F. (2013). Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Progress Neurobiol* 109, 42–63.

Calcagnotto, M.E., Baraban, S.C. (2005). Prolonged NMDA-mediated responses, altered ifenprodil sensitivity, and epileptiform-like events in the malformed hippocampus of methylazoxymethanol exposed rats. *J. Neurophysiol* 94, 153–162.

Cameron, M., Kékesi, O., Morley, J.W., Tapson, J., Breen, P.P., van Schaik, A., Buskila, Y. (2016). Calcium Imaging of AM Dyes Following Prolonged Incubation in Acute Neuronal Tissue. *PLoS ONE* 11, 1–13.

Carter, R.J., Morton, J., Dunnett, S.B. (2001). Motor coordination and balance in rodents. *Curr. Protoc. Neurosci.* 15, 8.12.1–8.12.14.

Crawley, J.N. (1999). Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: Experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res.* 835, 18–26.

Chung, W. S., Allen, N. J., y Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in biology*, 7.

Colacitti, C., Sancini, G., Franceschetti, S., Cattabeni, F., Avanzini, G., Spreafico, R., Di Luca, M., & Battaglia, G. (1998). Altered connections between neocortical and heterotopic areas in methylazoxymethanol-treated rat. *Epilepsy research*, 32(1-2), 49–62.

Colacitti, C., Sancini, G., DeBiasi, S., Franceschetti, S., Caputi, A., Frassoni, C., Cattabeni, F., Avanzini, G., Spreafico, R., Di Luca, M., & Battaglia, G. (1999). Prenatal methylazoxymethanol treatment in rats produces brain abnormalities with morphological similarities to human developmental brain dysgeneses. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 58(1), 92–106.

Croft, C. L., Futch, H. S., Moore, B. D., Golde, T. E. (2019). Organotypic brain slice cultures to model neurodegenerative proteinopathies. *Molecular neurodegeneration*, 14, 45.

Das, G., Reuhl, K., Zhou, R. (2013). The Golgi-Cox method. *Methods Mol. Biol.* 1018, 313–321.

De Zeeuw, C. I., & Hoogland, T. M. (2015). Reappraisal of Bergmann glial cells as modulators of cerebellar circuit function. *Frontiers on Cellular Neuroscience*, 9, 246.

Delekate, A., Füchtemeier, M., Schumacher, T., Ulbrich, C., Foddìs, M., Petzold, G.C. (2014). Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat. Comm*, 5, 5422.

Dong, Q., Liu, Q., Li, R., Wang, A., Bu, Q., Wang, K.H., Chang, Q. (2018). Mechanism and consequence of abnormal calcium homeostasis in Rett syndrome astrocytes. *eLife* 7, e33417.

Eguchi, K., Velicky, P., Hollergschwandtner, E., Itakura, M., Fukazawa, Y., Danzl, J. G., Shigemoto, R. (2020). Advantages of Acute Brain Slices Prepared at Physiological Temperature in the Characterization of Synaptic Functions. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 63.

Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 24, 312–325.

Frasconi, P., Silvestri, L., Soda, P., Cortini, R., Pavone, F. S., y Iannello, G. (2014). Large-scale automated identification of mouse brain cells in confocal light sheet microscopy images. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30, i587–i593

García-Cáceres, C., Balland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S. C., Koch, M., Horvath, T. L., Yi, C. X., Chowen, J. A., Verkhratsky, A., Araque, A., Bechmann, I., y Tschöp, M. H. (2019). Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nature Neuroscience*, 22, 7–14.

Germano, I. M., & Sperber, E. F. (1998). Transplacentally induced neuronal migration disorders: an animal model for the study of the epilepsies. *Journal of neuroscience research*, 51(4), 473–488.

Girkin, J.M. & Carvalho, M.T. (2018). The light-sheet microscopy revolution. *J. Opt.* 20.

González-González, M.A., Ostos-Valverde, A., Becerra-Hernández, A., Sánchez-Castillo, H., Martínez-Torres, A. (2015). The effect of carmustine on Bergmann cells of the cerebellum. *Neurosci. Lett.* 595, 18–24.

González-González, M.A., Gómez-González, G.B., Becerra-González, M., Martínez-Torres, A. (2017). Identification of novel cellular clusters define a specialized area in the cerebellar periventricular zone. *Sci. Rep.* 7, 40768.

Guerrini, R. (2005). Genetic malformations of the cerebral cortex and epilepsy. *Epilepsy*, 46, 1:32-7.

Guttenplan, K. A., Stafford, B. K., El-Danaf, R. N., Adler, D. I., Münch, A. E., Weigel, M. K., Huberman, A. D., & Liddelow, S. A. (2020). Neurotoxic Reactive Astrocytes Drive Neuronal Death after Retinal Injury. *Cell Reports*, 31, 107776.

Haldipur, P., Bharti, U., Alberti, C., Sarkar, C., Gulati, G., Iyengar, S., Gressens, P., Mani, S. (2011). Preterm delivery disrupts the developmental program of the cerebellum. *PLoS ONE*, 6, e23449.

He, L., Yu, K., Lu, F., Wang, J., Wu, L.N., Zhao, C., Li, Q., Zhou, X., Liu, H., Mu, D., et al. (2018). Transcriptional Regulator ZEB2 Is Essential for Bergmann Glia Development. *J. Neurosci*, 38, 1575–1587.

Hoogland, T. M., De Gruijl, J. R., Witter, L., Canto, C. B., y De Zeeuw, C. I. (2015). Role of Synchronous Activation of Cerebellar Purkinje Cell Ensembles in Multi-joint Movement Control. *Current biology: CB*, 25, 1157–1165.

Huisken, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J., Stelzer, E.H. (2004). Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 305, 1007–1009.

Iffland, P. H., 2nd, & Crino, P. B. (2017). Focal Cortical Dysplasia: Gene Mutations, Cell Signaling, and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology*, 12, 547–571.

Ihrig RA, Álvarez-Buylla A. (2008). Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res*;331:179-191.

Innocenti, G. M., & Berbel, P. (1991). Analysis of an experimental cortical network: I). Architectonics of visual areas 17 and 18 after neonatal injections of ibotenic acid; similarities with human microgyria. *Journal of neural transplantation & plasticity*, 2, 1–28.

Inouye, M., & Oda, S. I. (1980). Strain-specific variations in the folial pattern of the mouse cerebellum. *The Journal of comparative neurology*, 190(2), 357–362.

Inverardi, F., Chikhladze, M., Donzelli, A., Moroni, R.F., Regondi, M.C., Pennacchio, P., Zucca, I., Corradini, I., Braidà, D., Sala, M., et al. (2013). Cytoarchitectural, behavioural and neurophysiological dysfunctions in the BCNU-treated rat model of cortical dysplasia. *Eur. J. Neurosci* 37, 150–162.

Iskusnykh, I.Y., Buddington, R.K., Chizhikov, V.V. (2018). Preterm birth disrupts cerebellar development by affecting granule cell proliferation program and Bergmann glia. *Exp. Neurol* 306, 209–221.

Ito, M (2006). Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Progress in Neurobiol*, 78, 272–303.

Jacobs, K. M., Gutnick, M. J., y Prince, D. A. (1996). Hyperexcitability in a model of cortical maldevelopment. *Cerebral cortex*, 6(3), 514–523.

Jacobs, K. M., Hwang, B. J., & Prince, D. A. (1999). Focal epileptogenesis in a rat model of polymicrogyria. *Journal of neurophysiology*, 81, 159–173.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., y Jessell, T. M. (2000). Principles of Neural Science (4^a ed.). McGraw-Hill Companies.

Kanner, S., Goldin, M., Galron, R., Ben, J.E., Bonifazi, P., Barzilai, A. (2018). Astrocytes restore connectivity and synchronization in dysfunctional cerebellar networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 8025–8030.

Kalinichenko, S. G., & Pushchin, I. I. (2018). The modular architecture and neurochemical patterns in the cerebellar cortex. *Neuroanatomy*, 92, 16–24.

Kettenmann, H. & Ransom, B.R. (2005). Neuroglia. Oxford University Press, Oxford.

Kettenmann H, Verkhratsky A.(2008). Neuroglia: the 150 years after. Trends Neurosci 653-659.

Kirschuk, S., Möller, T., Voitenko, N., Kettenmann, H., Verkhratsky, A. (1995). ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells. *J. Neurosci* 15, 7861–7871.

Koizumi, S. (2010). Synchronization of Ca²⁺ oscillations: Involvement of ATP release in astrocytes. *FEBS J.*, 277, 286–292.

Komuro, H., & Rakic, P. (1998). Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations. *Journal of neurobiology*, 37, 110–130.

Komuro, H., & Rakic, P. (1998). Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *Neuroscience*, 18, 1478–1490.

Komuro, H., Yacubova, E., Yacubova, E., & Rakic, P. (2001). Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *Neuroscience*, 21, 527–540.

Lee, S., Yoon, B.-E., Berglund, K., Oh, S.-J., Park, H., Shin, H.-S., et al. (2010). Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science* 330, 790–796.

Leung, A. W., & Li, J. (2018). The Molecular Pathway Regulating Bergmann Glia and Folia Generation in the Cerebellum. *Cerebellum (London, England)*, 17, 42–48.

Licea-Rodriguez, J., Figueroa-Melendez, A., Falaggis, K., Plata-Sanchez, M., Riquelme, M., Rocha-Mendoza, I. (2019). Multicolor fluorescence microscopy using static light sheets and a single-channel detection. *J. Biomed. Opt* 24, 1–8.

Lippman, J., Lordkipanidze, T., Buell, M.E., Yoon, S.O., Dunaevsky, A. (2008). Morphogenesis and regulation of Bergmann glial processes during Purkinje cell dendritic spine ensheathment and synaptogenesis. *Glía* 56, 1463–77.

Lippman, J., Lordkipanidze, T., Cobb, N., Dunaevsky, A. (2010). Bergmann glial ensheathment of dendritic spines regulates synapse number without affecting spine motility. *Neuron Glia Biology* 6, 193–200.

Liu, T., Jin, X., Prasad, R. M., Sari, Y., y Nauli, S. M. (2014). Three types of ependymal cells with intracellular calcium oscillation are characterized by distinct cilia beating properties. *Journal of neuroscience research*, 92, 1199–1204.

Luhmann, H.J. (2016). Models of cortical-malformation-chemical and physical. *J. Neurosci. Methods* 260, 62–72.

MacLean, J. N., & Yuste, R. (2009). Imaging action potentials with calcium indicators. *Cold Spring Harbor protocols*, 11, 351-354.

Marcaggi, P., Billups, D., and Attwell, D. (2003). The role of glial glutamate transporters in maintaining the independent operation of juvenile mouse cerebellar parallel fibre synapses. *J. Physiol.* 552, 89–107.

Marín-Padilla, M., Tsai, R. J., King, M. A., & Roper, S. N. (2003). Altered corticogenesis and neuronal morphology in irradiation-induced cortical dysplasia: a Golgi-Cox study. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 62(11), 1129–1143.

Marret, S., Mukendi, R., Gadiouseux, J. F., Gressens, P., & Evrard, P. (1995). Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 54(3), 358–370.

Martinian, L., Boer, K., Middeldorp, J., Hol, E.M., Sisodiya, S.M., Squier, W., Aronica, E., Thom, M. (2009). Expression patterns of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta in epilepsy-associated lesional pathologies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol* 35, 394–405.

Martínez-Delgado, G., Reyes-Haro, D., Espino-Saldaña, A.E., Rosas-Arellano, A., Pétriz, A., Juárez-Mercado, P., Miledi, R., Martínez-Torres, A. (2011). Dynamics of GABA ρ 2 receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes. *Neuroreport* 22, 4–9.

Mathiesen, C., Brazhe, A., Thomsen, K., Lauritzen, M. (2013). Spontaneous calcium waves in Bergman glia increase with age and hypoxia and may reduce tissue oxygen. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 33, 161–169.

Metaa, M.R., Newman, E.A. (2006). Calcium signaling in specialized glial cells. *Glia*, 54, 650–655.

Morita, M., Higuchi, C., Moto, T., Kozuka, N., Susuki, J., Itofusa, R., Yamashita, J., Kudo, Y. (2003) Dual regulation of calcium oscillation in astrocytes by growth factors and pro-inflammatory cytokines via the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Neurosci* 23, 10944–10952.

Moroni, R.F., Inverardi, F., Regondi, M.C., Ferruccio, P., Spreafico, R., Frassoni, C. (2008). Altered spatial distribution of PV-cortical cells and dysmorphic neurons in the somatosensory cortex of BCNU-treated rat model of cortical dysplasia. *Epilepsy*, 49, 882–887.

Moroni, R.F., Cipelletti, B., Inverardi, F., Regondi, M.C., Spreafico, R., Frassoni, C. (2011). Development of cortical malformations in BCNU-treated rat, model of cortical dysplasia. *Neuroscience*, 175, 380–393.

Moroni, R. F., Inverardi, F., Regondi, M. C., Pennacchio, P., Spreafico, R., & Frassoni, C. (2013). Genesis of heterotopia in BCNU model of cortical dysplasia, detected by means of in utero electroporation. *Developmental neuroscience*, 35, 516–526.

Moroni, R. F., Inverardi, F., Regondi, M. C., Pennacchio, P., & Frassoni, C. (2015). Developmental expression of Kir4.1 in astrocytes and oligodendrocytes of rat somatosensory cortex and hippocampus. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 47, 198–205.

Moroni, R. F., Regondi, M. C., de Curtis, M., Frassoni, C., & Librizzi, L. (2020). Kir4.1 RNA Interference by In Utero Electroporation Fails to Affect Ictogenesis and Reveals a Possible role of Kir4.1 in Corticogenesis. *Neuroscience*, 441, 65–76.

Nimmerjahn, A., Mukamel, E.A., Schnitzer, M.J. (2009). Motor behavior activates Bergmann glial networks. *Neuron* 62, 400–412.

Noctor, S. C., Palmer, S. L., Hasling, T., & Juliano, S. L. (1999). Interference with the development of early generated neocortex results in disruption of radial glia and abnormal formation of neocortical layers. *Cerebral cortex*, 9, 121–136.

Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.K., Kirchhoff, F., Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33, 72–86.

Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 814, 23–45.

Ohtsuki, G., Kawaguchi, S. Y., Mishina, M., & Hirano, T. (2004). Enhanced inhibitory synaptic transmission in the cerebellar molecular layer of the GluRdelta2 knock-out mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(48), 10900–10907.

Olarte, O.E., Andilla, J., Gualda, E.J., Loza-Alvarez, P. (2018). Light-sheet microscopy: A tutorial. *Adv. Opt. Photonics*, 10, 111–179. Girkin, J.M., Carvalho, M.T. The light-sheet microscopy revolution. *J. Opt.* 2018, 20, 053002.

Optican, L.M., Robinson, D.A. (1980). Cerebellar-dependent adaptive control of primate saccadic system. *J. Neurophysiol.* 44, 1058–1076.

Palay, S. L., Chan-Palay V. (1974). *Cerebellar Cortex: Cytology and Organization*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., Carmignoto, G. (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17, 7817–7830

Patel, T.P., Man, K., Firestein, B.L., Meaney, D.F. (2015). Automated quantification of neuronal networks and single-cell calcium dynamics using calcium imaging. *J. Neurosci. Methods* 243, 26–38.

Paxinos, G.& Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6a edición. San Diego; Elsevier Academic Press, vol.2:11.

Pennacchio, P., Noé, F., Gnatkovsky, V., Moroni, R. F., Zucca, I., Regondi, M. C., Inverardi, F., de Curtis, M., & Frassoni, C. (2015). Increased pCREB expression and the spontaneous epileptiform activity in a BCNU-treated rat model of cortical dysplasia. *Epilepsia*, 56(9), 1343–1354.

Penschuck, S., Flagstad, P., Didriksen, M., Leist, M., & Michael-Titus, A. T. (2006). Decrease in parvalbumin-expressing neurons in the hippocampus and increased phencyclidine-induced locomotor activity in the rat methylazoxymethanol (MAM) model of schizophrenia. *The European journal of neuroscience*, 23, 279–284.

Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A., Bargas, J. (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiol. Dis.* 91, 347–361.

Pétriz, A., Reyes-Haro, D., González-González, M.A., Miledi, R., Martínez-Torres, A. (2014). GABA α subunits confer a bicuculline-insensitive component to GFAP+ cells of cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 17522–17527.

Piet, R., Jahr, C.E. (2007). Glutamatergic and purinergic receptor-mediated calcium transients in Bergmann glial cells. *J. Neurosci.*, 27, 4027–4035.

Prayson, R. A. (2014). Classification and pathological characteristics of the cortical dysplasias. *Child's nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 30(11), 1805–1812.

Preibisch, S., Saalfeld, S., Tomancak, P. (2009). Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* 25, 1463–1465.

Prinz, M. & Mildner, A. (2011) a. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia* 59, 177–187.

Prinz, M. & Priller, J. (2014) b. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 15, 300–312.

Rakic, P. (1971) a. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *The Journal of comparative neurology*, 141, 283–312.

Rakic, P. (1971) b. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain research*, 33, 471–476.

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *The Comparative Neurology*, 145(1), 61–83.

Rakic, P. (2003). Developmental and Evolutionary Adaptations of Cortical Radial Glia, *Cerebral Cortex*, 13, 541–549

Redecker, C., Hagemann, G., Witte, O. W., Marret, S., Evrard, P., & Gressens, P. (1998). Long-term evolution of excitotoxic cortical dysgenesis induced in the developing rat brain. *Brain research. Developmental brain research*, 109(1), 109–113.

Reeber, S.L., Otis, T.S., Sillitoe, R.V. (2013). New roles for the cerebellum in health and disease. *Front. Syst. Neurosci.* 7, 1–11.

Reyes-Haro, D., Miledi, R., García-Colunga, J. (2005). Potassium currents in primary cultured astrocytes from the rat corpus callosum. *J. Neurocytol.* 34, 411–420.

Ricci, P., Gavryusev, V., Müllenbroich, C., Turrini, L., de Vito, G., Silvestri, L., Sancataldo, G., y Pavone, F. S. (2021). Removing striping artifacts in light-sheet fluorescence microscopy: a review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, S0079-6107(21)00082-1.

Rickert C. H. (2006). Cortical dysplasia: neuropathological aspects. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 22(8), 821–826.

Rizza, M. F., Locatelli, F., Masoli, S., Sánchez-Ponce, D., Muñoz, A., Prestori, F., & D'Angelo, E. (2021). Stellate cell computational modeling predicts signal filtering in the molecular layer circuit of cerebellum. *Scientific Reports*, *11*, 3873.

Roper, S. N. (1998). In utero irradiation of rats as a model of human cerebrocortical dysgenesis: a review. *Epilepsy research*, *32*(1-2), 63–74.

Rosen, G. D., Press, D. M., Sherman, G. F., & Galaburda, A. M. (1992). The development of induced cerebrocortical microgyria in the rat. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, *51*(6), 601–611.

Rosen, G. D., Jacobs, K. M., & Prince, D. A. (1998). Effects of neonatal freeze lesions on expression of parvalbumin in rat neocortex. *Cerebral cortex*, *8*(8), 753–761.

Rudolph, R., Jahn, H.M., Courjaret, R., Messemer, N., Kirchhoff, F., Deitmer, J.W. (2016). The inhibitory input to mouse cerebellar Purkinje cells is reciprocally modulated by Bergmann glial P2Y1 and AMPA receptor signaling. *Glia* *64*, 1265–1280.

Saab, A. S., Neumeyer, A., Jahn, H. M., Cupido, A., Šimek, A. A., Boele, H. J., Scheller, A., Le Meur, K., Götz, M., Monyer, H., Sprengel, R., Rubio, M. E., Deitmer, J. W., De Zeeuw, C. I., & Kirchhoff, F. (2012). Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination. *Science (New York, N.Y.)*, *337*, 749–753.

Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J. A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N. S., Garcia-Verdugo, J. M., Marin, O., Rubenstein, J. L., Tessier-Lavigne, M., Okano, H., y Alvarez-Buylla, A. (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science (New York, N.Y.)*, *311*, 629–632.

Schmahmann J. D. (2019). The cerebellum and cognition. *Neurosci Letters*, *688*, 62–75.

Shidara, M., Kawano, K., Gomi, H., Kawato, M., (1993). Inverse-dynamics model eye movement control by Purkinje cells in the cerebellum. *Nature* *365*, 50–52.

Shigetomi, E., Hirayama, Y.J., Ikenaka, K., Tanaka, K., Koizumi, S. (2018). Role of Purinergic Receptor P2Y1 in Spatiotemporal Ca²⁺ Dynamics in Astrocytes. *J. Neurosci.* *38*, 1383–1395.

Shigetomi, E., Saito, K., Sano, F., y Koizumi, S. (2019). Aberrant Calcium Signals in Reactive Astrocytes: A Key Process in Neurological Disorders. *International Sciences*, *20*, 996.

Silvestri, L., Bria, A., Sacconi, L., Iannello, G., y Pavone, F. S. (2012). Confocal light sheet microscopy: micron-scale neuroanatomy of the entire mouse brain. *Optics express*, *20*, 20582–20598.

Sloan, S. A., & Barres, B. A. (2018). Assembling a Cellular User Manual for the Brain. *Neuroscience*, 38, 3149–3153.

Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7–35.

Sotelo C. (2015). Molecular layer interneurons of the cerebellum: developmental and morphological aspects. *Cerebellum (London, England)*, 14, 534–556.

Stoodley C. J. (2016). The Cerebellum and Neurodevelopmental Disorders. *Cerebellum (London, England)*, 15, 34–37.

Strata P. (2015). The emotional cerebellum. *Cerebellum (London, England)*, 14, 570–577.

Sudarov, A., Joyner, A.L. (2007). Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Development* 2:1-26.

Sukigara, S., Dai, H., Nabatame, S., Otsuki, T., Hanai, S., Honda, R., Saito, T., Nakagawa, E., Kaido, T., Sato, N., et al. (2014). Expression of astrocyte-related receptors in cortical dysplasia with intractable epilepsy. *J. Neuropathol. Exp. Neuro* 73, 798–806.

Takano, T., Sawai, C., & Takeuchi, Y. (2004). Radial and tangential neuronal migration disorder in ibotenate-induced cortical lesions in hamsters: immunohistochemical study of reelin, vimentin, and calretinin. *Journal of child neurology*, 19, 107–115.

Tanaka, M., Maronouchi, T. (2005). Abnormality in the cerebellar folial pattern of C57B/6J mice. *Neurosci. Lett.* 390:182-186.

Tanaka, M., Kawahara, K., Kosugi, T., Yamada, T., Mioka, T. (2007). Changes in the spontaneous calcium oscillations for the development of the preconditioning-induced ischemic tolerance in neuron/astrocyte co-culture. *Neurochemical research*, 32, 988–1001.

Thomas, D., Tovey, S.C., Collins, T.J., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Lipp, P.A. (2000). Comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* 28, 213–223.

Tigyi, G., Matute, C., y Miledi, R. (1990). Monoclonal antibodies to cerebellar pinneau terminals obtained after immunization with brain mRNA-injected *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(2), 528–532.

Verkhratsky, A. & Butt, A. (2007). *Glial neurobiology: a textbook*. John Wiley and Sons Ltd., West Sussex.

Verkhratsky, A. & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiol. Rev.* 98, 239–389.

Voogd, J., & Ruigrok, T. J. H. (2012). Cerebellum and Precerebellar Nuclei. Paxinos, G., Jürgen, K. (Eds.), *The Human Nervous System. Academic Press 15*, 471-545.

Wang, F., Xu, Q., Wang, W., Takano, T., and Nedergaard, M. (2012). Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via Ca²⁺-dependent K⁺ uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, 7911–7916.

Wang, V. Y., & Zoghbi, H. Y. (2001). Genetic regulation of cerebellar development. *Nature reviews. Neuroscience*, 2, 484–491.

Watase, K., Hashimoto, K., Kano, M., Yamada, K., Watanabe, M., Inoue, Y., Okuyama, S., Sakagawa, T., Ogawa, S., Kawashima, N., et al. (1998). Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 3, 976–988.

Watson, C., Paxinos, G., & Puelles, L. (2012) *The mouse nervous system*. 1a edición. Academic Press Elsevier, vol.2:345.

Yamada, K., Fukaya, M., Shibata, T., Kurihara, H., Tanaka, K., Inoue, Y., y Watanabe, M. (2000). Dynamic transformation of Bergmann glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth and synapse formation of cerebellar Purkinje cells. *Comparative Neurol*, 418, 106–120.

Yasin, S.A., Latak, K., Becherini, F., Ganapathi, A., Miller, K., Campos, O., Picker, S.R., Bier, N., Smith, M., Thom, M., et al. (2010). Balloon cells in human cortical dysplasia and tuberous sclerosis: Isolation of a pathological progenitor-like cell. *Acta Neuropathol* 120, 85–96.

Yue, Z. W., Wang, Y. L., Xiao, B., & Feng, L. (2018). Axon Initial Segment Structural Plasticity is Involved in Seizure Susceptibility in a Rat Model of Cortical Dysplasia. *Neurochemical research*, 43, 878–885.

Yuste, R., MacLean, J., Vogelstein, J., Paninski, L. (2011). Imaging action potentials with calcium indicators. *Cold Spring Harbor Protoc.* 985–989.

Zhou, B., Zuo, Y. X., & Jiang, R. T. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*, 25, 665–673.

Zhu, Y. B., Gao, W., Zhang, Y., Jia, F., Zhang, H. L., Liu, Y. Z., Sun, X. F., Yin, Y., & Yin, D. M. (2016). Astrocyte-derived phosphatidic acid promotes dendritic branching. *Scientific Reports*, 6, 21096.