



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ANÁLISIS LONGITUDINAL DE LA CORTEZA CEREBRAL MEDIANTE
IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA SENSIBLES A DIFUSIÓN EN UN
MODELO DE DISPLASIA CORTICAL.**

TESIS

**PARA OTORGAR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

PAULINA JAEI VILLASEÑOR DE LA BARRERA

TUTOR

DR. LUIS CONCHA LOYOLA, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR

**DR. ALONSO RAMÍREZ MANZANARES, CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
MATEMÁTICAS, CIMAT**

DR. VÍCTOR DE LAFUENTE FLORES, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

OCTUBRE DEL 2023, JURQUILLA, QUERÉTARO



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.

i.- Agradecimientos Académicos

Este proyecto fue realizado gracias a los apoyos de la UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN20044720, IA200621) y el Concejo nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) (CF-2023-I-218) (CVU 798166).

Al Laboratorio de Conectividad Cerebral (C-13) del Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva por recibirme como alumna. Así como al el Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM) por facilitar la tecnología para realizar este proyecto.

A Mirelta Regalado, Nydia Hernández Ríos y Erica de los Ríos, Leopoldo Gonzales Santos y Juan Ortiz Retana por su apoyo y asistencia técnica durante la realización de este proyecto.

Y a mi comité tutor Dr. Luis Concha Loyola, Dr. Alonso Ramírez Manzanares y Dr. Víctor de Lafuente por su supervisión, paciencia y aportaciones a este proyecto.

Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico especialmente a mis padres Claudia y Jorge que son la fuente de mi inspiración. Gracias por siempre estar incondicionalmente, sin su apoyo, amor y dedicación nada de esto sería posible.

A mis hermanos Juan Pablo y Joel por cuidarme, estar siempre al pendiente y hacerme reír cuando más lo necesito.

A mi intrépido Luca, espero algún día ser un ejemplo a seguir para ti.

A mi querido Anthony por tu amor y por estar a mi lado a lo largo de estos años siempre animándome en los momentos más difíciles.

A mi mentor el Dr. Luis Concha, a quien admiro mucho. Gracias por tu guía constante, paciencia y sobre todo por siempre tener fe en mí. Por enseñarme a pensar como científica, empujarme a confiar en mí y especialmente por animarme a nuevos retos por más aterradores que parezcan.

Al Dr. Alonso Ramírez por enseñarme que las matemáticas no dan tanto miedo cuando tienes al profesor adecuado. Tenerte en el laboratorio durante tu sabático y compartir el día a día fue muy divertido. Gracias por creer en mí y apoyarme siempre que lo necesite.

Al Dr. Hiram por enseñarme las bases de la epilepsia, las valiosas aportaciones en mis escritos, y por las buenas charlas en las eternas horas de escaneo en el resonador.

A Mire, que sin tu ayuda nunca hubiera podido realizar este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio por hacer del C13 un lugar al que siempre quiero regresar.

Con quienes compartí el día a día y se convirtieron en una segunda familia, Juli y Leyma. Gracias por las risas y por todo el apoyo.

ii.- RESUMEN

La displasia cortical focal (DCF) es una malformación del desarrollo cortical que conduce a la epilepsia farmacorresistente y se caracteriza por la alteración de las capas corticales y neuronas anormales, como células dismórficas y células en globo. En la mayoría de los casos, la resección quirúrgica es una opción viable cuando la lesión es identificada mediante resonancia magnética. Sin embargo, la evolución temporal de este tipo de malformación sigue siendo poco clara y a menudo pasa desapercibida en las imágenes convencionales debido a la heterogeneidad y la sutileza de las lesiones en la corteza. Se han propuesto varios métodos novedosos para analizar la resonancia magnética en pacientes con DCF con el objetivo principal de revelar lesiones corticales sutiles. Sin embargo, la mayoría de los métodos de análisis utilizan imágenes macroestructurales de resonancia magnética que no siempre corresponden a las anomalías microestructurales subyacentes en estas malformaciones. Los modelos avanzados de resonancia magnética sensible a difusión (IRMd) aparecen como una alternativa para evaluar las propiedades microestructurales del tejido complejo, como la sustancia gris. En este proyecto, nuestro objetivo es 1) detectar anomalías de difusión utilizando nuestro método novedoso llamado Multi-Resolution Discrete-Search (MRDS), y 2) caracterizar la magnitud y la temporalidad de los cambios en la cito- y mielo- arquitectura en la corteza en un modelo animal de displasia cortical. Para esto, inyectamos carmustina (BCNU = 20 mg/kg) y solución salina a ratas preñadas a E15. Las crías resultantes (BCNU = 16, Control = 16) fueron escaneadas a los 30, 60, 120 y 150 días posteriores al nacimiento. Creamos un sistema 2D de *grid-lines* como un descriptor anatómico común para muestrear nuestros mapas derivados del tensor de difusión y MRDS. Finalmente, validamos la cito- y mielo-arquitectura realizando evaluaciones histológicas utilizando MBP, NeuN y Foxp2. Nuestros hallazgos indican que durante las primeras etapas del desarrollo (30 días), las alteraciones macroestructurales en la DCF son extremadamente sutiles y llegan a ser indetectables a través de la imagen anatómica convencional. Sin embargo, nuestro uso de IRMd ha demostrado ser una herramienta valiosa para identificar anomalías microestructurales. Aunque el tensor de difusión no reveló cambios significativos en la difusividad, nuestro método MRDS identificó con éxito regiones corticales con microestructura anormal relacionada con el desorden de las fibras radiales-tangenciales de la mielina y la indefinida transición de las capas y columnas corticales como lo confirmó el análisis histológico. Estos hallazgos sugieren el potencial uso y aplicación de IRMd avanzada para la detección de DCF en humanos.

iii.- ABSTRACT

Focal cortical dysplasia (FCD) is a malformation of cortical development that led to drug-resistant epilepsy and are characterized by cortical layer disruption and abnormal neurons, such as dysmorphic and balloon cells. In most cases, surgical resection is a viable option when the lesion is targeted by magnetic resonance imaging. However, the temporal evolution of this type of malformation remains unclear and often goes under detection by conventional imaging due the heterogeneity and subtly lesions in the cortex. Several novel methods to analyze MRI in patients with FCD have been proposed with the main goal of unmask subtle cortical lesions in the cortex. Nevertheless, most image analysis methods use macrostructural MRI images which do not always correspond to the underlying microstructural abnormalities in these malformations. Advanced diffusion-weighted MRI (dMRI) models appears as an alternative to assess valuable microstructural tissue properties of complex tissue such as the gray matter. In this project we aim to 1) detect diffusion abnormalities using our novel multi-tensor Multi-Resolution Discrete-Search (MRDS) approach, and 2) characterize the magnitude and temporality of the cito- and myelo- architecture changes in the cortex in an animal model of cortical dysplasia. For this purpose, we injected carmustine (BCNU= 20 kg/mg) and saline solution to pregnant rats at the E15. The resulting pups (BCNU=16, Control =16) were scanned at 30,60,120 and 150 postnatal days. We create a 2D grid-lines system as a common anatomical descriptor to sample our dMRI derivatives maps from the DTI and MRDS. Finally, we validate the cyto- and myelo architecture by performing histological assessments using MBP, NeuN and Foxp2. Our findings indicate that during the early stages of development (30 days), macrostructural alterations in FCD are exceedingly subtle and remain undetectable through conventional anatomical imaging. However, our use of dMRI has proven to be valuable tool for identifying microstructural abnormalities. While DTI did not reveal significant changes in diffusivity, our MRDS approach successfully pinpointed cortical regions with abnormal microstructure related to disarrangement myelin radial-tangential fibers and blurring columnar-layer architecture, as confirmed by histological analysis. These findings put forward the potential use and application of advance dMRI for the detection of human FCD.

ÍNDICE

i.- Agradecimientos Académicos	2
Dedicatorias	3
ii.- RESUMEN	4
iii.- ABSTRACT	5
iv.- ÍNDICE DE FIGURAS	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 ORGANIZACIÓN DE LA CORTEZA CEREBRAL.....	9
1.1.1 Proliferación, migración y organización cortical.....	9
1.1.2 Cito-arquitectura y mielo-arquitectura.....	10
1.1.3 Comparación del desarrollo cortical en roedores y humanos.....	11
1.2 MALFORMACIONES DEL DESARROLLO CORTICAL (MCD)	13
1.2.1 Generalidades de las MDC.....	13
1.2.2 Displasia cortical.....	14
1.3 IMAGENOLOGÍA POR RESONANCIA MAGNÉTICA.	18
1.3.1 Introducción y conceptos básicos.....	18
1.3.2 Resonancia magnética sensible a difusión	20
1.3.3 Lo clásico: El tensor de difusión.....	22
1.3.4 Modelos avanzados: Deconvolución esférica, modelos biofísicos y multi- tensor.....	24
1.3.5 Multi-tensor: Multi-Resolution Discrete-Search (MRDS)	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	26
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVO GENERAL.....	27
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 MODELO ANIMAL DE DISPLASIA CORTICAL.....	28
5.1.2 Antecedentes del modelo animal.....	28
5.1.3 Inducción de la displasia cortical.....	28
5.2 RESONANCIA MAGNÉTICA SENSIBLE A DIFUSIÓN.....	30
5.2.1 Adquisición de imágenes.....	30
5.2.2 Análisis de imágenes sensibles a difusión.....	31

5.3 INMUNOFLUORESCENCIA DE LA CORTEZA CEREBRAL E HIPOCAMPO DORSAL.....	32
5.3.1 Procedimiento histológico.....	32
5.3.2 Adquisición de imágenes y procesamiento.....	33
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
6.1 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN.	34
7. RESULTADOS	34
7.1 IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA	34
7.1.2 Imágenes estructurales pesadas a T2.....	34
7.1.3 Imágenes pesadas a difusión.	36
7.2 HISTOLOGÍA POR INMUNOFLUORESCENCIA.	40
7.2.1 Inmunofluorescencia de la cito-arquitectura.	40
7.2.2 Inmunofluorescencia de la mielo-arquitectura y el tensor de estructura. ...	45
8. DISCUSIÓN.....	49
9. BIBLIOGRAFÍA.....	54

iv.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cito y mielo- arquitectura de la corteza.

Figura 2. Comparación entre el desarrollo cortical en roedores y humanos.

Figura 3. Anormalidades de la cito-arquitectura en sujetos con displasia cortical focal.

Figura 4. Diagrama de la secuencia de Stejskal y Tanner para el cálculo de la difusión.

Figura 5. Difusión isotrópica y anisotrópica.

Figura 6. Representación del tensor de difusión.

Figura 7. Metodología de proyecto.

Figura 8. Flujo del procesamiento de imágenes sensibles a difusión.

Figura 9. Imágenes anatómicas pesadas a T2.

Figura 10. Análisis del tensor de difusión.

Figura 11. Análisis de MRDS.

Figura 12. Histología de la corteza cerebral mediante NeuN.

Figura 13. Histología de la corteza somatosensorial mediante NeuN

Figura 14. Histología cortical con el anticuerpo primario selectivo a las neuronas de la capa VI (FoxP2).

Figura 15. Inmunofluorescencia de la mielo-arquitectura mediante el anticuerpo primario MBP.

Figura 16. Mapas de coherencia derivados del tensor de estructura.

1.INTRODUCCIÓN

1.1 ORGANIZACIÓN DE LA CORTEZA CEREBRAL.

1.1.1 Proliferación, migración y organización cortical.

El desarrollo de la corteza cerebral es un proceso dinámico que involucra un conjunto de eventos altamente complejos y organizados, los cuales comienzan entre la séptima y octava semana de gestación (Marín-Padilla, 2001). Dichos eventos se dividen en tres etapas principalmente: 1) Proliferación y diferenciación, 2) migración neuronal, y 3) conectividad neuronal y sinaptogénesis, como a continuación se detalla.

Durante el desarrollo de la corteza, esta es poblada por dos tipos principales de células: neuronas y glía, las cuales siguen diferentes patrones de desarrollo y migración. Estas dos poblaciones se generan principalmente en las zonas proliferativas ventriculares y subventriculares adyacentes a los ventrículos laterales del cerebro (Buchsbaum & Cappello, 2019). Dichas células, a las cuales llamaremos precursoras, entran en un proceso masivo de proliferación celular que inicia alrededor de la quinta y sexta semana de gestación, decreciendo a partir de la semana dieciséis y finalizando entre la semana veintidós y veinticinco de gestación (Pang et al., 2008). Debido a que el proceso de proliferación es de alta demanda, las células precursoras entran en dos patrones de división celular simultáneo: simétrico y asimétrico. La división simétrica, da lugar a dos células idénticas que se continúan dividiendo de manera homogénea sin migrar de la zona ventricular. Mientras que la división asimétrica da lugar a dos células precursoras. Una de estas seguirá entrando nuevamente al ciclo de división, mientras que las otras darán lugar a neuronas inmaduras (neuroblastos). Estos neuroblastos no volverán a dividirse y migrarán desde la zona intermedia ventricular hasta su lugar final de diferenciación en la corteza cerebral (Brown et al., 2001; Noctor et al., 2004). Esta última diferenciación, depende de un proceso interno de expresión génica (activación y/o represión de ciertos genes), que determinará si dicha célula se convertirá en neurona o glía (Bianchi, 2018).

El proceso de migración puede ser clasificado en dos tipos. 1) La migración radial que abarca del 80-90% de las neuronas corticales, en su mayoría piramidales, que van desde la zona de proliferación hacia la superficie pial. Esta migración radial es a su vez es liderada por los procesos de las células gliales que abarcan todo el espesor cortical (Ayala et al., 2007). 2) La migración tangencial, donde las neuronas, en su mayoría interneuronas GABAérgicas, se desplazan de manera ortogonal al grosor cortical. Sin embargo, se ha visto que hay cierta heterogeneidad en los patrones de

migración tanto para neuronas piramidales como interneuronas y que distintos tipos de células específicas pueden tomar uno o ambos patrones de migración (Kriegstein & Noctor, 2004).

Una vez terminada la proliferación y migración neuronal, se da la formación de conexiones neuronales fundamental para el desarrollo normal del cerebro. Este proceso, junto con la sinaptogénesis, es dinámico y ocurre a lo largo de la segunda mitad de la gestación en adelante. En la corteza, la formación de conexiones sigue el mismo patrón que sigue la migración radial (de adentro hacia afuera), empezando por las ramificaciones de la capa seis hasta la formación de conexiones tangenciales cortas entre áreas corticales y subcorticales al final de la gestación (Budday et al., 2015). No obstante, otros componentes de la corteza como la glía y los capilares juegan un papel fundamental para la formación correcta de la conectividad neuronal (Barres, 2008).

1.1.2 Cito-arquitectura y mielo-arquitectura.

El espesor de la neocorteza está determinado por sus seis capas corticales. Sin embargo, el espesor de cada una de las capas en las diferentes áreas corticales no es homogénea. Esto debido a que el grosor de cada capa cortical estará determinado por la especificidad funcional de las diferentes neuronas que habitan en la corteza. Por ejemplo, en la corteza somatosensorial, encontramos que la capa IV granular es particularmente más gruesa ya que es la encargada de recibir una gran cantidad de proyecciones de entrada provenientes del tálamo. Siguiendo la misma premisa, en las áreas motoras, la capa cortical V de tipo agranular, donde habitan las neuronas gigantes de Betz, superan el espesor comparado con las áreas no-motoras granulares (Grow, 2018). Las características cito-arquitectónicas de cada capa cortical de la corteza motora se pueden visualizar en la Figura 1.

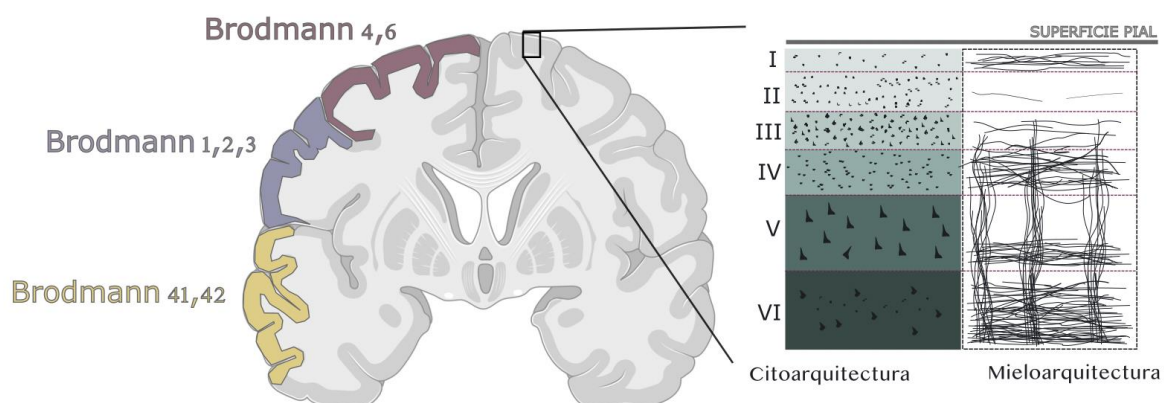


Figura 1. Cito- y mielo-arquitectura de la corteza estereotípica. De lado izquierdo la corteza en corte coronal con la representación de tres áreas primarias y secundarias de Brodmann. Del lado contrario un esquema del arreglo cito- y mielo- arquitectónico en las seis capas corticales de la corteza motora.

Los trabajos de Brodmann (Brodmann, 1909) facilitaron el estudio de la cito-arquitectura cortical al identificar y describir 52 áreas basándose en las diferencias arquitectónicas observadas en los distintos tipos de corteza. Por ejemplo, la corteza motora primaria es conocida como el área de Brodmann 4, o la corteza somatosensorial primaria sería el área de Brodmann 2, y así sucesivamente cubriendo toda la superficie cortical (Figura 1)

Sin embargo, el patrón de las capas corticales no está solamente dado por el arreglo cito-arquitectónico. En 1840 fue Baillarger (Baillarger, 1840) el primero en observar que la corteza tiene diferentes patrones de mielinización a lo largo del manto cortical. Más adelante, con los avances en las técnicas de tinción, fueron los trabajos de Vogt y Vogt (Vogt & Vogt, 1919) al describir que efectivamente las seis capas corticales están microscópicamente definidas por el patrón de fibras mielinizadas, y le darían vida a lo que llamamos actualmente mielo-arquitectura.

Debido a que la mielo-arquitectura es capaz de revelar este patrón de laminación cortical, resulta de gran utilidad al tratar de identificar un gran número de áreas corticales que posiblemente coincidan con el atlas cito-arquitectónico. Vemos que en las capas IV y V las bandas de Baillarger están claramente delimitadas de fibras mielinizadas compactas, mientras que en la capa II son prácticamente inexistentes (Figura 1) (Jones & Peters, 2012).

1.1.3 Comparación del desarrollo cortical en roedores y humanos.

El desarrollo cortical en roedores sigue un proceso similar al de los humanos. Tanto humanos como roedores comparten que la fase de proliferación neuronal está dada por la división asimétrica y simétrica desde la zona ventricular. Sin embargo, la ventana de tiempo en la neurogénesis varía entre especies. En roedores, las neuronas son generadas entre los días embrionarios 11 y 17, mientras que en humanos esta producción comienza a partir de la semana de gestación nueve (Cadwell et al., 2019).

Ambos muestran patrones de laminación cortical de adentro hacia afuera y liderados por la migración tangencial y radial, sin embargo, la proporción difiere entre especies.

En humanos, la gran mayoría de la glía radial que entra en contacto con la superficie pial son originadas a partir de las células que habitan en la zona ventricular externa (OSVZ), la cual es mucho más extensa y dinámica en comparación a la del roedor (Figura 2-A). Los roedores en este caso no experimentan una transición de desarrollo tan dinámica, ya que esta actividad se da de manera continua entre las superficies ventriculares y piales, incluso hasta el final de la neurogénesis (Molnár & Clowry, 2012). En la figura 2-B podemos observar los tiempos en el que cada capa cortical se va desarrollando de acuerdo a la especie. Por ejemplo, las capas más superficiales VI y V tienen su pico de desarrollo entre E11 y E13 en roedores, mientras que en humanos se da entre E48 y E66.

Si bien a pesar de que los roedores son valiosos para investigar y entender procesos neurobiológicos, en muchas ocasiones carecen de especificidad en ciertos aspectos que son propios, en este caso, del desarrollo humano.

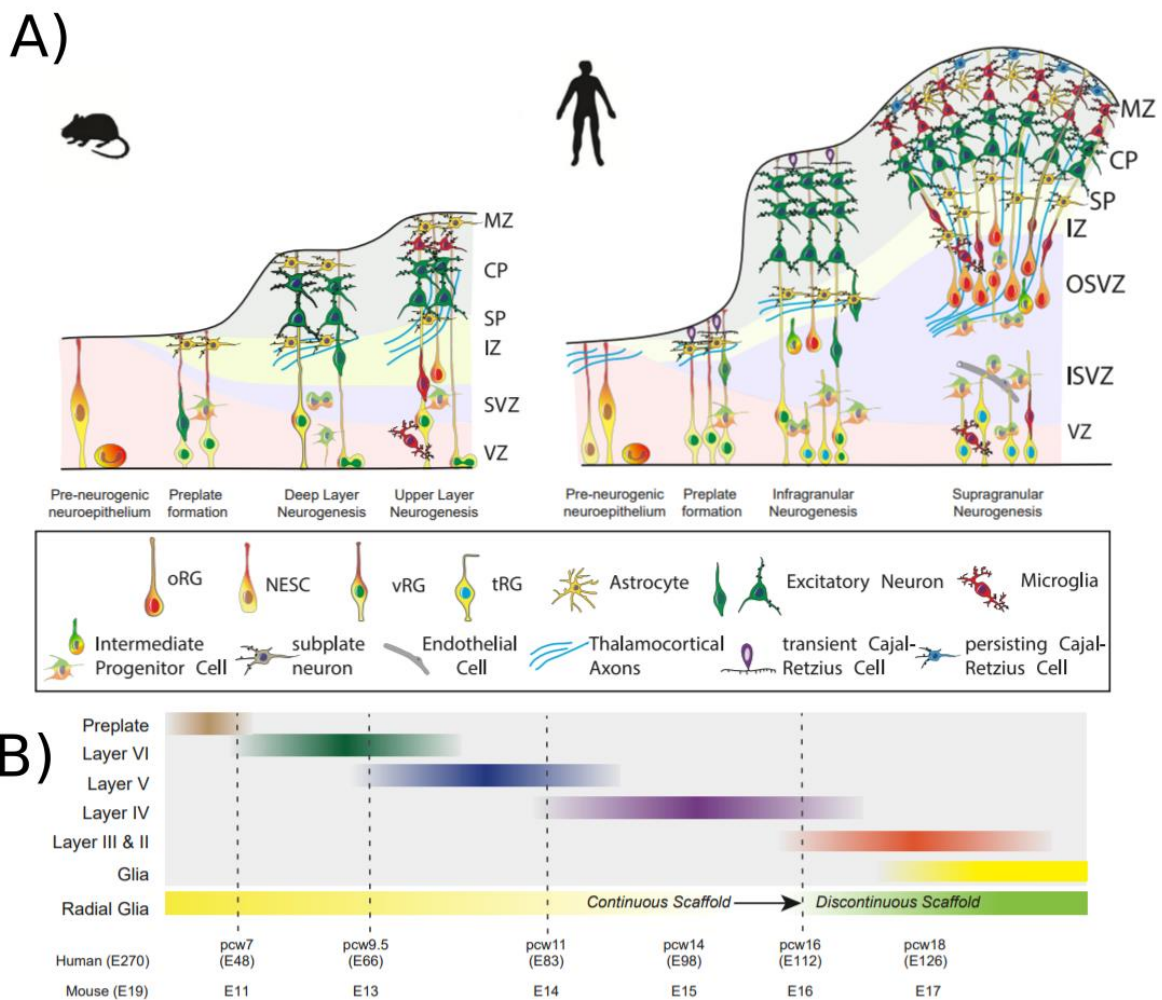


Figura 2. Comparación entre el desarrollo cortical en roedores y humanos. A)

Esquema de las diferencias en la proliferación y expansión en la formación de la corteza cerebral. B) Periodos clave en la neurogénesis y formación de las capas corticales. Las líneas punteadas señalan los días embrionarios aproximados por especie (Imagen tomada de Cadwell et al., 2019).

1.2 MALFORMACIONES DEL DESARROLLO CORTICAL (MCD)

1.2.1 Generalidades de las MDC

El desarrollo de la corteza cerebral en los humanos es un proceso altamente complejo y bien organizado. Y cualquier disrupción en algunos de estos procesos puede contribuir en la aparición de un gran rango de desórdenes en el desarrollo llamados malformaciones del desarrollo cortical (MDC). Las MDC comprenden un grupo complejo e importante de alteraciones. Por lo general, están caracterizados por un desarrollo cortical anormal, con etiología genética variada, anomalías anatómicas importantes (ej. tamaño anormal del cerebro, irregularidad en la estructura cortical y sustancia gris heterotópica) y por consiguiente, diversas manifestaciones clínicas (Pang et al., 2008; Severino et al., 2020)

Dicho esto, las MDC se clasifican dependiendo de la etapa en la que hubo una disrupción en el desarrollo del cerebro. La primera clasificación fue introducida por Barkovich et al. en 1996, que gracias a los avances en la imagenología y de aplicaciones genéticas, esta clasificación ha sido modificada a lo largo del tiempo. La modificación más reciente (Barkovich et al., 2012) sostiene que las MDC se dividen en tres grandes grupos: 1) proliferación y apoptosis celular, 2) migración celular y 3) desarrollo post-migración. En casos en donde existe una reducción de la proliferación o incremento de la apoptosis probablemente dará como resultado en una microcefalia, mientras que un aumento de la proliferación y reducción de la actividad de apoptosis puede causar una megalencefalia. Por otro lado, una proliferación anormal, también llamada disgenesia, puede resultar en una displasia cortical focal y/o megalencefalia acompañada de malformaciones corticales. Las anomalías de la migración neuronal ocasionadas por una interrupción, ya sea que el proceso termine en una etapa muy temprana o muy tardía, puede traer consigo malformaciones como la lisencefalia (Di Donato et al., 2017), microcefalia, y disgiria (Desikan & Barkovich, 2016). A pesar de que el proceso post-migracional se extiende desde el periodo intrauterino hasta la vida extrauterina, la disrupción de la maduración neuronal y axogénesis puede traer consigo malformaciones como microcefalia secundaria y polimicrogiria (Barkovich et al., 2012; Budday et al., 2015)

Las MDC son responsables de aproximadamente el 40% de los casos de epilepsia farmacorresistente (inefectividad del medicamento para curar, en este caso, las crisis epilépticas) en la población infantil. Una característica destacada de las MDC son sus asociaciones con un rango amplio de déficits cognitivos incluyendo la discapacidad intelectual de moderada a severa y el autismo (Pasquier et al., 2002). Afortunadamente, gran parte de las MDC pueden ser identificadas hoy en día mediante estudios de resonancia magnética, en la cual se puede determinar la severidad de la malformación a través de las irregularidades en la superficie cortical, la limitación entre la sustancia blanca y la sustancia gris, el grosor cortical, entre otras anomalías corticales asociadas (Guerrini & Dobyns, 2014)

1.2.2 Displasia cortical.

La displasia cortical focal (DCF), como se mencionó anteriormente, es una MDC que surge como consecuencia de una proliferación o diferenciación anormal tanto de las neuronas como de la glía (Crino, 2015; Severino et al., 2020). La DCF fue descrita por Taylor y colaboradores en 1971, reportando una desorganización cortical con presencia abundante y anormal de células en forma de globo. Actualmente, la DCF se define como un conjunto de rupturas anatómicas caracterizadas por la pérdida de laminación normal de la corteza cerebral. Es importante resaltar que la severidad de esta lesión puede variar, manifestándose como una ligera deslaminación con apariencia normal de las neuronas hasta una pérdida completa de la organización laminar con células dismórficas, neuronas desorientadas entre láminas, neuronas gigantes y células en globo (Figura 3) (Blümcke et al., 2010; Guerrini et al., 2015; Palmieri et al., 2004). La localización anatomopatológica y el cómo se presentan estas células anormales tiene una elevada variabilidad, afectando tanto la arquitectura cortical como la unión entre la sustancia gris y la región subcortical de sustancia blanca (Guerrini et al., 2015).

Existen varias clasificaciones para describir a la displasia cortical, siendo la propuesta por la Liga Internacional en Contra la Epilepsia (ILAE por sus siglas en inglés) (Blümcke et al., 2010; Najm et al., 2022) es la más aceptada para entender las características histológicas que presenta cada tipo de DCF (Tabla 1).

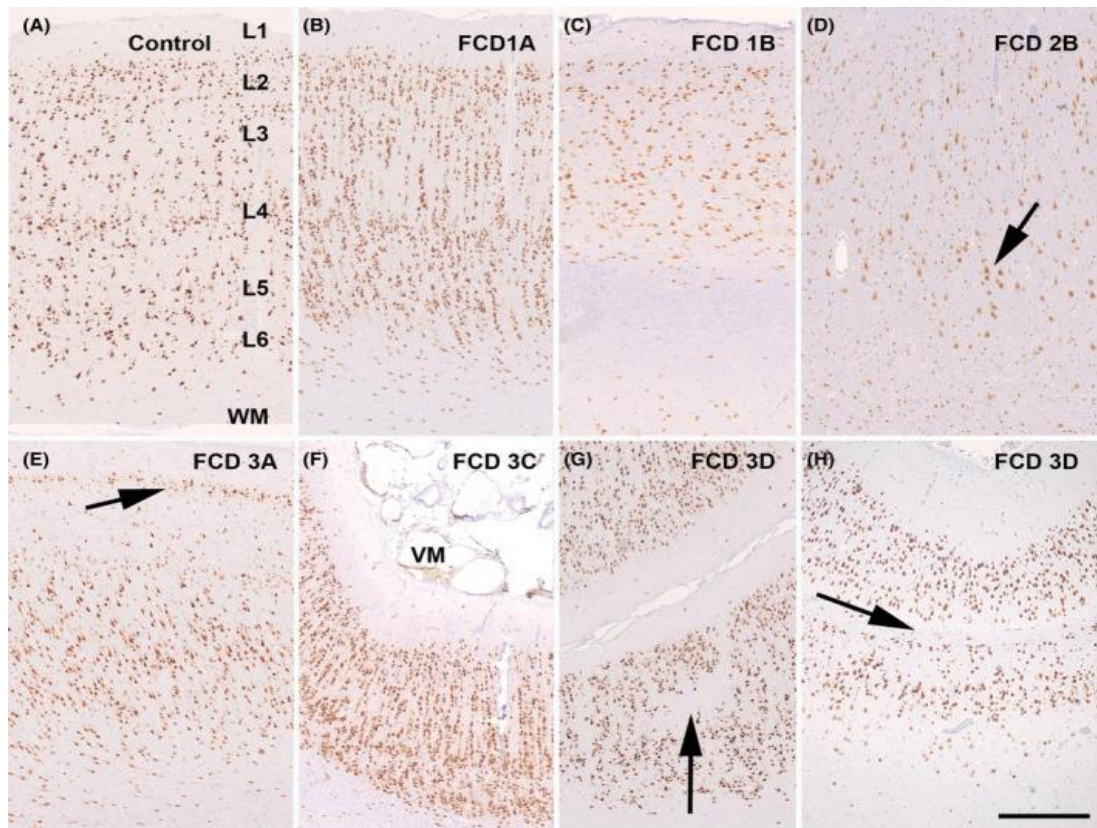


Figura 3. Anormalidades de la cito-arquitectura en sujetos con displasia cortical focal mediante inmunohistoquímica (NeuN). A) Corteza normal con capas corticales bien definidas. B) DCF tipo 1A definida por micro-columnas verticales. C) DCF tipo 1B está caracterizada por una pérdida de la laminación cortical y con un grosor cortical disminuido. D) DCF tipo 2b muestra una perdida completa de la organización cortical acompañado de neuronas dismórficas. E, F, G, H) DCF asociadas a una enfermedad subyacente.

DCF I	DCF Ia Microcolumnas abundantes	DCF Ib Laminación anormal	DCF Ic Anormalidades verticales y horizontales
DCF II	DCF IIa Neuronas dismórficas		DCF IIb Neuronas dismórficas y células en globo
DCF III	DCF IIIa Deslaminación cortical asociada a esclerosis hipocámpal	DCF IIIb Deslaminación cortical adyacente a tumores gliales o glioneuronales	DCF IIIc Deslaminación cortical adyacente a malformaciones vasculares
			DCF IIId Deslaminación cortical adyacente a una lesión adquirida a lo largo de la vida (ej. ECV)
Sustancia Blanca	MCDm con un exceso de neuronas heterotópicas		MCDm con hiperplasia oligodendroglial en epilepsia (MOGHE)
DCF indefinida en histopatología	Anormalidades en la organización cortical que se mantiene ambigua con hallazgos histopatológicos no compatibles con DCF I, II o III.		

Tabla 1. *Clasificación internacional de la displasia cortical focal (DCF) propuesta por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) (Blümcke et al., 2010; Najm et al., 2022)*

Actualmente, las displasias corticales son consideradas como una de las principales causas de epilepsia refractaria a fármacos en la población infantil (Garner et al., 2022; Kabat & Król, 2012). Aunque suelen aparecer como lesiones sumamente sutiles, pueden llegar a ser altamente epileptogénicas y de difícil diagnóstico. Hoy en día se estima que el 76% de los pacientes con displasia cortical van a presentar epilepsia refractaria en algún punto de su vida (Gálvez et al., 2009).

Actualmente las DCF representan una serie de retos al momento de estudiarlas ya que el problema no solamente radica en su fármaco-resistencia, sino también en su gran heterogeneidad y desconocido mecanismo fisiopatológico. En las últimas décadas se ha recopilado fuerte evidencia hacia el papel de la vía mTOR (Mammalian Target of Rapamycin, por sus siglas en inglés) como una causante de la DCF. Esta vía de señalización está involucrada naturalmente en una gran variedad de procesos y funciones celulares, tales como la proliferación y crecimiento celular, metabolismo y autofagia durante el desarrollo neurológico (Lee et al., 2022). Estudios recientes han reportado una hiperactivación en la señalización de la quinasa PI3K de la vía mTOR (Ljungberg et al., 2009) que se encarga de controlar el tamaño celular, el desarrollo y migración neuronal, y que podría estar contribuyendo a la patogénesis de la DCF (Schick et al., 2007).

Junto con los desafíos inherentes a los mecanismos subyacentes de su epileptogenicidad, las DCF a menudo presentan dificultades considerables en su diagnóstico. Estas lesiones corticales tienden a manifestarse de manera sutil en muchos casos, complicando su detección mediante estudios convencionales de imagenología clínica. Lo que resulta en diagnósticos insuficientes y con improbabilidad de acceder a la resección quirúrgica, lo cual tiene un impacto negativo directo en la calidad de vida de los pacientes.

1.3 IMAGENOLOGÍA POR RESONANCIA MAGNÉTICA.

1.3.1 Introducción y conceptos básicos.

La Imagenología por Resonancia Magnética (IRM) es en la actualidad una de las técnicas no invasivas más utilizadas para estudiar un tejido con gran resolución espacial, incluyendo el cerebro. La IRM nos permite crear una gran variedad de imágenes anatómicas utilizando campos magnéticos y señales de radiofrecuencia al resaltar diferentes contrastes a partir de la densidad de protones adyacente a cada tejido (van Geuns et al., 1999)

En la clínica, la IRM es la técnica más utilizada para identificar a los pacientes que sufren de epilepsia fármaco-resistente como consecuencia de la DCF. Esta técnica nos permite monitorear los cambios estructurales a nivel cerebral de manera longitudinal y seleccionar a aquellos pacientes que podrían ser candidatos al tratamiento quirúrgico. Este último punto es fundamental ya que la probabilidad de control de las crisis es muy alta tras la resección quirúrgica del foco epileptógeno. Algunos de los hallazgos comúnmente encontrados muestran un borramiento en el borde de la sustancia gris y la sustancia blanca, signo trans-manto, adelgazamiento de la corteza e hiperintensidades en imágenes pesadas a T2 y FLAIR (Figura 3) (Barkovich et al., 2001; Palmieri et al., 2004; Urbach et al., 2022). También se ha observado una asimetría en el patrón de los surcos en comparación con la región contralateral (Gentile et al., 2016).

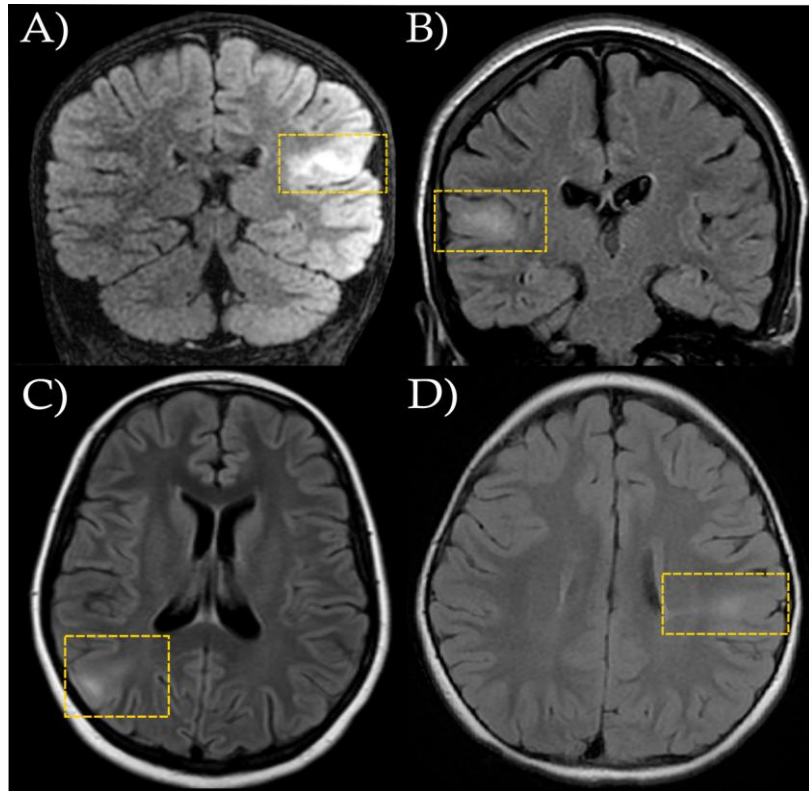


Figura 4. *Imágenes pesadas a T2-FLAIR con hallazgos comúnmente encontrados en DCF. Los cuadros amarillos resaltan: A) Hiperintensidad en las áreas subcorticales de la corteza parietal izquierda, B) Lesión focal en el giro temporal superior con un borramiento entre la sustancia gris y blanca. C) Hallazgo en la corteza parietal derecha muestra una disminución en el grosor cortical acompañado de un borramiento en el borde de la sustancia blanca y gris. D) Hiperintensidad en la sustancia blanca subcortical parietal izquierda con signo trans-manto (Imagen tomada de Gaillard, F., 2023).*

El problema de las DCF radica en que alrededor del 40% de las lesiones causadas son tan sutiles que ni las imágenes obtenidas por resonancia magnética convencional son capaces de evidenciarlas, imposibilitando su resección quirúrgica (Spitzer et al., 2022).

En las últimas décadas se han desarrollado nuevos métodos para procesar las imágenes de resonancia magnética con el objetivo de intensificar los contrastes utilizando mapas cuantitativos (Bernasconi et al., 2001; Bonilha et al., 2006), o incluso el uso de inteligencia artificial (Bastiani et al., 2016; Gill et al., 2021; Spitzer et al., 2022). Sin embargo, estos avances tienen como objetivo la adquisición de imágenes anatómicas que reflejan la macroestructura cortical. A pesar de dichos esfuerzos, la detección de las DCF sutiles sigue siendo un reto para la clínica e investigación. En este sentido, resulta atractivo el uso de la resonancia magnética sensible a difusión, pues permite evaluar la microestructura de la corteza cerebral de manera no invasiva

utilizando el fenómeno de la difusión del agua. Dicha herramienta podría informar sobre la mielo-arquitectura cortical y ser de gran utilidad para diagnosticar y estudiar las DCF sutiles.

1.3.2 Resonancia magnética sensible a difusión

Las imágenes por resonancia magnética sensibles a la difusión del agua (IRMd) proveen una manera no invasiva de identificar las propiedades o características microestructurales de los tejidos. El fenómeno de difusión está basado en el movimiento aleatorio de las moléculas de agua dentro de un voxel, también llamado movimiento Browniano (Einstein, 1905). Einstein explicó que la relación que hay entre la distancia promedio y el intervalo de tiempo en el desplazamiento de las moléculas está dada por la viscosidad del medio y sobre todo por la temperatura (Chenevert, 2010). El fenómeno está representado en la siguiente fórmula: $\langle x^2 \rangle = 2 D \Delta$, donde $\langle x^2 \rangle$ representa el desplazamiento cuadrático medio de las partículas durante un intervalo de tiempo Δ y $2D$ siendo la dimensionalidad del coeficiente de difusión.

Debido a que la difusión de las moléculas provee información acerca de la interacción que existe entre el desplazamiento del agua y el espacio extra- e intracelular del tejido nervioso, la IRMd se convierte en una herramienta altamente sensible a estas propiedades. Gracias a los aportes de Hahn en la creación del eco de spín (Hahn, 1950) y más adelante Stejskal y Tanner, se facilitó la manera de cuantificar los coeficientes de difusión con el uso de la secuencia de pulsos de gradiente con eco spin (PGSE). Estos autores, introdujeron la idea de medir los coeficientes de difusión usando pulsos de gradientes antes y después de la aplicación del pulso de 180° de la secuencia tradicional de eco de spín. Esta secuencia consiste en que el primer pulso de gradiente causa un desfase rápido y controlado de los spines, así que una vez aplicado el pulso de 180° , el cual provoca el refase de los spines, se aplica nuevamente el mismo pulso de gradiente para compensar el desfase que fue ocasionado por el primer pulso de gradiente y con esto medir cuál fue el desplazamiento de las moléculas (Stejskal & Tanner, 1965).

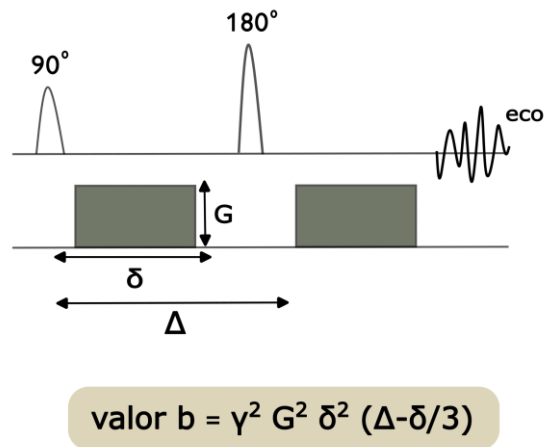


Figura 4. Diagrama de la secuencia de Stejskal y Tanner para el cálculo de la difusión. La sensibilidad de difusión (valor de b) está dado por la duración (δ), la fuerza (G) del pulso de gradiente y el intervalo entre dos pulsos (Δ), y donde γ es la constante geomagnética.

Debido a que el valor de b es proporcional a la magnitud de los gradientes de difusión, el desfase que es provocado es proporcional a medida que se incrementa este valor. La señal de difusión dada por estos pulsos de gradientes está expresada en la siguiente ecuación: $S = S^0 e^{-b \cdot D}$, suponiendo que existe un movimiento browniano donde se obtiene una disminución exponencial de la señal. Aquí, S^0 es la amplitud de la señal en caso de no aplicar gradientes de difusión, es decir una imagen pesada a T2, b es el parámetro que define la energía del gradiente de difusión y D el coeficiente de difusión promedio de las moléculas de agua dentro de un voxel (Le Bihan et al., 2001).

Sin embargo, la medición de los coeficientes de difusión hace una suposición importante a considerar, y es que todo desplazamiento de las moléculas de agua se da de manera Gaussiana, donde no existe ninguna direccionalidad dependiente adyacente. A pesar de que la mayoría de los tejidos exhiben una isotropía a la difusión del agua (lo cual significa que su direccionalidad no depende de cómo las moléculas de agua se desplazan, ya que todas se distribuyen de manera homogénea). Sin embargo, encontramos que el tejido neurológico exhibe una alta anisotropía, ya que la movilidad de las moléculas de agua varía en función al arreglo de fibras mielinizadas, especialmente de la sustancia blanca, la cual exhibe una gran coherencia en su organización y orientación (Beaulieu, 2002; Chenevert, 2010; Moseley et al., 1990).

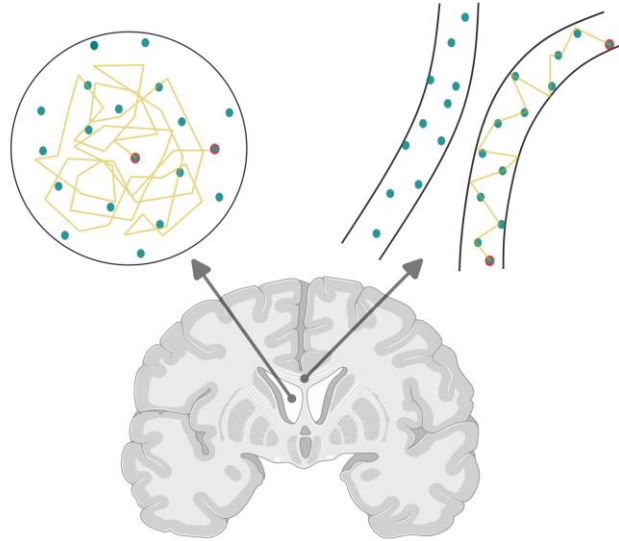


Figura 5. *Difusión isotrópica y anisotrópica. A la derecha, ejemplo de la difusión isotrópica o libre en donde las moléculas de agua se desplazan hacia cualquier dirección, como la que encontramos en el líquido cefalorraquídeo en el cerebro. En el lado derecho, representa la difusión anisotrópica de fibras nerviosas, en donde las moléculas se desplazan en una dirección preferente dada por la restricción de la propia estructura anatómica.*

1.3.3 Lo clásico: El tensor de difusión.

El modelo matemático conocido como imagen por tensor de difusión (DTI, por sus siglas en inglés) (Basser et al., 1994) que, a través de las diferentes direcciones de gradientes codificadas en las imágenes sensibles a difusión, puede cuantificar y analizar la dirección y magnitud de la difusión del agua en diferentes tejidos biológicos. Este proceso se resume en una matriz tridimensional D simétrica y definida positiva, que refleja la complejidad de la difusión en cada voxel.

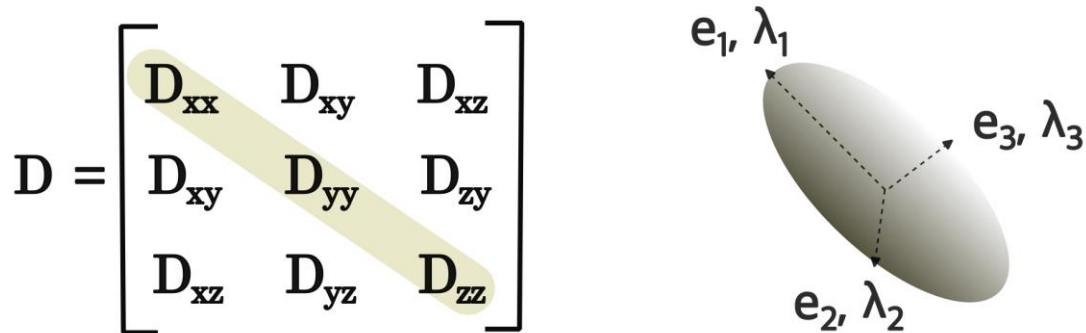


Figura 6. Representación del tensor de difusión. Del lado izquierdo está la matriz de covarianza en donde D_{xx} , D_{yy} y D_{zz} son los coeficientes de difusión en las direcciones x , y , z . A la derecha es la representación del tensor por un elipsoide con sus tres eigenvectores y eigenvalores.

Es importante resaltar que la matriz D es simétrica, puesto que la difusión se asume Gaussiana. Sin embargo, a pesar de que el tensor de difusión contiene información de los coeficientes de difusión en seis direcciones, no necesariamente coincide con la orientación del tejido (Vidal et al., 2020). El modelo del tensor permite obtener diferentes parámetros como: 1) Fracción de Anisotropía (FA), la cual indica la relación de los coeficientes de difusión en varias direcciones y determinará la direccionalidad de la difusión en un voxel; 2) Difusión Axial (DA), la cual mide la magnitud del coeficiente de difusión en la dirección en que está orientado el tejido (la dirección preferente será denominada λ_1); y 3) Difusión Radial (DR), parámetro que contiene el valor del coeficiente de difusión en las direcciones perpendiculares a la dirección preferente (denominándose como λ_2 y λ_3 , respectivamente) (Alexander et al., 2007). Dichos parámetros de difusión permiten la creación de mapas cuantitativos que permiten medir la magnitud, orientación y grado de anisotropía de la difusión en una población de fibras en un voxel. Por ejemplo, FA está relacionada con la direccionalidad de la difusión, DM la variación y densidad de células y membranas, DR cuantifica la pérdida o ganancia en la mielinización, mientras que DA es sensible a la degeneración axonal (Alexander et al., 2007).

A pesar de que el tensor ha sido ampliamente utilizado para la evaluación de la microestructura, este tiene algunas grandes desventajas y su interpretación debe ser cuidadosa ya que es susceptible al ruido, volumen parcial (combinando voxeles con señales de sustancia blanca, sustancia gris y/o líquido cefalorraquídeo), y a regiones de la sustancia blanca con entrecruce de fibras. Este último representa un reto para su correcta interpretación biológica. En áreas donde existen dos o más entrecruce de fibras, por ejemplo, el centro semioval o el fascículo uncinado, el tensor tiende a ajustar un elipsoide circular y con ello una fracción de anisotropía en valores cercanos a 0. Esto lleva a una incorrecta correlación entre de los datos cuantitativos derivados de los mapas del tensor y el tejido real adyacente.

1.3.4 Modelos avanzados: Deconvolución esférica, modelos biofísicos y multi-tensor.

Debido a que el tensor de difusión resulta insuficiente para describir tejidos con arquitectura mucho más compleja como lo es la corteza cerebral, existen otros métodos para describir la difusión del agua, como la deconvolución esférica, los modelos multi-tensor y los modelos biofísicos, que, a pesar de ser modelos desarrollados para explicar la difusión en la sustancia blanca, pueden ser de gran utilidad a la hora de explorar la corteza cerebral.

Los métodos multi-tensor son una extensión lógica del propio DTI, que como su nombre lo indica, puede calcular más de un tensor por cada voxel, conservando las suposiciones de Gaussianidad. Existen multi-tensores que estiman la difusión en cada voxel de la misma manera, dando como resultado dos tensores completamente simétricos en su forma (Caan et al., 2010; Filatova et al., 2018). Así como otros que pueden calcular la forma (eigenvalor) y orientación (eigenvector) de cada tensor de manera independiente entre ellos, obteniendo perfiles de difusión con características distintas. Tal es el caso del método MRDS (Multi-Resolution Discrete-Search) (Coronado-Leija et al., 2017), que determina la orientación y número de poblaciones de fibras nerviosas existentes en un voxel a partir de algoritmos complejos y del cual usaremos como base en este proyecto de investigación (ver en 1.3.5).

La deconvolución esférica (SD, por sus siglas en inglés) ha sido ampliamente utilizada para estudiar la sustancia blanca ya que es capaz de estimar la distribución de las orientaciones de las fibras en cada voxel sin la necesidad de hacer ninguna suposición a priori acerca de las características de la población de fibras existentes (Tournier et al., 2004). Aquí, la SD reconstruye las orientaciones a partir de la función de respuesta constante directamente de la señal de difusión. Una de las grandes ventajas de utilizar SD es que computacionalmente es poco demandante y no requiere de adquisiciones complejas para el uso clínico, sin embargo, carece de especificidad de la microestructura. Para sobrellevar las limitantes de DTI y SD, se fueron desarrollando modelos biofísicos, que buscan identificar las características de la microestructura que está siendo modelada por la señal de difusión (Jespersen, 2018). El concepto de los modelos biofísicos gira entorno a la compartimentación de la difusividad del agua como referencia a cada una de las características microestructurales de un tejido en particular, es decir que, la señal total de difusión es la suma de señales generadas por la difusión en diferentes compartimentos (Jelescu et al., 2020). Por ejemplo, en cada voxel podemos extraer información de tejido específicos y representarlos con figuras geométricas como los *Sticks* para la información intracelular, *Ball* y *Zeppelin* para la extra-celular, entre otros (Behrens et al., 2003). A pesar de que estos modelos han sido de gran ayuda para estudiar diferentes fenómenos biológicos, la robustez en su precisión sigue siendo un reto para el uso estándar clínico (ver en discusión).

1.3.5 Multi-tensor: Multi-Resolution Discrete-Search (MRDS)

Partiendo de que los métodos multi-tensor son una extensión lógica del DTI, el ajuste de MRDS involucra una serie de pasos. En primer lugar, se calculan los valores escalares del tensor de difusión al estimar una función de respuesta (similar a la utilizada en SD; Tournier et al., 2004). Para este propósito, se seleccionan voxeles de IRM_d con alta probabilidad de contener una sola población de fibras (por ejemplo, el cuerpo calloso) que exhiben valores elevados de FA y un promedio de MD. Aquí, se excluyen voxeles con $FA < 0.95$, $MD < 0.1 \times 10^{-3}$ y $MD < 3 \times 10^{-3}$ para evitar ruido y artefactos.

Una descripción general de la manera en que MRDS resuelve el número de orientaciones y poblaciones de fibras, está basado en una serie de pasos:

- 1.- Primero realiza una búsqueda discreta de todas las combinaciones de orientaciones posibles en alta resolución en una media esfera.
- 2.- Donde por cada grupo de configuraciones posibles, se crea un diccionario seleccionando los átomos de hidrógeno asociados a esa orientación en particular y así consecutivamente.
- 3.- Una vez obtenidas las orientaciones, se calculan los perfiles de difusividad paralela y perpendicular para cada población de fibras axonales, por separado.
- 4.- Finalmente, se determina el número de poblaciones de fibras a partir de la selección de modelo. Aquí, se utilizó el Criterio de Información Bayesiano (BIC), que a partir de penalizaciones por el número de parámetros evita el sobreajuste. Entre valores más bajos de ($BIC < 2$) mejor la selección del modelo de cuantos son los tensores que mejor explican los datos. La fórmula es: $BIC = p \ln(M)$, donde p representa el número de parámetros y M el número de orientaciones.

Una de las grandes ventajas de MRDS es que este tiene la habilidad de estimar diferentes perfiles de difusión por cada población de fibras por cada voxel. Además, el uso de diccionarios y la optimización no lineal del tensor de difusión hace que este método sea robusto y estable para resolver configuraciones microestructurales complejas como es el entrecruce de fibras a un ángulo de $< 45^\circ$ (Coronado-Leija et al., 2017).

2. JUSTIFICACIÓN

La heterogeneidad que presentan las displasias corticales dificulta tanto el diagnóstico como el estudio de dichas lesiones a nivel clínico. En algunos casos, la lesión *per se* no resulta epileptogénicas, aunque presente todas las características anatómicas para convertirse en un foco epiléptico. En contraparte, hay otras lesiones displásicas que sí resultan epileptogénicas pero que, dada su sutileza anatómica, representan verdaderos retos por lo difíciles de encontrar mediante resonancia magnética convencional, dejando pocas opciones viables de tratamiento. Se han realizado muchos esfuerzos por mejorar las técnicas de detección mediante imagen con el uso de adquisiciones que mejoran el contraste como T1, T2 o FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) (Kabat & Król, 2012; Lorio et al., 2020) o el uso de métodos de procesamiento de imágenes generando mapas cuantitativos que puedan brindar mayor información acerca de estas lesiones sutiles (Bernasconi et al., 2001; Bonilha et al., 2006; Gill et al., 2021), así como el uso de campos magnéticos más poderosos (Wang et al., 2021). Sin embargo, aunque estos nuevos acercamientos parecen ser prometedores para el manejo clínico, existe una necesidad latente de desarrollar mejores técnicas de análisis para lograr una detección y diagnóstico adecuado. Dado que la resonancia magnética convencional para estudiar la macroestructura cortical ha resultado insuficiente, en este trabajo proponemos un abordaje para analizar y estudiar la microestructura de la corteza cerebral con resonancia magnética sensible a difusión que puede ser usada como una posible herramienta que nos facilite el estudio de la cito- y mielo- arquitectura para entender dichos cambios que suceden a un nivel que otras técnicas no son posibles de alcanzar.

3.HIPÓTESIS

La resonancia magnética sensible a difusión nos permitirá detectar y evaluar longitudinalmente los cambios inducidos por la carmustina a nivel de la microestructura de la corteza cerebral.

4.OBJETIVO GENERAL

A través del modelo de displasia cortical inducida por carmustina y el uso de la resonancia magnética sensible a difusión, podremos evaluar longitudinalmente los cambios cito-arquitectónicos de la corteza cerebral y correlacionarlos con los resultados obtenidos a nivel histológico.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la magnitud y la temporalidad de los cambios microestructurales que ocurren en corteza cerebral en un modelo de displasia cortical inducida por carmustina.
2. Determinar la validez de las métricas imagenológicas empleadas para evaluar los cambios microestructurales mediante su correlato histológico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MODELO ANIMAL DE DISPLASIA CORTICAL.

5.1.2 Antecedentes del modelo animal.

Debido a que los estudios longitudinales para poder caracterizar los cambios estructurales y funcionales de la DCF en humanos representan grandes desafíos, es necesario recurrir a los modelos animales. En este sentido, el modelo de carmustina (1-3-bis -chloroethyl-nitrosourea, BCNU) en roedores es uno de los modelos de displasia cortical inducida más usados (Benardete & Kriegstein, 2002). Aquí, la carmustina, que es un fármaco antineoplásico de la familia de las nitrosoureas, es administrada a la rata gestante al día quince de gestación (E15), debido a que es un momento de intensa neurogénesis en las neuronas piramidales tanto de la corteza cerebral y en el hipocampo. El fármaco actúa interfiriendo en la replicación del material genético de las crías provocando un efecto mutagénico, afectando la proliferación neuronal y los precursores de la glía (Yamaguchi et al., 2010).

La administración de BCNU en roedores produce lesiones cito-arquitectónicas descritas a nivel clínico en los humanos. Tales como reducción en el grosor cortical, delaminación cortical, aglomeramiento de neuronas heterotópicas y pérdida de la densidad neuronal (Moroni, Cipelletti, et al., 2011; Tassi et al., 2002; Yamaguchi et al., 2010). Sin embargo y a diferencia de los pacientes con displasia cortical, el modelo de BCNU en roedores no provoca crisis espontáneas recurrentes, no obstante, se ha visto que pueden llegar a presentar hiperexcitabilidad en la corteza displásica en edades avanzadas de los roedores (Benardete & Kriegstein, 2002).

5.1.3 Inducción de la displasia cortical.

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a los protocolos aprobados por la junta de revisión de ética de nuestro instituto (archivo 111-A) y se realizaron de acuerdo a las leyes federales reglamentarias para la experimentación animal (NOM-602-ZOO-1999)

Se utilizaron seis ratas gestantes de la cepa Sprague-Dawley, las cuales fueron inyectadas con carmustina (también conocida como BCNU) (20 mg/kg; i.p.; n=3) o el volumen equivalente de solución salina para los animales control (n=3) al día 15 de embarazo (Benardete & Kriegstein, 2002). Las crías, que son el objeto de estudio en este proyecto (16 BCNU y 16 Control) se alojaron con sus madres hasta el destete en una habitación con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con acceso *ad libitum* a alimento y agua. Posteriormente fueron escaneadas por primera vez a los 30 días de edad. Los siguientes escaneos se hicieron a los 60, 120 y 150 días de edad de los animales. En cada punto temporal, dos animales control y dos animales BCNU fueron perfundidos y sus cerebros procesados para análisis histológico. Cabe destacar que los animales tratados con BCNU no mostraron características fenotípicas o de comportamiento anormales desde su nacimiento hasta la última edad de escaneo.

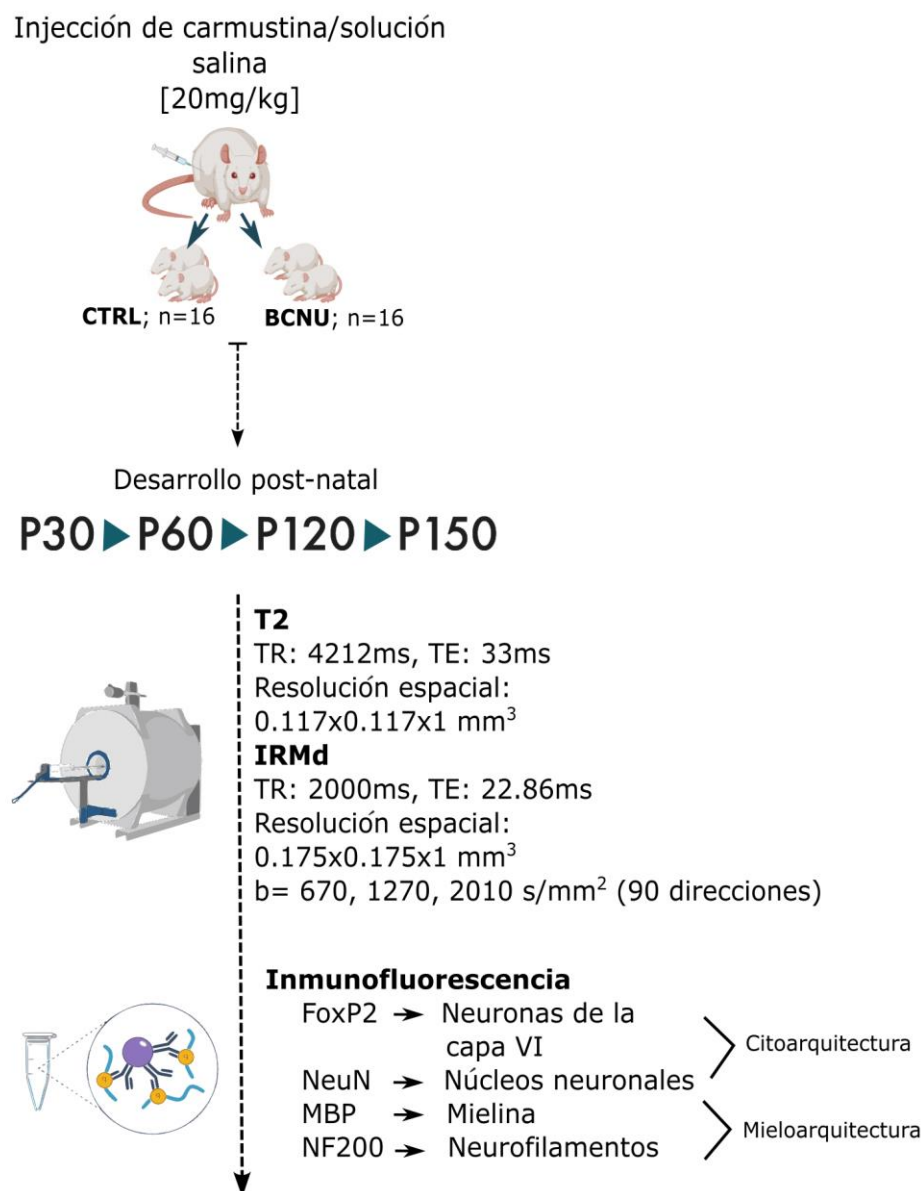


Figura 7. Metodología de proyecto. Aquí se muestra la secuencia de los métodos utilizados desde la inducción del modelo de displasia cortical en roedores, la adquisición de imágenes y procedimiento histológico. Los detalles se describirán en esta sección.

5.2 RESONANCIA MAGNÉTICA SENSIBLE A DIFUSIÓN.

5.2.1 Adquisición de imágenes.

Los protocolos de escaneo se llevaron a cabo en el Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM), ubicado dentro del Instituto de Neurobiología. Este cuenta con un resonador para especies pequeñas Bruker de 7T (Biospec 70/16) conectado a una consola con software Paravision 7.0. El equipo cuenta con gradientes de máxima amplitud de 760 mT/m y para la detección de la señal se usó una antena de superficie 2x2 de recepción. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano (4%) y oxígeno a un flujo de 2.5 l/min. Una vez corroborada la sedación, los animales se colocaron sobre un riel que cuenta con un marco de fijación y se les suministró una dosis de mantenimiento anestésico (isoflurano 2% y oxígeno) a un flujo similar al de la inducción. Durante el escaneo, los animales se colocaron dentro del magneto, razón por la cual deben mantenerse en normotermia mediante un sistema de recirculación de agua caliente bajo el animal. A todos los sujetos se les monitoreo el ritmo cardíaco, la frecuencia respiratoria y la saturación de oxígeno.

Para lograr los objetivos de este proyecto, se realizaron dos tipos de adquisiciones: 1) Imágenes con contraste T2 para evaluar la morfología cerebral a lo largo del tiempo, y 2) Imágenes sensibles a difusión que se utilizaron para ajustar el modelo del tensor y multi-tensor.

Las imágenes sensibles a difusión se adquirieron mediante imágenes eco-planares con gradientes pulsados (secuencia de Stejskal-Tanner). con valores b de 670, 1270 y 2010 s/mm² (cada uno con 90 direcciones distintas), y 14 volúmenes no sensibles a difusión. El protocolo se basó en un TR=2000 ms, TE=22.86 ms, ángulo de inclinación de 90°, matriz de 126 x 86 x 25, FOV: 22 x 15 mm y resolución espacial de 0.175 x 0.175 x 1.0 mm³. El tiempo de adquisición de las IRMd fue de 19 minutos. Por otro lado, las imágenes anatómicas pesadas a T2 TurboRARE o TSE se adquirieron mediante un protocolo de TR= 4212.78 ms, TE= 33 ms, ángulo de inclinación de 141.72°, matriz de 256 x 256 x 26, FOV: 30 x 30 mm y una resolución espacial de 0.117 x 0.117 x 1.200 mm³. El tiempo de adquisición de las imágenes anatómicas fue

de 5 minutos. Las imágenes T2 fueron pre-procesadas utilizando el atlas SIGMA (Barrière et al., 2019) como molde para homogeneizar y corregir imperfecciones.

5.2.2 Análisis de imágenes sensibles a difusión.

Las imágenes fueron primero pre-procesadas (Panel I, Figura 7) aplicándoseles un “denoising” para eliminar el ruido de la señal (Veraart et al., 2016), eliminación de del artefacto “Gibb’s ringing” (Kellner et al., 2016) y posteriormente la corrección de inhomogeneidades inducidas por los gradientes de difusión y potencial movimiento del animal durante la adquisición de imágenes inducidas por corrientes Eddy o también conocidas como corrientes de Foucault (Andersson et al., 2003).

Una vez pre-procesadas las imágenes, se delinearon manualmente los bordes superiores que limitan con la pia e inferiores sobre la intersección de la materia blanca y gris utilizando el software ITK-SNAP (Yushkevich et al., 2006); para mejorar la delineación de los bordes, las imágenes se sobre-muestrearon por un factor de dos (los análisis se realizaron con las imágenes normales). Los bordes definidos (ROIs) fueron utilizados para crear un descriptor anatómico común entre los animales mediante un sistema 2D de grid-lines (David Cortes-Servín, proyecto de maestría). Estos grid-lines se estimaron a partir de la ecuación Laplaciana de campos potenciales entre el borde inferior y superior (Lerch et al., 2008), del cual se anclaron 50 líneas distribuidas sobre el borde superior y a lo largo de la corteza, a su vez, a lo largo de cada línea se le agregaron 10 puntos equidistantes entre sí. Así, todas las métricas de difusión, tanto del DTI y de MRDS fueron muestreadas en cada uno de los puntos como se muestra en el Panel II de la Figura 7.

Para MRDS, la separación entre los tensores paralelos y perpendiculares se llevó a cabo mediante el cálculo del producto punto entre los eigenvectores con respecto al grid-line. En este caso, el eigenvector con el producto punto absoluto más largo es designado como el tensor paralelo, mientras que el eigenvector que presenta el menor valor absoluto del producto punto es etiquetado como perpendicular, y así en cada punto equidistante por cada grid-line.

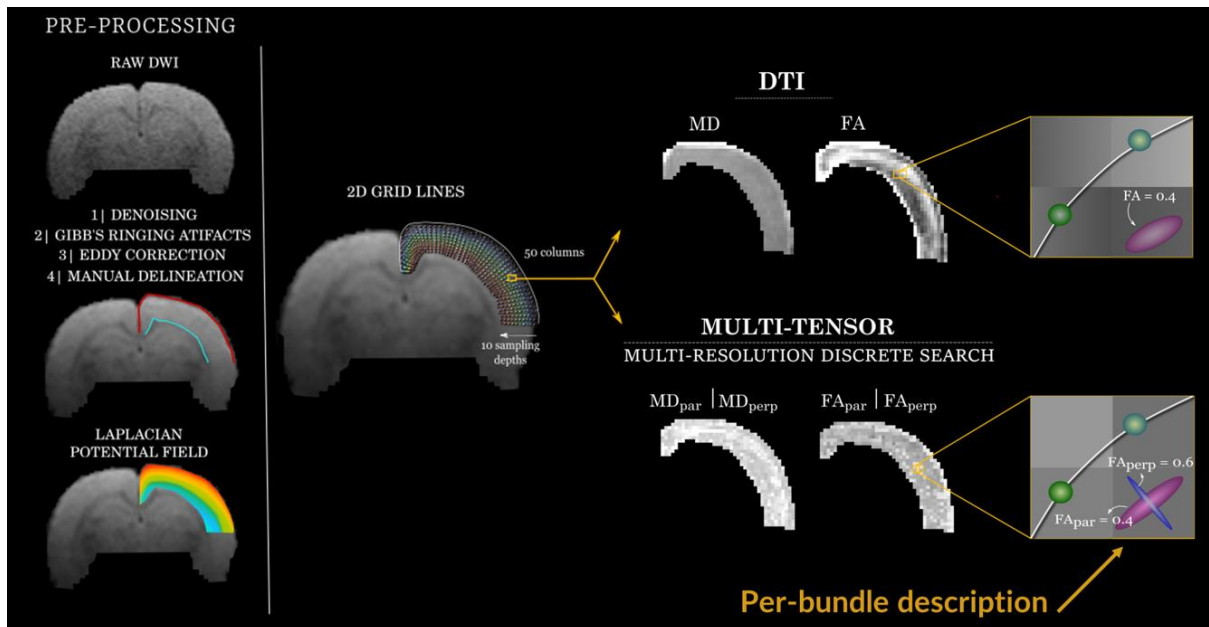


Figura 8. Flujo del procesamiento de imágenes sensibles a difusión. En el panel I se ilustra los pasos que se siguieron para el pre-procesamiento de las imágenes, incluyendo la ecuación Laplaciana. Panel II muestra el sistema de grid-lines como resultado del pre-procesamiento con la finalidad de muestrear los mapas de DTI y MRDS en cada punto equidistante.

5.3 INMUNOFLOURESCENCIA DE LA CORTEZA CEREBRAL.

5.3.1 Procedimiento histológico

Los animales fueron sometidos a una perfusión intracardiaca con 0.9% de NaCl, seguido de paraformaldehído (PFA) al 4%. Los cerebros fueron extraídos y fijados en PFA fresco al 4% durante 24 horas a una temperatura de 4°C. Posteriormente, los cerebros fueron inmersos en solución de sacarosa al 20% durante 48 horas, seguido de otras 48 horas en solución de sacarosa al 30%. Finalmente, los cerebros fueron congelados utilizando hielo seco y etanol, y se almacenaron a -80°C.

Previo al proceso histológico, los cerebros fueron cortados con un criostato (Leica) en rebanadas coronales de un grosor de 20 µm en la región de interés (aproximadamente en Bregma 5.86 - 3.14 mm) y se conservaron en solución fría de PBS (Sigma-Aldrich) 1X. Para la solución de bloqueo se utilizó suero de albúmina bovino (BSA; Sigma-Aldrich) al 2% + 0.3% de triton X-100 (ThermoFisher) mezclado en solución PBS 1X, en el cual las rebanadas fueron almacenadas durante 45 minutos a 4°C.

Para la caracterización de la cito-arquitectura se procedió con la incubación de los anticuerpos primarios anti-NeuN (1:350; Abcam) para el marcaje de núcleos neuronales y el anticuerpo primario selectivo a neuronas de la capa VI anti-FOXP2 (1:2000; Abcam) en rebanadas a nivel de la corteza somatosensorial S1. Por otro lado, la caracterización de la mielo-arquitectura se logró mediante con un doble marcaje utilizando los anticuerpos primarios anti-Myelin Basic Protein (MBP) (1:200; Sigma-Aldrich) y anti-Neurofilament 200 (1:200; Sigma-Aldrich) a nivel del hipocampo dorsal. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 24 horas y una vez finalizado el tiempo se procedió a lavar el tejido con PBS 1X (3 veces x 10 minutos). Posteriormente, se incubaron los anticuerpos secundarios Alexa 555 (1:500) y Alexa 488 (1:500) durante 4 horas. Pasadas las 4 horas se lavó el tejido por una última vez (3 veces x 10 minutos) y se procedió al montaje del tejido sobre portaobjetos de cristal ionizados.

5.3.2 Adquisición de imágenes y procesamiento.

La captura de imágenes se realizó mediante el uso de un microscopio para fluorescencia Apotome-Zeiss y el software AxioVision. Las imágenes fueron capturadas con un objetivo de 10X se integraron para formar un mosaico que nos permitiera tener una vista panorámica de la rebanada. Para ello, se usaron filtros de emisión de 488 nm y 565 nm.

Las imágenes fueron posteriormente procesadas usando el software ImageJ. Aquí, las imágenes fueron sometidas a procesos básicos de visualización como <subtract background>, <brightness/contrast adjustment>, entre otros. Para el análisis y procesamiento de las imágenes marcadas con MBP y NF200, se utilizó el software OrientationJ (disponible en <https://github.com/Biomedical-Imaging-Group/OrientationJ>) del cual se calculó el tensor de estructura (Püspöki et al., 2016) utilizando un método de *pixel-wise* en el que el tensor se calculó tomando como referencia el *local neighborhood* donde se especificó una ventana de forma Gaussiana específica de 15 μm para derivar la orientación local, la anisotropía y la intensidad, dando como resultado mapas vectoriales y de coherencia.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.1 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS IMÁGENES SENSIBLES A DIFUSIÓN.

Para el análisis longitudinal se utilizó el programa R v.4.1.0 (R Core Team, 2023), donde se implementaron diversos paquetes y librerías. El paquete 'lmer' (Bates et al., 2015) fue utilizado para ajustar el Modelo Lineal Mixto (MLM), donde la respuesta (y) fueron las métricas de los mapas cuantitativos (FA, MD, FA_{par}, FA_{perp}, etc.), la edad y grupo como los efectos fijos (β), y el animal *per se* como efecto mixto (γ).

Una vez realizado el ajuste de modelo lineal, se procedió a calcular el Estimated Marginal Means (EMMs) utilizando el paquete 'emmeans' (Russel, 2023) para interpretación de las interacciones de manera longitudinal y entre grupos. Después, se realizaron pruebas Post-Hoc (Tukey's Honest Significant Difference) para calcular la significancia entre los grupos, donde se consideró una $p < 0.05$ como una diferencia estadísticamente significativa.

El análisis estadístico se realizó en cada punto equidistante del sistema de grid-lines.

7. RESULTADOS

7.1 IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA

7.1.2 Imágenes estructurales pesadas a T2.

En la Figura 8 se muestran las imágenes anatómicas T2, las cuales revelan una atrofia hipocampal, principalmente en la región dorsal, teniendo como consecuencia un agrandamiento de los ventrículos. Es crucial resaltar que la lesión no es evidente a los 30 días postnatales (P30) (cuadro amarillo), sino que comienza a manifestarse a

partir de los 60 días postnatales (P60), con una inclinación a intensificarse y extenderse hacia el hipocampo dorsal del lado opuesto y/o hacia los hipocampos ventrales.

Resultados similares han sido descritos anteriormente (Moroni, Zucca, et al., 2011) donde identificaron lesiones ventriculares similares a partir de P60 en respuesta a la inducción de la displasia cortical mediante BCNU en roedores. Aquí, cabe señalar que todos los sujetos del grupo BCNU exhibieron algún grado de lesión en diferentes puntos, por ejemplo, algunos manifestaron la lesión hipocampal desde P60 con evolución temporal y otros presentaron la lesión moderada hasta que cumplieron 150 días postnatales. Este patrón conlleva a sugerir que todos los animales en el grupo BCNU son distintos entre sí y que manifiestan una variabilidad inherente propia de las displasias corticales.

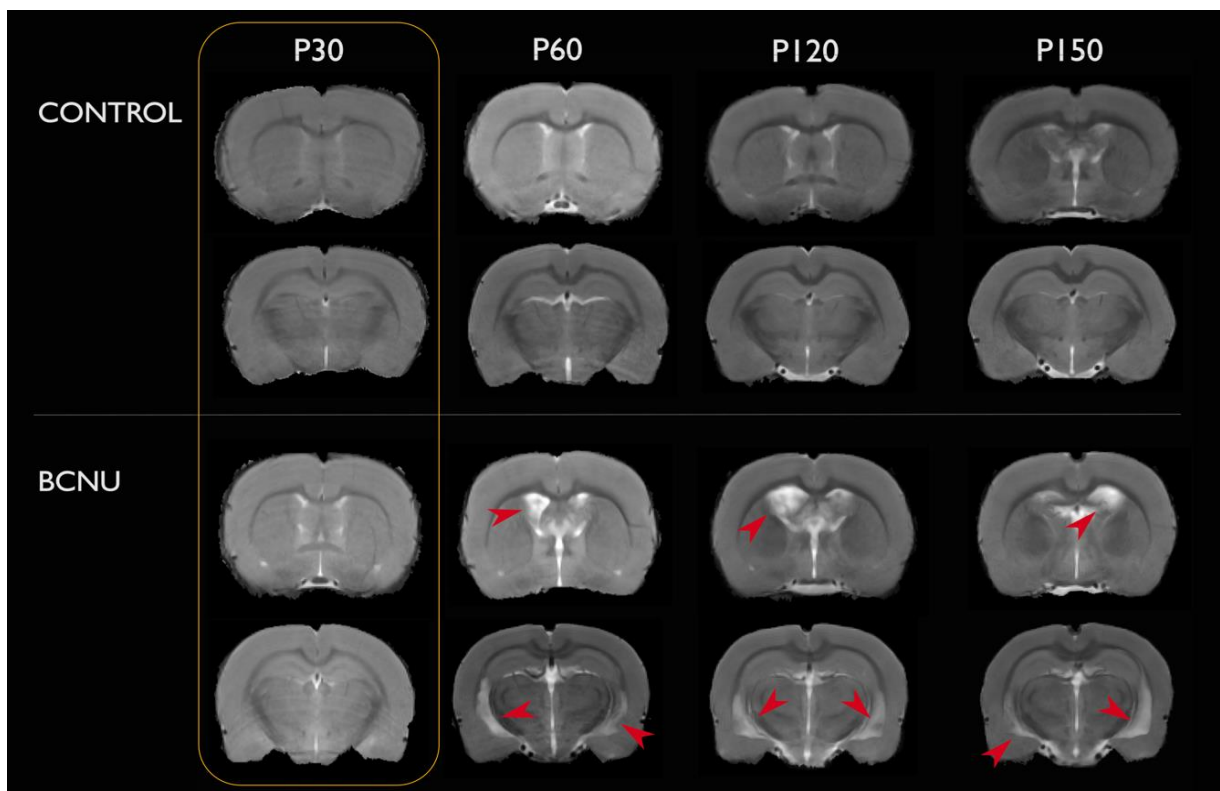


Figura 9. Imágenes anatómicas pesadas a T2. Dos secciones coronales a diferentes niveles de la corteza muestran anomalías (híper intensidades) en animales BCNU. Se observa una evidente progresión de la atrofia hipocampal asociada al agrandamiento ventricular (flechas rojas). Siendo más evidente a partir de P60. No hay diferencias estructurales evidentes entre animales control y BCNU a P30 (cuadro amarillo).

7.1.3 Imágenes pesadas a difusión.

Los hallazgos derivados del análisis del tensor de difusión revelan la ausencia de cambios longitudinales en las métricas clave, como la fracción de anisotropía (FA) y la difusividad media (MD). La figura 9-A muestra la representación espacial de grid-lines de acuerdo con su nivel de significancia estadística, y se observa que, en términos generales, no se presentan diferencias sustanciales entre los animales al ajustarse el tensor de difusión.

En relación con la métrica de FA, se identificaron ciertos puntos con una significancia estadística ($p < 0.05$), sin embargo, estas no reflejan significancia de manera espacial. Se destaca que los niveles de FA no superan el valor de 0.24, lo cual es congruente con la naturaleza de la corteza cerebral, que presenta valores bajos de FA. Sin embargo, resulta intrigante observar que los animales tratados con BCNU exhiben una tendencia hacia la anisotropía relativamente mayor en comparación con los controles, tendencia que no se muestra en ninguna otra métrica. Por otro lado, MD, RD y AD no mostraron diferencias significativas a lo largo de las edades ni anomalías en las diferentes regiones corticales.

En la figura 8-B, se presentan los efectos predictores derivados del Modelo Lineal Mixto para cada métrica (eje Y) a lo largo del tiempo (eje X) en un punto en el espacio de grid-lines (círculo rojo), donde se confirma que, aunque las tendencias de las rectas varían entre sí, no exhiben una separación lo suficientemente pronunciada para alcanzar la significancia estadística o representar interacciones complejas a lo largo del tiempo. Sin embargo, estos resultados eran previsibles dado que el tensor de difusión se encuentra especialmente limitado en su capacidad de caracterizar la sustancia gris.

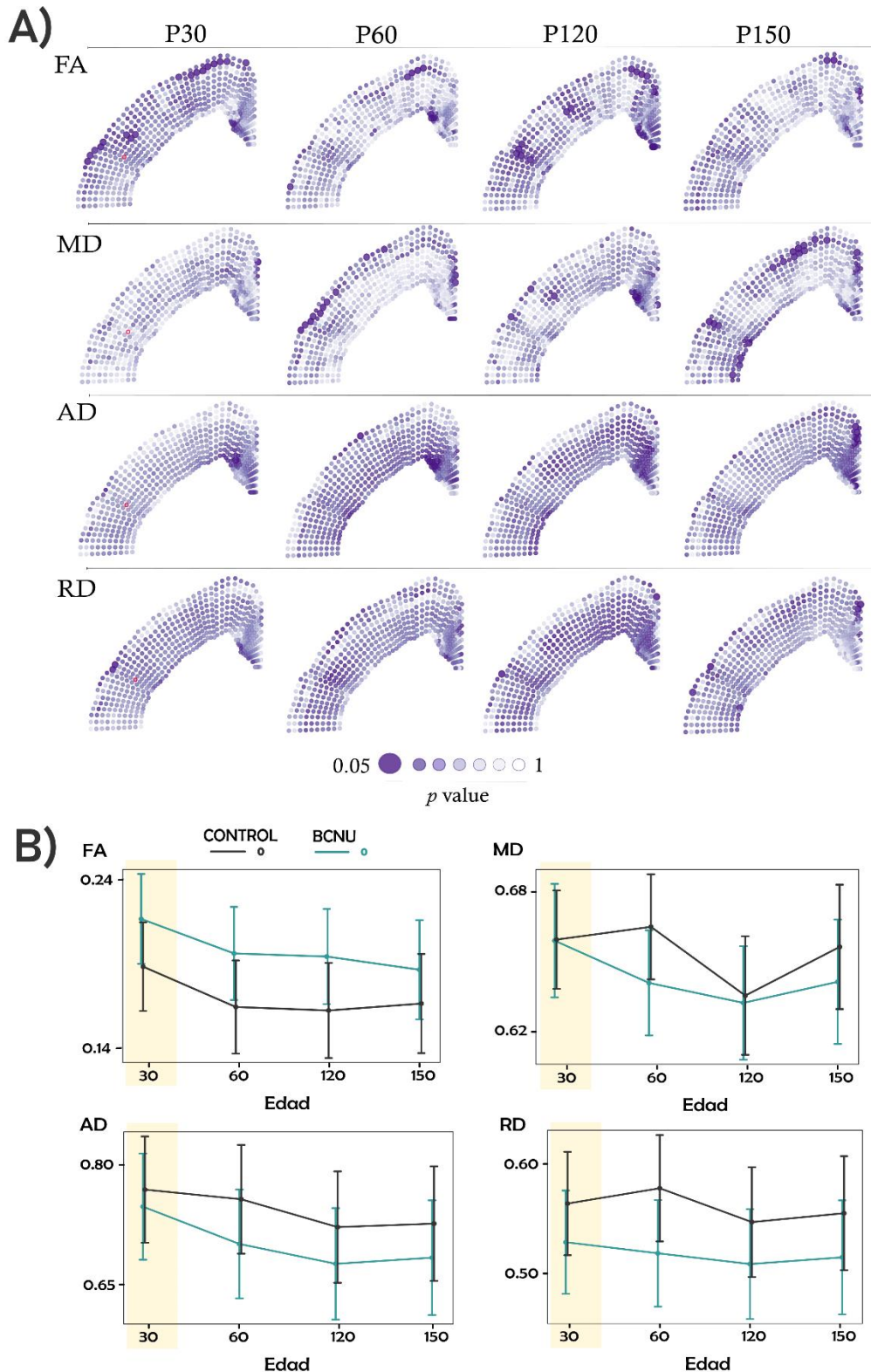


Figura 10. Análisis del tensor de difusión. A) Visualización espacial de los resultados del análisis de Post Hoc obtenidos del Modelo Lineal Mixto (MLM) en el sistema de grid-lines. Se observa que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo (P30, P60, P120, P150) en los diversos escalares del tensor. B) Muestran los predictores de cada métrica y su comportamiento a lo

largo del tiempo de un solo punto en el espacio de grid-lines (circulo rojo). El cuadro amarillo resalta la ausencia de significancia especialmente en P30.

Por otra parte, se obtuvieron resultados de gran interés al calcular las métricas derivadas de MRDS. La figura 10-A presenta la evolución temporal de las métricas FA_{par} , FA_{perp} , MD_{par} y MD_{perp} . Se observa que, a partir de los 120 días postnatales, no se hay diferencias sustanciales entre los grupos. Sin embargo, a los 30 días postnatales se identifican disparidades significativas ($p < 0.05$) en FA_{par} en las regiones que comprenden la corteza motora ubicada por encima del cíngulo, así como en partes de la corteza somatosensorial, abarcando desde la capa V hasta la capa VI. Similarmente en FA_{perp} , estas diferencias se manifiestan de manera más extensa, cubriendo y extendiéndose a lo largo de la capa V-VI. Del mismo modo, MD_{perp} exhibe significancia principalmente concentrada en la capa VI. No se apreciaron diferencias entre los grupos en relación con MD_{par} .

Esto implica que tanto las fibras radiales como las tangenciales están presentando una anisotropía anómala en el grupo BCNU durante las etapas tempranas. Esto se corrobora ya que en P30 los controles tienen valores significativamente superiores a los animales BCNU, a excepción de MD_{perp} (figura 10-B. Aquí, solamente MD_{par} mostró no ser estadísticamente diferente. Interesantemente, al separar los tensores entre perpendicular y paralelo, vemos que los niveles de FA aumentaron hasta 0.7, lo cual podría indicar un cálculo más preciso y adecuado de la anisotropía. Este resultado tiene sentido a la luz de investigaciones recientes que desmitifican la suposición de isotropía en la corteza. Es importante destacar que en todas las métricas encontramos interacciones de entrecruce de rectas entre ambos grupos, lo cual puede estar sugiriendo que la relación entre la edad y difusividad no es constante en ambos grupos.

Por último, en la Figura 8-B y 9-B, las barras amarillas en P30 hacen referencia a las métricas que no fueron significativas, mientras que las rojas refieren a los que si fueron significativos ($p < 0.05$) derivados del Modelo Lineal Mixto. Esto concuerda con investigaciones previas que han identificado cambios en la anisotropía paralela y perpendicular en edades tempranas (Villaseñor, P., 2023).

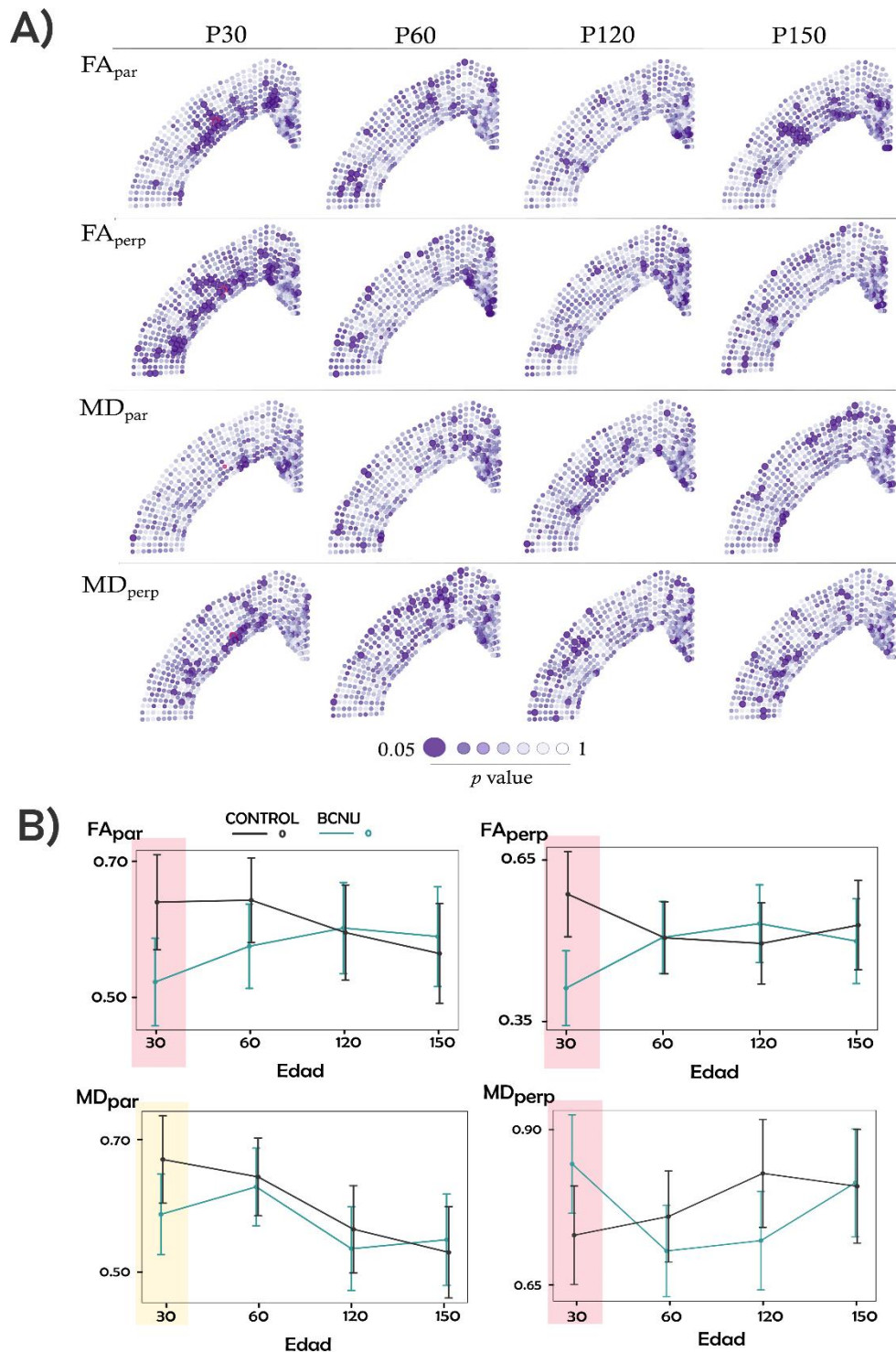


Figura 11. Análisis de MRDS. A) Métricas FA y MS en las direcciones paralela (par) y perpendicular ($perp$) obtenidos del MLM. Se evidencian diferencias significativas ($p < 0.05$) en P30 para FA $_{par}$ y FA $_{perp}$ a lo largo de la corteza motora y somatosensorial, abarcando principalmente las capas corticales V y VI. MD $_{perp}$ muestra diferencias entre los grupos a lo largo de la capa VI, mientras que MD $_{par}$ no presenta diferencias. B) Trayectorias de cómo se comportan los valores a lo largo del tiempo en función a las métricas, donde las barras rojas resaltan que a P30 hubo diferencias

estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en comparación a otros puntos temporales, a excepción de MD_{par} (barra amarilla) que no mostró diferencias entre grupos.

7.2 HISTOLOGÍA POR INMUNOFLUORESCENCIA.

7.2.1 Inmunofluorescencia de la cito-arquitectura.

Para visualizar el arreglo e integridad de las seis capas corticales, utilizamos el anticuerpo primario selectivo a núcleos neuronales (NeuN), el cual mostró que hay una interrupción en la continuidad y transición entre láminas. La Figura 11-A muestra cortes coronales a nivel del hipocampo dorsal en donde se observa que en los animales BCNU (panel derecho) hay un error en la transición entre la capa III y IV, donde los bordes cito-arquitectónicos que los delimitan no se encuentran bien definidos y/o son ausentes. Cambios similares se observan también en la transición entre la capa V y VI, a pesar de que los cambios son más sutiles en las capas más profundas, la deslaminación ocurre y se conserva a lo largo de las edades. En este sentido, Moroni et al. (2011) reportaron una deslaminación similar en P60 y P90 en tinciones de Nissl. Sin embargo, nuestros resultados muestran que los animales tratados con BCNU pueden comenzar a desarrollar anomalías sutiles en el arreglo laminar desde etapas más tempranas como P30.

La deslaminación cortical afecta no solamente a las transiciones entre capas, si no también a la organización columnar (Lorente de Nó, 1938) en donde las neuronas siguen una orientación vertical en cadena. A pesar de que los animales BCNU muestran una heterogeneidad entre ellos, esta organización vertical se vio afectada en todas las edades (Figura 12-A). Si bien los cambios inducidos son sutiles, podemos observar que en P60 no existe tal organización columnar ni tampoco distinción entre las diferentes capas corticales. Mientras que en P30 y P150 se observa una distinción ambigua entre capas, la coherencia en la organización en columnas se ve afectada. Estos cambios sutiles se ven reflejados en la cuantificación del número total de neuronas que habitan en cada una de las capas corticales, así como el tamaño promedio de estas (Figura 13). Estos datos revelaron que los animales tratados con BCNU tienen un tamaño neuronal anormalmente más grande que los controles a lo largo de las capas corticales (Figura 13-B). A su vez, la cuantificación del número de neuronas mostró que efectivamente existe una pérdida en la densidad neuronal, particularmente entre las capas V-VI. Siendo más evidente en P60 (Figura 13-C). Estos datos sugieren que los cambios son sutiles y varían entre sujetos, pero se

conservan las anomalías en la disrupción de la coherencia cito-arquitectónica a lo largo del tiempo.

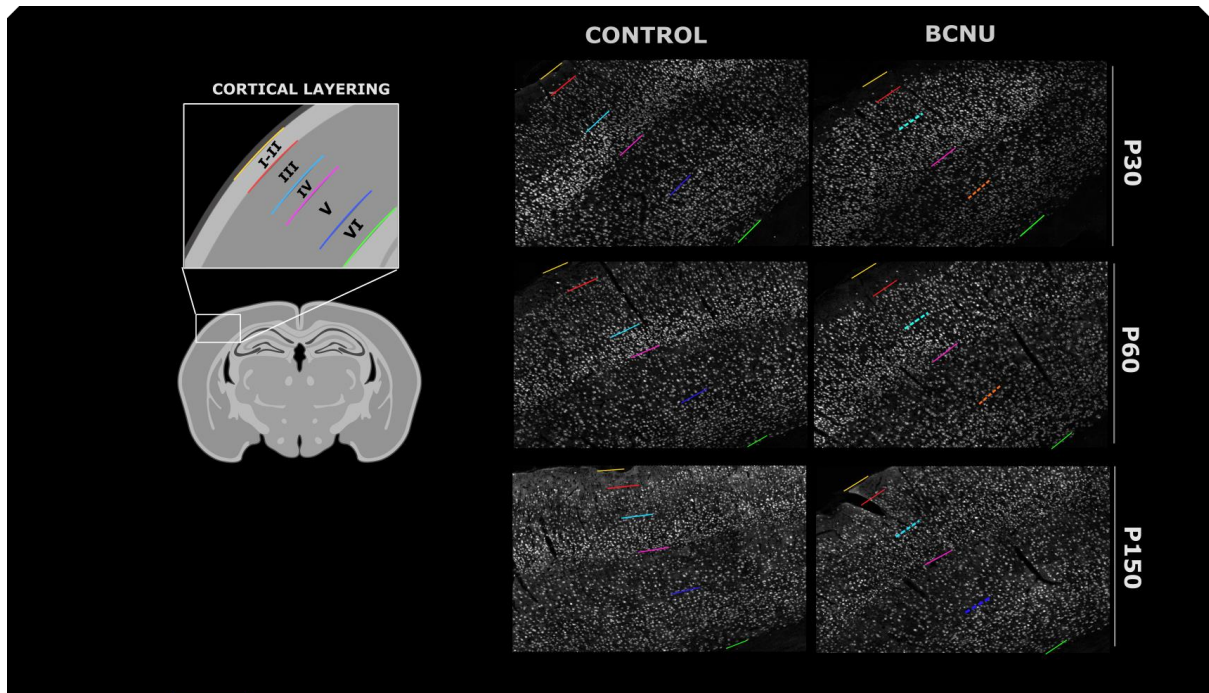


Figura 12. Histología de la corteza cerebral mediante NeuN. Esquema de la corteza cerebral y la delimitación de cada capa cortical dada indicada por cada línea de color (izquierda). Acercamientos de la corteza somatosensorial en donde se visualizan las seis capas corticales, cada línea de color representa un borde cortical. En la columna de animales BCNU, la delimitación entre la capa III-IV y V-VI se ve afectada (líneas intermitentes cyan y naranja).

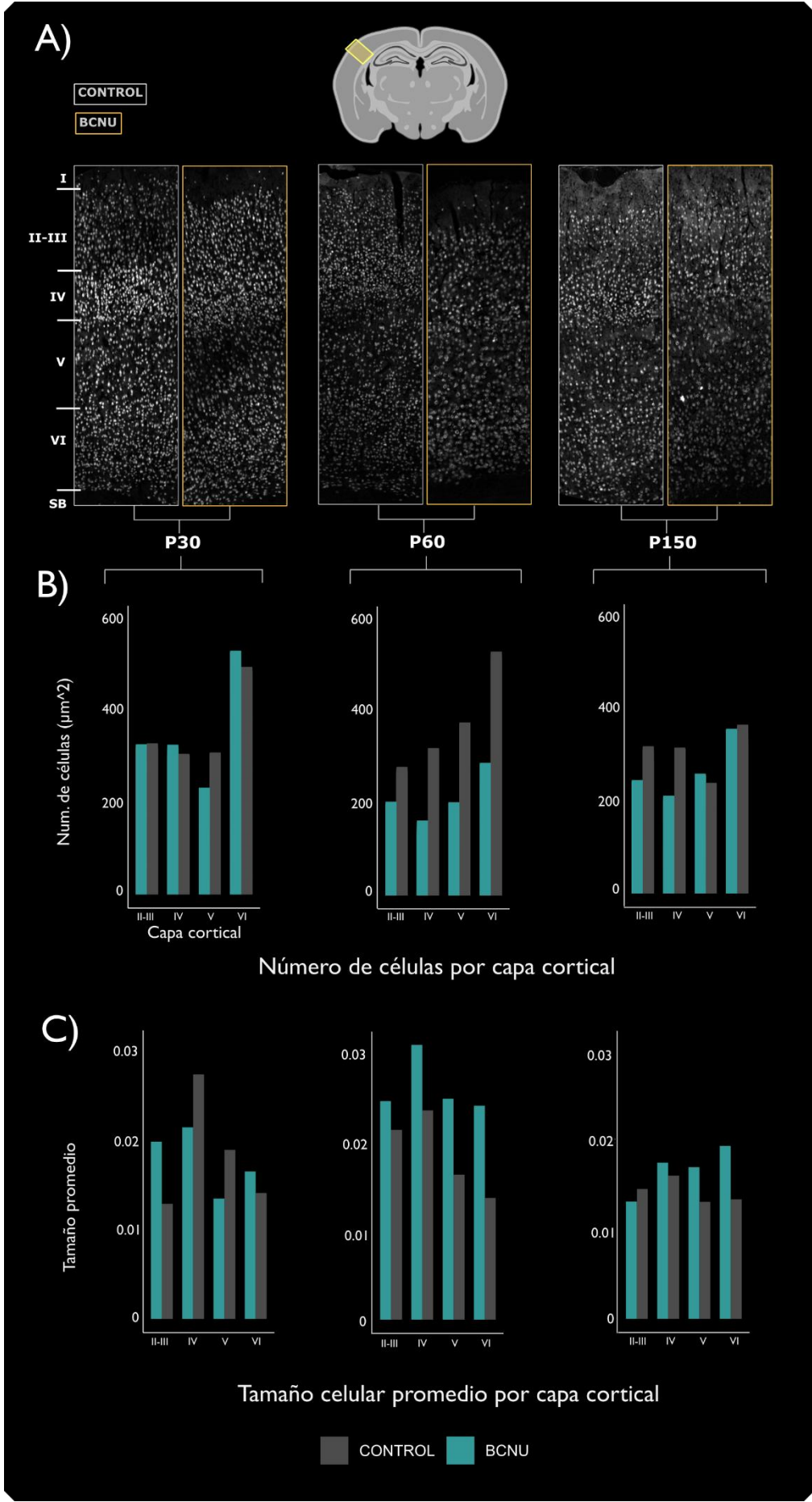


Figura 13. *Histología de la corteza somatosensorial mediante NeuN. A) Organización columnar de la corteza de animales en P30, P60 y P150. Donde se observan transiciones anormales entre las capas, siendo más evidente la pérdida de coherencia vertical en P60. B) Conteo neuronal por capa cortical en las diferentes edades, se aprecia una reducción en el número total de neuronas en las capas II-III, V y VI, especialmente a P60 y P150. C) Promedio del tamaño neuronal entre capas muestra los animales BCNU tienden a ser de mayor tamaño en comparación a los controles.*

Después de revisar la cito-arquitectura con NeuN y ver que el borde y transición entre la capa V y VI esta poco determinada, nos preguntamos si estos cambios serían sensibles al marcaje del anticuerpo primario FoxP2 que es selectivo solamente a las neuronas de la capa VI. Encontramos que los animales BCNU tienden a mostrar una disminución en la densidad y tamaño de neuronas, así como irregularidad en el borde superior de la capa (Figura 13; flechas naranjas), siendo más notorio a P30. Esta heterogeneidad en el borde superior, que, a pesar de ser sutil, podría estar causando una transición anormal entre las neuronas de la capa V y las neuronas de la capa VI.

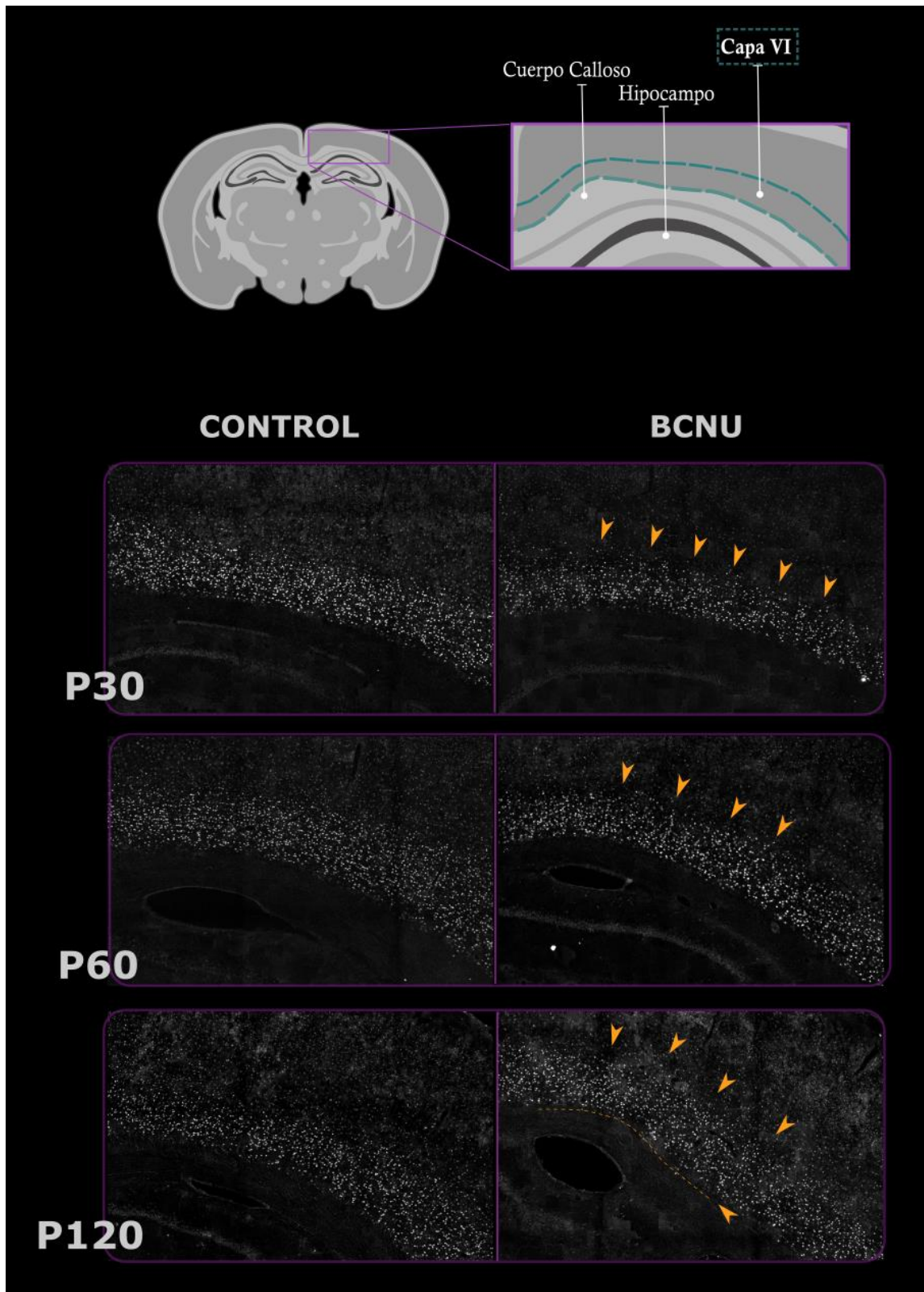


Figura 14. Histología cortical con el anticuerpo primario selectivo a las neuronas de la capa seis FoxP2. En el panel izquierdo tenemos a los animales control a lo largo de las edades mostrando una asimetría y heterogeneidad en el revestimiento neuronal de la capa seis. El panel derecho muestra a los animales tratados con BCNU, las flechas naranjas apuntan a los bordes superiores irregulares de dicha capa. En P30 la densidad de neuronas está disminuida en el BCNU.

7.2.2 Inmunofluorescencia de la mielo-arquitectura y el tensor de estructura.

Si bien la cito-arquitectura proporciona información crucial sobre la organización cortical y laminar, las bandas de mielina también juegan un rol importante en este aspecto. Se ha demostrado que la mielo-arquitectura revela patrones laminares en el tejido cerebral.

Aquí, nuestras tinciones de mielina con MBP (Figura 14, MBP en verde) mostraron anomalías en la mielo-arquitectura a lo largo del tiempo en los animales BCNU.

En la figura 14 tenemos tinciones de mielina con MBP (en verde) en un corte coronal a nivel del hipocampo dorsal con un acercamiento a la corteza motora. Los animales control (panel izquierdo) muestran una organización constante de las orientaciones radiales y tangenciales de las fibras de mielina y se mantiene a lo largo de las edades. Por el contrario, en el grupo tratado con BCNU (panel derecho) presenta diversas alteraciones anormales en la organización de la mielina (flechas magenta). Particularmente, a P30 en el sujeto BCNU hay una notable pérdida en la densidad de mielina y en las orientaciones radiales y tangenciales de las fibras que van desde las capas más profundas hacia las capas superficiales de la corteza motora (M1, M2). A pesar de que P30 muestra los cambios más drásticos en la mielo-arquitectura, las edades de P60, P120 y P150 continúan mostrando anomalías más sutiles en diferentes localizaciones de la corteza. Nuevamente, la extensión y el tipo de desorganización de las fibras varía entre los animales, reafirmando que el modelo induce alteraciones heterogéneas entre los sujetos.

Especialmente, los resultados obtenidos en la tinción de mielina a P30 adquieren una gran relevancia, ya que concuerdan con los hallazgos derivados del análisis de las métricas de MRDS, como se muestra en la Figura 10. Donde tanto FA_{par} como FA_{perp} revelan que los animales BCNU tienen menor anisotropía que los controles en P30. Esto sugiere la posibilidad de que el período en torno a P30 desempeña un papel crucial en la detección de la displasia cortical en los animales inducidos por BCNU.

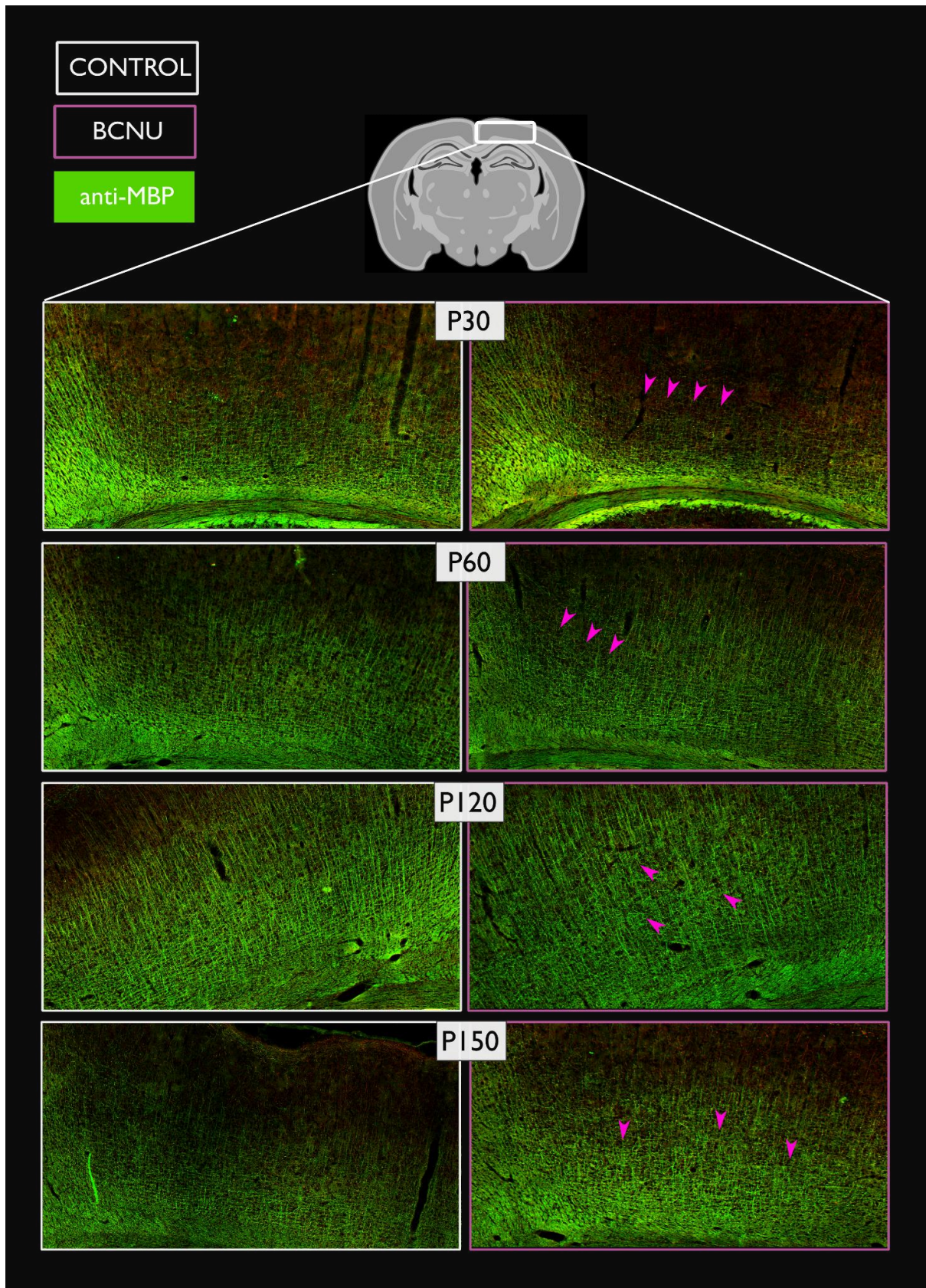


Figura 15. Inmunofluorescencia de la mielo-arquitectura mediante el anticuerpo primario MBP. Acercamiento en corte coronal de ocho animales (Control: $n=4$; BCNU: $n=4$) a lo largo de las edades P30, P60, P120 y P150. Se observan patrones diversos

de desorganización en las fibras de mielina en la corteza motora de los animales BCNU (flechas magenta). Sin embargo, en P30 se aprecian alteraciones de la cantidad y organización de la mielina, mientras que las otras edades, las anomalías presentan un carácter más sutil.

Para abordar estas características anormales de la mielo-arquitectura, utilizamos el tensor de estructura (Figura 15), mediante el cual se calcularon mapas de coherencia. Estos mapas se generaron a partir de la orientación local de la resolución nativa de la imagen original de MBP, con una ventana gaussiana de 15 μm . En el contexto del tensor de estructura, la coherencia se refiere a la pérdida o ganancia de organización de las fibras de mielina en este caso. Los resultados revelaron diferencias en la coherencia entre el grupo control y el grupo BCNU, especialmente en la corteza somatosensorial a P30 (flechas amarillas), lo que coincide con las observaciones previas obtenidas a partir de las tinciones de mielina de la Figura 14. En las edades siguientes se notaron cambios en la textura, pero fueron mas sutiles (cuadros amarillos).

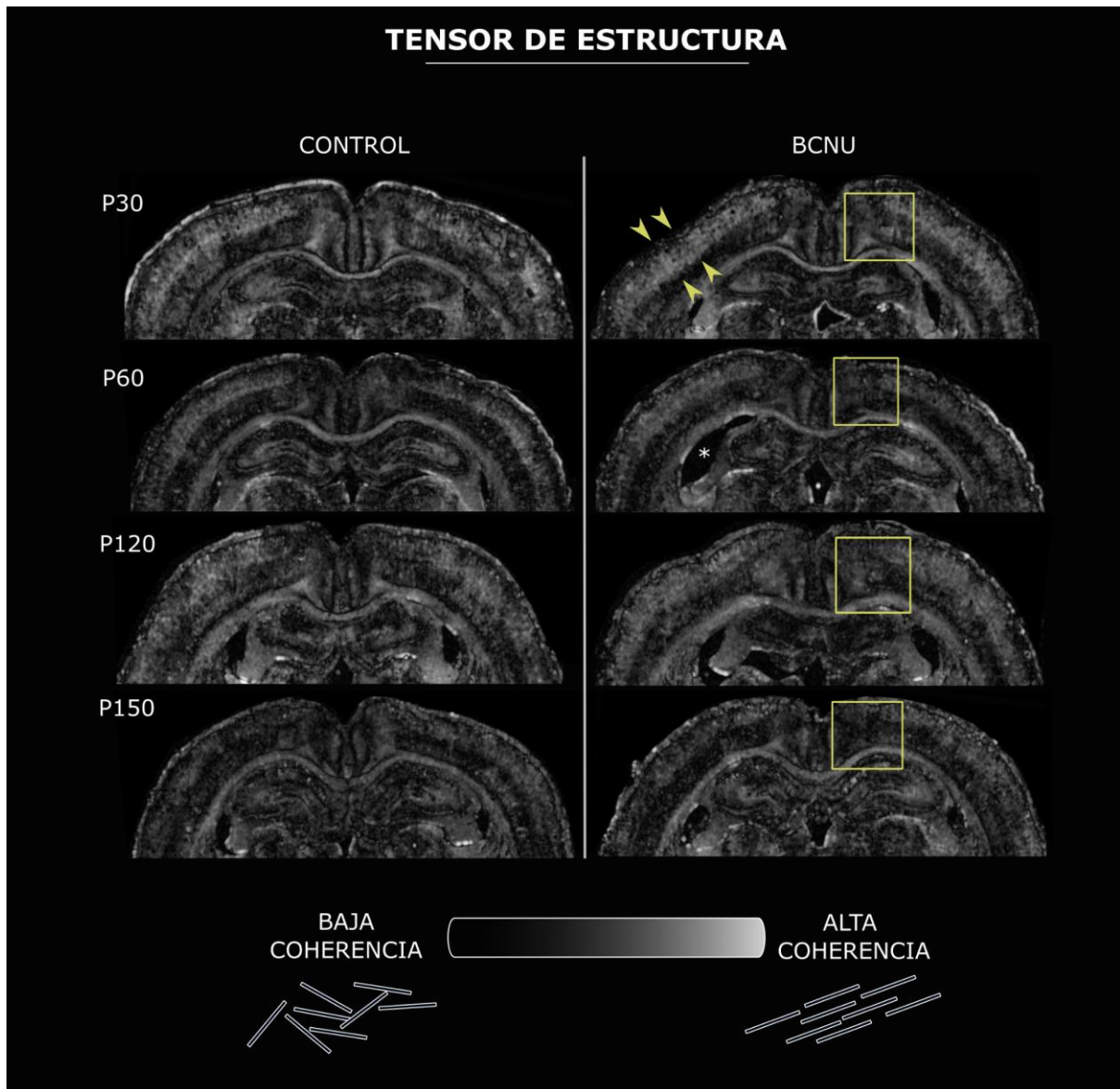


Figura 16. Mapas de coherencia derivados del tensor de estructura. Cortes coronales a nivel del hipocampo dorsal obtenidos a través de tinciones de mielina procesadas con el tensor de estructura. Los animales BCNU (panel derecho; cuadros amarillos) muestran alteraciones en la coherencia, con una tendencia hacia la pérdida de esta (indicada por la escala en tonos grises claros). El asterisco resalta el notable alargamiento del ventrículo. En particular, en P30 se observan cambios drásticos en la coherencia en la corteza somatosensorial abarcando las seis capas corticales (señalado por flechas amarillas).

8. DISCUSIÓN

Cuando abordamos el tema de las displasias corticales focales (DCF), nos enfrentamos a tres puntos centrales que representan grandes retos en el ámbito clínico. En primer lugar, existe un vacío en la comprensión y entendimiento de la fisiopatología subyacente y las causas que desencadenan este tipo de malformación. Aunque en años recientes se ha planteado la hipótesis de que una hiperexcitabilidad en la vía mTOR podría desempeñar un papel en el desarrollo de las DCF (Lee et al., 2022; Schick et al., 2007) esta teoría sigue aún en fase de investigación. En segundo lugar, nos encontramos ante la cuestión de la farmacoresistencia, ya que aproximadamente el 40% de los individuos con DCF presentan una respuesta inadecuada a los tratamientos farmacológicos, lo cual tiene un impacto negativo en su calidad de vida (Blümcke et al., 2010; Guerrini et al., 2015). Esto nos lleva al último desafío, que es la identificación de las lesiones mediante imagenología por resonancia magnética. Desafortunadamente, entre el 16% y 43% de los individuos presentan imágenes de resonancia magnética sin hallazgos patológicos donde la lesión es demasiado sutil y heterogénea que pasa desapercibida en estudios clínicos (Bernasconi et al., 2011; Spitzer et al., 2022). Esta problemática adquiere gran relevancia puesto que es crucial la localización de la lesión para ser candidato a intervención quirúrgica y remover el tejido displásico, que hasta el momento sigue siendo el único enfoque para lograr una vida libre de crisis epilépticas. En este proyecto demostramos que el uso de métodos avanzados para analizar las IRMd como es el MRDS, puede detectar espacialmente las anomalías de la microestructura cortical que son ocasionados por la DCF en un modelo animal.

En estudios previos, se han empleado diversas herramientas de neuroimagen con el propósito de hacer evidentes estas lesiones. Que van desde el uso de secuencias MPRAGE y FLAIR (Kabat & Król, 2012), hasta el desarrollo y aplicación de métodos computacionales diseñados para crear diversos contrastes y discernir detalles anatómicos en las imágenes (Bernasconi et al., 2001; Bonilha et al., 2006). Incluso, se ha incorporado el uso de la inteligencia artificial para la detección de DCF (Bastiani et al., 2016; Gill et al., 2021). No obstante, todas estas aproximaciones comparten un aspecto en común: basan sus análisis en las imágenes anatómicas. Si bien han resultado efectivas para un buen porcentaje de los diagnósticos de DCF, resultan insuficientes para la evaluación de la microestructura. Cabe recordar que la DCF está caracterizada por anomalías de tipo microscópicas que las imágenes estructurales pierden de vista. Por esto, resulta relevante explorar otras alternativas de neuroimagen que sean capaz de responder preguntas a nivel microscópico, como las que se presentan en este proyecto.

La resonancia magnética sensible a difusión (IRMd) resulta particularmente atractiva en este contexto debido a su capacidad de explorar las propiedades

microestructurales de los tejidos a través del movimiento de las moléculas de agua. Aunque es cierto que la IRMd ha sido predominantemente empleada en el estudio de la sustancia blanca, gracias a la coherencia y dirección preferente de las fibras mielinizadas, su potencial se extiende hacia tejidos mucho más complejos, como es el caso de la sustancia gris.

Los avances en el desarrollo de sistema de gradientes, preprocesamientos más sofisticados y secuencias más eficientes han permitido la aplicación de IRMd en la corteza para el estudio de la sustancia gris. Se ha demostrado que la IRMd puede identificar diferencias microestructurales entre diferentes áreas corticales (por ejemplo, entre la corteza somatosensorial y motora) (Ganepola et al., 2018). Además, más allá de las áreas corticales, se ha logrado discriminar entre las capas corticales debido a sus características microestructurales únicas (Leuze et al., 2014). Los primeros estudios que emplearon IRMd en DCF se enfocaron en la sustancia blanca adyacente a la lesión, donde se observó que un aumento en la señal FLAIR viene acompañada de una disminución en los valores de FA (Gentile et al., 2016; Gross et al., 2005), así como patrones anormales de la sustancia blanca extendiéndose más allá de la lesión (Fonseca et al., 2012; Urquia-Osorio et al., 2022). Sin embargo, vimos en este estudio que el tensor de difusión es insuficiente para caracterizar la corteza cerebral, como vemos en la Figura 9, tanto FA como MD no mostraron diferencias significativas entre animales controles y experimentales (BCNU).

Posteriormente, en respuesta a las limitaciones del tensor de difusión, la implementación de nuevos y más sofisticados modelos para comprender el tejido subyacente en pacientes con sospecha de displasia cortical se volvió relevante. Modelos biofísicos como NODDI (Neurite Orientation Dispersion and Density Imaging) han revelado cambios significativos en la fracción de volumen intracelular (ICVF) en áreas lesionadas (Lorio et al., 2020; Winston et al., 2014). Métodos novedosos como el B-tensor han demostrado diferenciación entre la sustancia blanca profunda anormal que subyace la sustancia gris a partir de los mapas de FA μ m, mejorando la delimitación de la lesión para la planificación quirúrgica (Lampinen et al., 2020).

Modelos biofísicos que infieren compartimentos como el tamaño del soma y la densidad neuronal (SANDI) (Palombo et al., 2020) o tomando en cuenta el intercambio entre membranas de los procesos neuronales (NEXI) (Jelescu et al., 2022) representan una opción interesante para estudiar a las DCF. Sin embargo, estos modelos sofisticados de IRMd tanto para analizar la sustancia gris y la sustancia blanca, no extraen información acerca de las orientaciones de las poblaciones de fibras, también llamados *fixels*. Si bien MRDS es una representación de la señal y no un modelo biofísico (Novikov et al., 2018), ha mostrado previamente que puede diferenciar anomalías entre fibras que van de manera radial (paralela) y tangencial (perpendicular) a la corteza en animales BCNU (Villaseñor et al., 2023). En el presente estudio longitudinal, nuestros resultados que muestran una disminución en FA_{par} y FA_{perp} (Figura 10) respaldan que, efectivamente, una desorganización en

el arreglo de fibras de la corteza está siendo afectada en los animales con displasia cortical inducida por BCNU, especialmente a la edad de P30.

Dado que la realización de estudios longitudinales clínicos en humanos representa un desafío considerable, los modelos animales se presentan como una oportunidad para caracterizar y explorar de manera longitudinal las DCF. Un ejemplo es la exposición in útero al acetato de metilazoximetanol (MAM), que induce rápidamente la pérdida de neuronas en la fase de replicación, originando anomalías en la migración neuronal, heterotopías e hiperexcitabilidad en circuitos neuronales, semejantes a la displasia cortical en humanos (Battaglia & Bassanini, 2006; Nguyen & Bordey, 2022). Considerando la vía mTOR como fundamento, la electroporación in útero ha permitido replicar las DCF tipo II de manera localizada al manipular la función (ya sea de pérdida o ganancia) genética de mTORC1 (LoTurco et al., 2009; Nguyen & Bordey, 2022).

No obstante, estos ejemplos de modelos animales, pese a su contribución al entendimiento de las DCF, presentan altas tasas de mortalidad. Las ventajas de utilizar el modelo de BCNU, es que induce alteraciones corticales también similares a las vistas en humanos con DCF tipo II, como la deslaminación cortical y las heterotopías neuronales (Benardete & Kriegstein, 2002; Moroni, Cipelletti, et al., 2011; Nguyen & Bordey, 2022). Mismas lesiones que replicamos en nuestros experimentos (Figuras 11, 12 y 13), a excepción de las neuronas en forma de globo. Además, se le atribuye al modelo que los animales tienen ausencia de crisis espontáneas y la tasa de mortalidad es prácticamente nula, resultando idóneo para la caracterización microestructural con IRM_d. En este estudio longitudinal no se encontraron cambios relevantes a lo largo del tiempo, lo que podría estar sugiriendo que la expresión de la displasia cortical puede ser más sensible a edades tempranas y que al pasar un momento crítico en el desarrollo, los animales se desarrollan relativamente normal en comparación con los controles. Más análisis se necesitan para entender porque P30 es un momento crítico donde la curva de los cambios entre grupos es significativa tanto en la difusividad como en la histología.

Por otro lado, los modelos animales facilitan la validación histológica, lo cual es un desafío en estudios humanos dada la limitación del acceso a tejido biológico tras la adquisición de imágenes de resonancia magnética. La relación entre propiedades microestructurales derivadas de la señal de IRM_d y el tejido biológico es esencial para su interpretación adecuada. Interesantemente, las tinciones de mielina con MBP mostraron que no solamente la cito-arquitectura está siendo afectada en la displasia cortical, sino que la mielo-arquitectura también. Sin duda esto toma relevancia en nuestro estudio utilizando IRM_d, que a pesar de que las anomalías en la mielina fueron heterogéneas entre los animales, hubo una ocurrencia alrededor de las mismas regiones corticales (figura 10) donde el multi-tensor logra discriminar fibras radiales y tangenciales en la corteza que se alinean con las anomalías histológicas vistas en las tinciones de mielina de la figura 14. Esta correspondencia permite inferir que, a pesar de la complejidad cortical, hay organización en

poblaciones de fibras de mielina sensibles a IRMd, con potencial para detectar DCF en humanos.

No obstante, este proyecto cuenta con algunas las limitaciones importantes:

- i. La reproducibilidad del modelo animal. Si bien está documentado que la inyección de BCNU en E15 produce una interrupción en la proliferación y migración neuronal (Benardete & Kriegstein, 2002; Yamaguchi et al., 2010) las anomalías pueden ser de tipo heterogéneo entre las camadas. Estudios previos han reportado el hallazgo de células en globo en tinciones de Nissl e hipoplasia del cuerpo calloso en imágenes T2 (Inverardi et al., 2013; Moroni, Cipelletti, et al., 2011, 2011), mientras que en nuestro modelo a la misma dosis de 20 kg/mg de carmustina, ninguno de nuestros animales manifestó dichas características. Incluso, se probaron dosis más altas (25 y 30 kg/mg) para evaluar la respuesta al fármaco y vimos que la gran mayoría de las crías no sobreviven. La heterogeneidad de los animales lo observamos tanto en las imágenes anatómicas T2, que mostraron atrofia de los hipocampos a diferentes edades y en diferente grado de severidad (figura 8). Al momento de observar las diferentes tinciones por inmunofluorescencia, vimos que la deslaminación no se presenta en ambos hemisferios y que difiere entre sujetos en un mismo punto temporal, especialmente esto fue notorio en las tinciones con NeuN (Figuras 11 y 12).
- ii. Como la gran mayoría de los métodos en IRMd tienen aplicaciones directas en la sustancia blanca, MRDS no es la excepción. Mientras que MRDS ha mostrado resultados robustos en el análisis en lugares donde existen entre cruce de fibras en la sustancia blanca (Coronado-Leija et al., 2017), su robustez y eficacia no ha sido comprobada en tejidos complejos como es la sustancia gris.
- iii. La correlación directa entre las IRMd con la histología está limitada por diferentes factores. Primero, la dimensionalidad de las imágenes de difusión está adquiridas en 3D, en el plano tienen alta resolución (0.175) pero el ancho de cada rebanada es de 1mm, lo cual introduce volumen parcial en las métricas de DTI y MRDS. Mientras que la adquisición de las imágenes histológicas está en 2D, el grosor de cada rebanada es de apenas 20 μm y no permite visualizar la dimensionalidad de las fibras que entran a la corteza en dirección anteroposterior. Por último, en este estudio se presenta un número reducido de

animales que fueron sometidos a histología, lo cual no soporta la comparación uno a uno con las métricas de difusión.

En general, nuestro estudio concluye que las DCF son difíciles de detectar y caracterizar, incluso en un modelo animal de BCNU. Sin embargo, hemos demostrado que la resonancia magnética sensible a difusión es una gran alternativa para identificar áreas corticales con una mielo-arquitectura anormal o aberrante causada por la misma displasia cortical, especialmente en edades tempranas. Además, la aplicación de métodos avanzados como MRDS, capaces de separar poblaciones de fibras de manera independiente, son adecuados para este tipo de aplicación.

Este avance abre un horizonte prometedor que es la evaluación futura de la aplicabilidad de MRDS en datos de pacientes con DCF.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, A. L., Lee, J. E., Lazar, M., & Field, A. S. (2007). Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics*, 4(3), 316-329. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.05.011>
- Andersson, J. L. R., Skare, S., & Ashburner, J. (2003). How to correct susceptibility distortions in spin-echo echo-planar images: Application to diffusion tensor imaging. *NeuroImage*, 20(2), 870–888. [https://doi.org/10.1016/S1053-8119\(03\)00336-7](https://doi.org/10.1016/S1053-8119(03)00336-7)(Andersson et al., 2003)
- Ayala, R., Shu, T., & Tsai, L.-H. (2007). Trekking across the Brain: The Journey of Neuronal Migration. *Cell*, 128(1), 29-43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.021>
- Baillarger, J. G. F. (1840). *Recherches sur la structure de la couche corticale des circonvolutions du cerveau*. J.-B. Baillière.
- Barkovich, A. J., Guerrini, R., Kuzniecky, R. I., Jackson, G. D., & Dobyns, W. B. (2012). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: Update 2012. *Brain: A Journal of Neurology*, 135(Pt 5), 1348–1369. <https://doi.org/10.1093/brain/aws019>
- Barkovich, A. J., Kuzniecky, R. I., & Dobyns, W. B. (2001). Radiologic classification of malformations of cortical development. *Current Opinion in Neurology*, 14(2), 145-149. <https://doi.org/10.1097/00019052-200104000-00002>
- Basser, P. J., Mattiello, J., & LeBihan, D. (1994). MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophysical Journal*, 66(1), 259–267. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80775-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80775-1)
- Barres, B. A. (2008). The mystery and magic of glia: A perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 60(3), 430-440. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.013>
- Bastiani, M., Oros-Peusquens, A.-M., Seehaus, A., Brenner, D., Möllenhoff, K., Celik, A., Felder, J., Bratzke, H., Shah, N. J., Galuske, R., Goebel, R., & Roebroeck, A. (2016). Automatic Segmentation of Human Cortical Layer-Complexes and Architectural Areas Using Ex vivo Diffusion MRI and Its Validation. *Frontiers in Neuroscience*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2016.00487>

- Bates, D., Bolker, B., Maechler, M., & Walker, S. (2015). *Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4* [Software].
- Battaglia, G., & Bassanini, S. (2006). CHAPTER 23—MAM and Other “Lesion” Models of Developmental Epilepsy. En A. Pitkänen, P. A. Schwartzkroin, & S. L.
- Beaulieu, C. (2002). The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system— A technical review. *NMR in Biomedicine*, 15(7-8), 435-455. <https://doi.org/10.1002/nbm.782>
- Benardete, E. A., & Kriegstein, A. R. (2002). Increased Excitability and Decreased Sensitivity to GABA in an Animal Model of Dysplastic Cortex. *Epilepsia*, 43(9), 970–982. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.40901.x>
- Bernasconi, A., Antel, S. B., Collins, D. L., Bernasconi, N., Olivier, A., Dubeau, F., Pike, G. B., Andermann, F., & Arnold, D. L. (2001). Texture analysis and morphological processing of magnetic resonance imaging assist detection of focal cortical dysplasia in extra-temporal partial epilepsy. *Annals of Neurology*, 49(6), 770–775. <https://doi.org/10.1002/ana.1013>
- Bianchi, L. M. (2018). *Developmental Neurobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Blümcke, I., Thom, yMaria, Aronica, zEleonora, Armstrong, xDawna D., Vinters, H. V., Palmini, A., Jacques, T. S., Avanzini, yyGiuliano, James Barkovich, zzA, Battaglia, xxGiorgio, Becker, A., Cepeda, C., Cendes, F., Colombo, yyyNadia, Crino, zzzPeter, Helen Cross, xxxJ, Delalande, O., Dubeau, F., Duncan, J., ... Spreafico, yyRoberto. (2010). The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: A consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission 1. *International League Against Epilepsy Epilepsia*, 52(1), 158–174. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02777.x>
- Bonilha, L., Montenegro, M. A., Rorden, C., Castellano, G., Guerreiro, M. M., Cendes, F., & Li, L. M. (2006). Voxel-based Morphometry Reveals Excess Gray Matter Concentration in Patients with Focal Cortical Dysplasia. *Epilepsia*, 47(5), 908–915. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00548.x>
- Brodmann, K. (1909). *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Barth.
- Brown, M., Keynes, R., & Lumsden, A. (2001). *The developing brain*. Oxford University Press.

- Buchsbaum, I. Y., & Cappello, S. (2019). Neuronal migration in the CNS during development and disease: Insights from in vivo and in vitro models. *Development (Cambridge)*, 146(1). <https://doi.org/10.1242/dev.163766>
- Budday, S., Steinmann, P., & Kuhl, E. (2015). Physical biology of human brain development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2015.00257>
- Caan, M. W. A., Khedoe, H. G., Poot, D. H. J., den Dekker, A. J., Olabbarriaga, S. D., Grimbergen, K. A., van Vliet, L. J., & Vos, F. M. (2010). Estimation of Diffusion Properties in Crossing Fiber Bundles. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 29(8), 1504-1515. <https://doi.org/10.1109/TMI.2010.2049577>
- Chenevert, T. L. (2010). Principles of Diffusion-Weighted Imaging (DW-MRI) as Applied to Body Imaging. En D. M. Koh & H. C. Thoeny (Eds.), *Diffusion-Weighted MR Imaging* (pp. 3-17). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-78576-7_1
- Coronado-Leija, R., Ramirez-Manzanares, A., & Marroquin, J. L. (2017). Estimation of individual axon bundle properties by a Multi-Resolution Discrete-Search method. *Medical Image Analysis*, 42, 26-43. <https://doi.org/10.1016/j.media.2017.06.008>
- Crino, P. B. (2015). Focal cortical dysplasia. *Seminars in Neurology*, 35(3), 201–208. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1552617>
- Di Donato, N., Chiari, S., Mirzaa, G. M., Aldinger, K., Parrini, E., Olds, C., Barkovich, A. J., Guerrini, R., & Dobyns, W. B. (2017). Lissencephaly: Expanded imaging and clinical classification. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 173(6), 1473–1488. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38245>
- Desikan, R. S., & Barkovich, A. J. (2016). Malformations of Cortical Development. *Annals of neurology*, 80(6), 797-810. <https://doi.org/10.1002/ana.24793>
- Einstein, A. (1905). Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen Der Physik*, 322(8), 549-560. <https://doi.org/10.1002/andp.19053220806>
- Filatova, O. G., van Vliet, L. J., Schouten, A. C., Kwakkel, G., van der Helm, F. C. T., & Vos, F. M. (2018). Comparison of Multi-Tensor Diffusion Models' Performance for White Matter Integrity Estimation in Chronic Stroke. *Frontiers in Neuroscience*, 12.

- Fonseca, V. de C., Yasuda, C. L., Tedeschi, G. G., Betting, L. E., & Cendes, F. (2012). White Matter Abnormalities in Patients with Focal Cortical Dysplasia Revealed by Diffusion Tensor Imaging Analysis in a Voxelwise Approach. *Frontiers in Neurology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00121>
- Gálvez, M., Rojas, G., Cordovez, J., Guevara, D. L., Campos, P., & López, S. (2009). Displasias corticales as cause of epilepsy and his epresentaciones in the images. *Revista Chilena de Radiología*, 15, 25–38.
- Ganepola, T., Nagy, Z., Ghosh, A., Papadopoulo, T., Alexander, D. C., & Sereno, M. I. (2018). Using diffusion MRI to discriminate areas of cortical grey matter. *Neuroimage*, 182, 456-468. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.12.046>
- Garner, G. L., Streetman, D. R., Fricker, J. G., Bui, N. E., Yang, C., Patel, N. A., Brown, N. J., Shahrestani, S., Rangel, I. C., Singh, R., & Gendreau, J. L. (2022). Focal cortical dysplasia as a cause of epilepsy: The current evidence of associated genes and future therapeutic treatments. *Interdisciplinary Neurosurgery*, 30, 101635. <https://doi.org/10.1016/j.inat.2022.101635>
- Gentile, A., Pfister, P. M., Serra, M. M., & Yañez, P. (2016). *Focal cortical dysplasia: Findings in diffusion tensor imaging*. 5
- Gill, R. S., Lee, H.-M., Caldairou, B., Hong, S.-J., Barba, C., Deleo, F., D'Incerti, L., Coelho, V. C. M., Lenge, M., Semmelroch, M., Schrader, D. V., Bartolomei, F., Guye, M., Schulze-Bonhage, A., Urbach, H., Cho, K. H., Cendes, F., Guerrini, R., Jackson, G., ... Bernasconi, A. (2021). Multicenter Validation of a Deep Learning Detection Algorithm for Focal Cortical Dysplasia. *Neurology*, 97(16), e1571–e1582. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000012698>
- Gross, D. W., Bastos, A., & Beaulieu, C. (2005). Diffusion Tensor Imaging Abnormalities in Focal Cortical Dysplasia. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques*, 32(4), 477-482. <https://doi.org/10.1017/S0317167100004479>
- Grow, W. A. (2018). Chapter 32—The Cerebral Cortex. En D. E. Haines & G. A. Mihailoff (Eds.), *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications (Fifth Edition)* (pp. 468-479.e1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39632-5.00032-3>
- Guerrini, R., & Dobyns, W. B. (2014). Malformations of cortical development: Clinical features and genetic causes. *The Lancet. Neurology*, 13(7), 710-726.

[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70040-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70040-7)

- Guerrini, R., Duchowny, M., Jayakar, P., Krsek, P., Kahane, P., Tassi, L., Melani, F., Polster, T., Andre, V. M., Cepeda, C., Krueger, D. A., Cross, J. H., Spreafico, R., Cosottini, M., Gotman, J., Chassoux, F., Ryvlin, P., Bartolomei, F., Bernasconi, A., ... Blumcke, I. (2015). Diagnostic methods and treatment options for focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, *56*(11), 1669–1686. <https://doi.org/10.1111/epi.13200>
- Hahn, E. L. (1950). Spin Echoes. *Physical Review*, *80*(4), 580-594. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.80.58>
- Inverardi, F., Chikhladze, M., Donzelli, A., Moroni, R. F., Regondi, M. C., Pennacchio, P., Zucca, I., Corradini, I., Braidà, D., Sala, M., Franceschetti, S., & Frassoni, C. (2013). Cytoarchitectural, behavioural and neurophysiological dysfunctions in the BCNU-treated rat model of cortical dysplasia. *European Journal of Neuroscience*, *37*(1), 150-162. <https://doi.org/10.1111/ejn.12032>
- Jelescu, I. O., de Skowronski, A., Geffroy, F., Palombo, M., & Novikov, D. S. (2022). Neurite Exchange Imaging (NEXI): A minimal model of diffusion in gray matter with inter-compartment water exchange. *NeuroImage*, *256*, 119277. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119277>
- Jelescu, I. O., Palombo, M., Bagnato, F., & Schilling, K. G. (2020). Challenges for biophysical modeling of microstructure. *Journal of Neuroscience Methods*, *344*, 108861. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108861>
- Jespersen, S. (2018). White matter biomarkers from diffusion MRI. *Journal of Magnetic Resonance*, *291*, 127-140. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2018.03.001>
- Jones, E. G., & Peters, A. (2012). *Cerebral Cortex: Comparative Structure and Evolution of Cerebral Cortex, Part II*. Springer US.
- Kabat, J., & Król, P. (2012). Focal cortical dysplasia—Review. *Polish Journal of Radiology*, *77*(2), 35–43. <https://doi.org/10.12659/pjr.882968>
- Kriegstein, A. R., & Noctor, S. C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends in Neurosciences*, *27*(7), 392-399. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.001>
- Lampinen, B., Zampeli, A., Björkman-Burtscher, I. M., Szczepankiewicz, F., Källén, K., Compagno Strandberg, M., & Nilsson, M. (2020). Tensor-valued diffusion MRI differentiates cortex and white matter in malformations of cortical development associated with epilepsy. *Epilepsia*, *61*(8), 1701-1713.

<https://doi.org/10.1111/epi.16605>

- Le Bihan, D., Mangin, J.-F., Poupon, C., Clark, C. A., Pappata, S., Molko, N., & Chabriat, H. (2001). Diffusion tensor imaging: Concepts and applications. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 13(4), 534-546. <https://doi.org/10.1002/jmri.1076>
- Lee, W. S., Baldassari, S., Stephenson, S. E. M., Lockhart, P. J., Baulac, S., & Leventer, R. J. (2022). Cortical Dysplasia and the mTOR Pathway: How the Study of Human Brain Tissue Has Led to Insights into Epileptogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1344. <https://doi.org/10.3390/ijms23031344>
- Leuze, C. W. U., Anwander, A., Bazin, P.-L., Dhital, B., Stüber, C., Reimann, K., Geyer, S., & Turner, R. (2014). Layer-specific intracortical connectivity revealed with diffusion MRI. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 24(2), 328-339. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs311>
- Lerch, J. P., Carroll, J. B., Dorr, A., Spring, S., Evans, A. C., Hayden, M. R., Sled, J. G., & Henkelman, R. M. (2008). Cortical thickness measured from MRI in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *NeuroImage*, 41(2), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.02.019>
- Ljungberg, M. C., Sunnen, C. N., Lugo, J. N., Anderson, A. E., & D'Arcangelo, G. (2009). Rapamycin suppresses seizures and neuronal hypertrophy in a mouse model of cortical dysplasia. *Disease Models & Mechanisms*, 2(7-8), 389-398. <https://doi.org/10.1242/dmm.002386>
- Lorente de Nó, R. (1938). *Architectonics and structure of the cerebral cortex*.
- Lorio, S., Adler, S., Gunny, R., D'Arco, F., Kaden, E., Wagstyl, K., Jacques, T. S., Clark, C. A., Cross, J. H., Baldeweg, T., & Carmichael, D. W. (2020). MRI profiling of focal cortical dysplasia using multi-compartment diffusion models. *Epilepsia*, 61(3), 433–444. <https://doi.org/10.1111/epi.16451>
- LoTurco, J., Manent, J.-B., & Sidiqi, F. (2009). New and Improved Tools for In Utero Electroporation Studies of Developing Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, 19(Suppl 1), i120-i125. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp033>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.061>

- Moroni, R. F., Zucca, I., Inverardi, F., Mastropietro, A., Regondi, M. C., Spreafico, R., & Frassoni, C. (2011). In vivo detection of cortical abnormalities in BCNU-treated rats, model of cortical dysplasia, using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroscience*, *192*, 564-571. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.009>
- Moseley, M. E., Cohen, Y., Kucharczyk, J., Mintorovitch, J., Asgari, H. S., Wendland, M. F., Tsuruda, J., & Norman, D. (1990). Diffusion-weighted MR imaging of anisotropic water diffusion in cat central nervous system. *Radiology*, *176*(2), 439-445. <https://doi.org/10.1148/radiology.176.2.2367658>
- Nguyen, L. H., & Bordey, A. (2022). Current Review in Basic Science: Animal Models of Focal Cortical Dysplasia and Epilepsy. *Epilepsy Currents*, *22*(4), 234-240. <https://doi.org/10.1177/15357597221098230>
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience*, *7*(2), 136–144. <https://doi.org/10.1038/nn1172>
- Novikov, D. S., Kiselev, V. G., & Jespersen, S. N. (2018). On modeling. *Magnetic Resonance in Medicine*, *79*(6), 3172-3193. <https://doi.org/10.1002/mrm.27101>
- Palmini, A., Najm, I., Avanzini, G., Babb, T., Guerrini, R., Foldvary-Schaefer, N., Jackson, G., Lüders, H. O., Prayson, R., Spreafico, R., & Vinters, H. V. (2004). Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*, *62*(6 Suppl 3), S2-8. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000114507.30388.7e>
- Palombo, M., Ianus, A., Guerreri, M., Nunes, D., Alexander, D. C., Shemesh, N., & Zhang, H. (2020). SANDI: A compartment-based model for non-invasive apparent soma and neurite imaging by diffusion MRI. *NeuroImage*, *215*, 116835. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.116835>
- Pasquier, B., Péoc'H, M., Fabre-Bocquentin, B., Bensaadi, L., Pasquier, D., Hoffmann, D., Kahane, P., Tassi, L., Le Bas, J.-F., & Benabid, A. L. (2002). Surgical pathology of drug-resistant partial epilepsy. A 10-year-experience with a series of 327 consecutive resections. *Epileptic Disorders: International Epilepsy Journal with Videotape*, *4*(2), 99-119.
- Pang, T., Atefy, R., & Sheen, V. (2008). Malformations of cortical development. *Neurologist*, *14*(3), 181–191. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e31816606b9>
- Püspöki, Z., Storath, M., Sage, D., & Unser, M. (2016). Transforms and Operators for

Directional Bioimage Analysis: A Survey. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 219, 69–93. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28549-8_3

R Core Team. (2023). *R: A language and environment for statistical computing*. [Software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

Russel, L. (2023). *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means*. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>

Schick, V., Majores, M., Engels, G., Hartmann, W., Elger, C. E., Schramm, J., Schoch, S., & Becker, A. J. (2007). Differential Pi3K-pathway Activation in Cortical Tubers and Focal Cortical Dysplasias with Balloon Cells. *Brain Pathology*, 17(2), 165-173. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00059.x>

Severino, M., Geraldo, A. F., Utz, N., Tortora, D., Pogledic, I., Klonowski, W., Triulzi, F., Arrigoni, F., Mankad, K., Leventer, R. J., Mancini, G. M. S., Barkovich, J. A., Lequin, M. H., & Rossi, A. (2020). Definitions and classification of malformations of cortical development: Practical guidelines. *Brain*, 143(10), 2874–2894. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa174>

Spitzer, H., Ripart, M., Whitaker, K., D'Arco, F., Mankad, K., Chen, A. A., Napolitano, A., De Palma, L., De Benedictis, A., Foldes, S., Humphreys, Z., Zhang, K., Hu, W., Mo, J., Likeman, M., Davies, S., Güttler, C., Lenge, M., Cohen, N. T., ... Wagstyl, K. (2022). Interpretable surface-based detection of focal cortical dysplasias: A Multi-centre Epilepsy Lesion Detection study. *Brain*, 145(11), 3859-3871. <https://doi.org/10.1093/brain/awac224>

Stejskal, E. O., & Tanner, J. E. (1965). Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *The Journal of Chemical Physics*, 42(1), 288-292. <https://doi.org/10.1063/1.1695690>

Tassi, L., Colombo, N., Garbelli, R., Francione, S., Lo Russo, G., Mai, R., Cardinale, F., Cossu, M., Ferrario, A., Galli, C., Bramerio, M., Citterio, A., & Spreafico, R. (2002). Focal cortical dysplasia: Neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain: A Journal of Neurology*, 125(Pt 8), 1719–1732. <https://doi.org/10.1093/brain/awf175>

Tournier, J.-D., Calamante, F., Gadian, D. G., & Connelly, A. (2004). Direct estimation of the fiber orientation density function from diffusion-weighted MRI data using spherical deconvolution. *NeuroImage*, 23(3), 1176-1185. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.07.037>

Urbach, H., Kellner, E., Kremers, N., Blümcke, I., & Demerath, T. (2022). MRI of focal cortical dysplasia. *Neuroradiology*, 64(3), 443-452. <https://doi.org/10.1007/s00234-021-02865-x>

<https://doi.org/10.1111/epi.17333>

Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Leodardi, G., Armstrong, D. A., Vinters, H. V., Palmini, A., Jacques, T. S., Avanzini, G., Giordano, G., Barkovich, J. A., Battaglia, G., Becker, A., Cepeda, C., Cendes, F., Colombo, G., Crino, P., Cross, H. E., Delalande, O., Dubeau, F., Duncan, J., ... Spreafico, R. (2010). The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: A consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission 1. *International League Against Epilepsy Epilepsia*, 52(1), 158–174. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02777.x>

Fonseca, V. de C., Yasuda, C. L., Tedeschi, G. G., Betting, L. E., & Cendes, F. (2012). White Matter Abnormalities in Patients with Focal Cortical Dysplasia Revealed by Diffusion Tensor Imaging Analysis in a Voxelwise Approach. *Frontiers in Neurology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00121>

Najm, I., Lal, D., Alonso Vanegas, M., Cendes, F., Lopes-Cendes, I., Palmini, A., Paglioli, E., Sarnat, H. B., Walsh, C. A., Wiebe, S., Aronica, E., Baulac, S., Coras, R., Kobow, K., Cross, J. H., Garbelli, R., Holthausen, H., Rössler, K., Thom, M., ... Blümcke, I. (2022). The ILAE consensus classification of focal cortical dysplasia: An update proposed by an ad hoc task force of the ILAE diagnostic methods commission. *Epilepsia*, 63(8), 1899–1919. <https://doi.org/10.1111/epi.17301>

Urquia-Osorio, H., Pimentel-Silva, L. R., Rezende, T. J. R., Almendares-Bonilla, E., Yasuda, C. L., Concha, L., & Cendes, F. (2022). Superficial and deep white matter diffusion abnormalities in focal epilepsies. *Epilepsia*, 63(9), 2312–2324. <https://doi.org/10.1111/epi.17333>

van Geuns, R.-J. M., Wielopolski, P. A., de Bruin, H. G., Rensing, B. J., van Ooijen, P. M. A., Hulshoff, M., Oudkerk, M., & de Feyter, P. J. (1999). Basic principles of magnetic resonance imaging. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 42(2), 149-156. [https://doi.org/10.1016/S0033-0620\(99\)70014-9](https://doi.org/10.1016/S0033-0620(99)70014-9)

Veraart, J., Novikov, D. S., Christiaens, D., Ades-aron, B., Sijbers, J., & Fieremans, E. (2016). Denoising of diffusion MRI using random matrix theory. *NeuroImage*, 142, 394–406. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.08.016>

Vidal, M., Félix, D., Guirado, N., Pérez, A., Asenjo, L. B., Ángel, G., & Bayarri, A.

- (2020). *Mapas de difusión anisotrópica. Fundamentos físicos y aplicaciones clínicas*.
- Villaseñor, P. J., Cortés-Servín, D., Pérez-Moriel, A., Aquiles, A., Luna-Munguía, H., Ramirez-Manzanares, A., Coronado-Leija, R., Larriva-Sahd, J., & Concha, L. (2023). Multi-tensor diffusion abnormalities of gray matter in an animal model of cortical dysplasia. *Frontiers in Neurology*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2023.1124282>
- Vogt, C., & Vogt, O. (1919). *Allgemeine Ergebnisse unserer Hirnforschung*. J.A. Barth.
- Wang, Z. I., Oh, S.-H., Lowe, M., Larvie, M., Ruggieri, P., Hill, V., Statsevych, V., Moon, D., Lee, J., Emch, T., Bena, J., Blümcke, I., Bingaman, W., Gonzalez-Martinez, J. A., Najm, I., & Jones, S. E. (2021). Radiological and Clinical Value of 7T MRI for Evaluating 3T-Visible Lesions in Pharmacoresistant Focal Epilepsies. *Frontiers in Neurology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2021.591586>
- Winston, G. P., Micallef, C., Symms, M. R., Alexander, D. C., Duncan, J. S., & Zhang, H. (2014). Advanced diffusion imaging sequences could aid assessing patients with focal cortical dysplasia and epilepsy. *Epilepsy Research*, 108(2), 336-339. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2013.11.004>
- Yamaguchi, T., Kanemitsu, H., Yamamoto, S., Komatsu, M., Uemura, H., Tamura, K., & Shirai, T. (2010). N,N'-Bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea (BCNU)-induced Apoptosis of Neural Progenitor Cells in the Developing Fetal Rat Brain. *Journal of Toxicologic Pathology*, 23(1), 25-30. <https://doi.org/10.1293/tox.23.25>
- Yushkevich, P. A., Piven, J., Hazlett, H. C., Smith, R. G., Ho, S., Gee, J. C., & Gerig, G. (2006). User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage*, 31(3), 1116–1128. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.01.015>