



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



**INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN**

Trabajo de Fin de Máster
“Máster en Neurociencias”

**Alteraciones de la migración neuronal y
epilepsia. Factores implicados, terapias
actuales y perspectivas de futuro**

Estefanía Sastre Eleno

Salamanca, junio 2009



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

Trabajo de Fin de Máster
“Máster en Neurociencias”

**Alteraciones de la migración neuronal y
epilepsia. Factores implicados, terapias
actuales y perspectivas de futuro**

Estefanía Sastre Eleno

Salamanca, junio de 2009



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

Alteraciones de la migración neuronal y epilepsia. Factores implicados, terapias actuales y perspectivas de futuro

TRABAJO REALIZADO POR

Estefanía Sastre Eleno

COMO TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

“MÁSTER DE NEUROCIENCIAS”

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Salamanca, junio de 2009

EL TUTOR

FDO.: JESÚS MARÍA GARCÍA BRIÑÓN

Jesús María García Briñón, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca, Investigador del Instituto de Neurociencias de Castilla y León y docente en el “Máster de Neurociencias”

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado **"Alteraciones de la migración neuronal y epilepsia. Factores implicados, terapias actuales y perspectivas de futuro"**, ha sido realizado por D^a Estefanía Sastre Eleno bajo mi tutela, y considero que reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Trabajo de Fin de Máster del “Máster de Neurociencias”.

Salamanca, Junio de 2009

Fdo.: Jesús María García Briñón

INDICE

1. MIGRACIÓN NEURONAL EN EL DESARROLLO DEL CÓRTEX CEREBRAL.....	7
1.1. Introducción.....	7
1.2. Modelos de migración neuronal.....	9
1.2.1. Migración radial.....	10
1.2.2. Migración tangencial.....	11
1.2.3. Migración ventrículo-dirigida.....	14
1.2.4. La etapa multipolar.....	15
1.3. Mecanismos celulares de la migración.....	17
1.3.1. Extensión delantera del borde.....	18
1.3.2. Nucleocinesis.....	19
1.4. Factores que permiten y regulan la traslocación nuclear y su implicación en alteraciones en la migración.....	20
1.4.1. Lis1.....	21
1.4.2. Dcx.....	22
1.4.3. Delk.....	24
1.4.4. Filamina.....	26
1.4.5. Cdk5 y p35/p39.....	26
1.4.6. Reelina.....	27
2. EPILEPSIA.....	28
2.2. Introducción.....	28
2.3. Causas.....	30
2.4. Focos encefálicos de epilepsia.....	31
2.3.1. Crisis parciales iniciales.....	32
2.3.1.1. Mecanismos que llevan a la disminución de la inhibición.....	32
2.3.1.1.1. Inhibición defectuosa de los receptores GABA-A y GABA-B.....	32
2.3.1.1.2. Memoria defectuosa del calcio intracelular.....	33
2.3.1.2. Mecanismos que llevan a un aumento de la excitación.....	33
2.3.1.2.1. Aumento de la activación de los receptores NMDA.....	34

2.3.1.2.2.	Aumento de la sincronía entre las neuronas debido a interacciones eléctricas.....	34
2.3.1.2.3.	Incremento de la sincronía y/o activación debido a redes colaterales recurrentes excitadoras.....	35
2.3.2.	Convulsiones iniciales generalizadas.....	35
3.	EPILEPSIA Y DEFICIENCIAS EN LA MIGRACIÓN NEURONAL	36
3.1.	Introducción.....	36
3.2.	Mecanismos tempranos de excitación neuronal.....	37
3.2.1.	Liberación de transmisor y migración neuronal.....	37
3.3.	Desórdenes de la migración neuronal.....	38
3.3.1.	Lisencefalia tipo I.....	39
3.3.2.	Lisencefalia tipo II o “cobblestone”.....	42
3.3.3.	Heterotopia periventricular.....	43
3.3.4.	Heterotopia en banda subcortical.....	44
3.3.5.	Polimicrogiria.....	45
4.	ABORDAJES EXPERIMENTALES Y POSIBILIDADES TERAPEÚTICAS...47	
4.1.	Introducción.....	47
4.2.	Terapias celulares para la epilepsia.....	49
4.3.	Terapias génicas.....	50
4.4.	Terapia con GABA.....	51
4.5.	Terapia con adenosina.....	52
4.6.	Terapia con galanina.....	53
4.7.	Terapia con neuropéptido Y.....	54
4.8.	Terapias génicas preventivas.....	55
4.8.1.	La reexpresión de doblecortina reduce la heterotopia subcortical en banda y el umbral de los ataques en un modelo animal con desórdenes en la migración neuronal.....	55
4.9.	Perspectivas y limitaciones.....	59
4.10.	Bibliografía.....	59

1. MIGRACIÓN NEURONAL EN EL DESARROLLO DEL CÓRTEX CEREBRAL

1.1. INTRODUCCIÓN

El córtex cerebral es la parte más extensa del cerebro de mamíferos conteniendo aproximadamente la mitad del número total de neuronas presentes en el cerebro. La observación microscópica de una sección coronal a través del córtex muestra que los somas neuronales se encuentran organizados en seis capas paralelas a la superficie pial que se denominan, desde la superficie hacia el interior desde capa I hasta capa VI. En las distintas láminas pueden observarse diferencias en la morfología y tamaño somáticos, distribución y morfología de los árboles dendríticos, así como variaciones notables de la densidad de los cuerpos celulares (*Parnavelas, 2002*).

Fundamentalmente pueden distinguirse dos grandes tipos neuronales, identificables básicamente en función de la morfología somática: neuronas piramidales y neuronas no-piramidales. Las neuronas piramidales, que constituyen aproximadamente el 75% de todas las neuronas del córtex, son las células de proyección; las cuales, envían sus axones a otras áreas del córtex y a otras partes distantes del cerebro. La mayor parte de ellas utilizan el aminoácido excitatorio glutamato como neurotransmisor. Las neuronas no-piramidales son interneuronas, esto es, participan en circuitos locales. La mayor parte de ellas son inhibitorias, usando principalmente como neurotransmisor el GABA. Se pueden distinguir numerosas subpoblaciones de estas interneuronas en función de la expresión de distintos neuropéptidos y/o proteínas ligantes de calcio, además de por las características morfológicas del soma y de sus dendritas así como por los patrones de ramificación axonal (*Parnavelas et al., 1989*).

El desarrollo del córtex cerebral tiene lugar a partir de la parte rostródorsal del tubo neural, llamada manto telencefálico (*Marín-Padilla, 1999*). La pared del manto está formada, inicialmente, por células germinales neuroepiteliales, cuya continua proliferación causa un abombamiento hacia el exterior de las paredes del manto para formar las vesículas cerebrales (*Parnavelas, 2002*). Las células neuroepiteliales próximas al revestimiento ventricular del tubo neural, la llamada zona ventricular (ZV), están destinadas a dar lugar a neuronas y a algunas células gliales del córtex. El alineamiento radial de las células neuroepiteliales impone un patrón radial en la histogénesis del manto. Así las neuronas postmitóticas tempranas migran fuera de la ZV hacia la superficie de las vesículas cerebrales (*Committee, 1970; Uylings et al., 1990*) para formar la capa plexiforme primordial o preplaca (PP).

Posteriormente, la capa plexiforme primordial, se divide en plexiforme superficial y profunda, por la llegada de células de la placa o plato cortical (PC) (*Nadarajah et al., 2003*). La capa plexiforme superficial da origen a la zona marginal superficial (ZM, capa I) y la profunda a la subplaca o subplato (SP, capa VI) (figura 1). La progresiva acumulación de neuronas migratorias dentro de la capa plexiforme primordial separa

progresivamente la capa I de la subplaca. Mientras que la capa I mantiene su estructura plexiforme, la subplaca sufre transformaciones estructurales durante la maduración de la placa cortical.

Durante el período de migración, cientos de millones de neuronas alcanzan la capa plexiforme primordial y se van colocando dentro de ella de dentro a afuera hasta que la placa cortical está formada y preparada para comenzar su maduración ascendente (estratificación ascendente) (Marín-Padilla, 1999).

Las capas II-VI del córtex se generan de dentro a afuera, siendo, las neuronas generadas más tempranamente las que residen en las capas más profundas, mientras que las células generadas con posterioridad, migran atravesando las capas ya existentes para formar las capas más superficiales (Berry and Rogers, 1965; Rakic, 1974). Consecuentemente, la ZM y la subplaca contienen las neuronas del córtex cerebral generadas más tempranamente. Las células de la capa I se diferencian en células de Cajal-Retzius y otros tipos neuronales (Frotscher, 1997; Meyer et al., 1999). La SP es separada de la ZV por la zona intermedia (ZI), una capa que eventualmente puede contener tractos axónicos aferentes y eferentes del córtex (futura sustancia blanca). Cuando el PC emerge, otra capa de células en proliferación aparece entre la ZV y la ZI, la llamada zona subventricular (ZSV). Esta capa contiene células generadas en la ZV, que fundamentalmente se diferenciarán a estirpes gliales (figura 1) (Levison et al., 1993; Parnavelas, 1999). Mientras la ZSV se extiende mucho al final del desarrollo prenatal e incluso en etapas postnatales, la ZV, acabará por desaparecer. (Parnavelas, 2002).

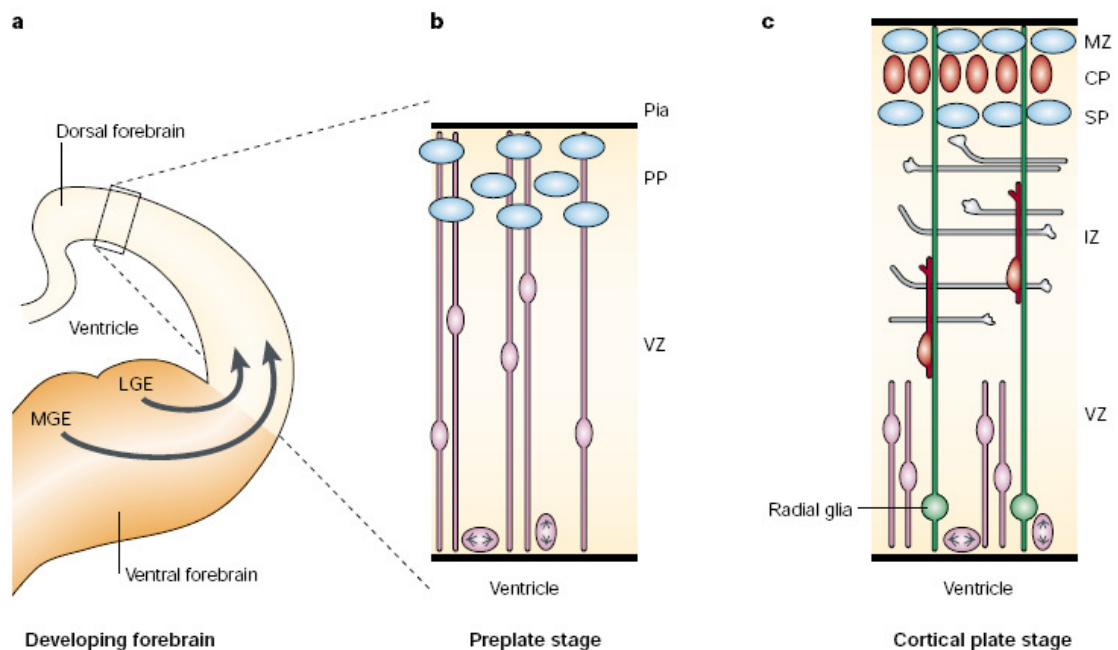


FIGURA 1. Desarrollo neocortical. a) Esquema de una sección del cerebro en desarrollo de un roedor. b, c) Ilustraciones de los diferentes estados del desarrollo neocortical. El cerebro anterior dorsal da lugar al córtex cerebral. La eminencia ganglionar lateral (LGE) y la eminencia ganglionar medial (MGE) del cerebro anterior ventral generan las neuronas de los ganglios basales y las interneuronas corticales; estas últimas, siguen rutas de migración

tangencial hasta el córtex. (a; flechas). En el cerebro anterior dorsal (a; área encuadrada) la migración neuronal comienza cuando la primera cohorte de neuronas postmitóticas se mueven fuera de la zona ventricular (VZ) para formar la preplaca (PP) (b). Las siguientes cohortes de neuronas (células piramidales), migran, ayudadas por la glía radial, a través de la zona intermedia (IZ) para dividir la PP en la zona marginal exterior (MZ) y la subplaca interior (SP) (c). PC, placa cortical.

1.2. MODELOS DE MIGRACIÓN

En los procesos de migración se pueden distinguir dos modalidades: la migración radial y la migración tangencial. La migración radial es el principal modo de migración que tienen durante el desarrollo del córtex cerebral (Hatten, 1999). Según este modelo las neuronas generadas en las zonas proliferativas se desplazan perpendicularmente hacia la superficie del cerebro a lo largo de un andamiaje de fibras gliales orientadas radialmente, cuyas prolongaciones abarcan todo el espesor del parénquima (figura 2). A este tipo de migración también se le llama migración gliofílica, debido a la interacción entre las neuronas que migran y el sustrato glial (Nadarajah, 2002).

Otra modalidad la constituye la migración tangencial, ó neurofílica, (figura 2) según la cual las neuronas se mueven paralelamente a la superficie del cerebro a lo largo de los axones de otras neuronas y, a menudo, incluso traspasan las fronteras regionales. Este tipo de migración lo siguen fundamentalmente las interneuronas que son originadas en la eminencia ganglionar, situada en el telencéfalo ventral para alcanzar el córtex en desarrollo.

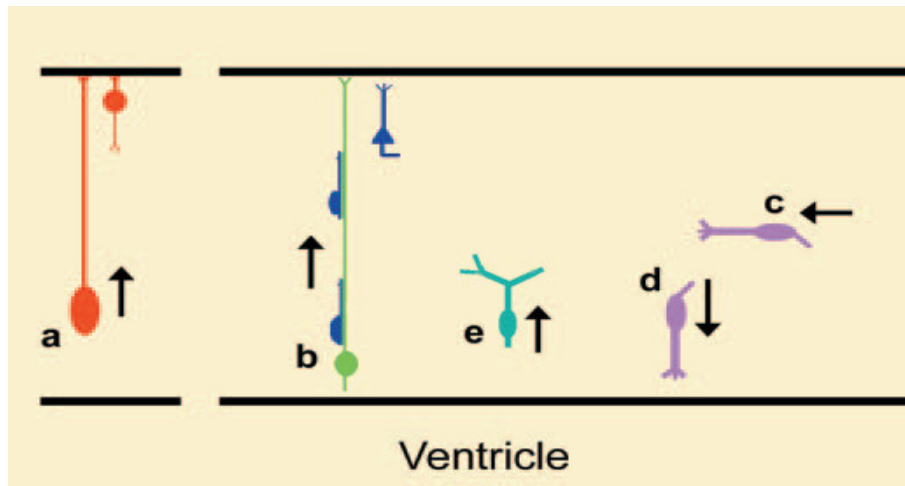


FIGURA 2. Ilustración esquemática de varios modos de migración en el desarrollo del córtex cerebral. (a) Durante el desarrollo temprano el modo prevalente de migración radial es la traslocación somal. (b) Locomoción guiada por glía. (c) Las interneuronas corticales que se originan en la eminencia ganglionar siguen vías de migración tangencial para alcanzar el córtex (d) y buscan la zona ventricular (migración ventrículo-dirigida). (e) Una subpoblación de neuronas cambia de los modos de migración radial a tangencial (células ramificadas).

Además de estas formas “típicas” de migración podemos hablar de una variedad de movimiento llamado “migración ventrículo-dirigida” (figura 2), movimiento que siguen las interneuronas corticales para buscar la zona cortical antes de migrar a sus posiciones

en el plato cortical (*Nadarajah et al., 2002*). También algunos autores hablan de un comportamiento migratorio único, que aparece en una población de neuronas corticales con características morfológicas particulares. Éstas son neuronas multipolares, y son altamente activas en la formación y retracción de sus procesos (figura 2). En función de sus características morfológicas, se refieren a este tipo de células como “branching cells” y forman una subpoblación característica de interneuronas corticales. (*LoTurco et al., 2006*).

1.2.1. MIGRACIÓN RADIAL

Diversos estudios ultraestructurales han demostrado que la migración radial puede ocurrir de dos modos. En estados tempranos de corticogénesis, cuando la vesícula cerebral es relativamente delgada, la glía radial no es necesaria para guiar las neuronas a su emplazamiento definitivo. Este modo de migración adoptado por las neuronas tempranas se denomina “traslocación somática”. Sin embargo, la translocación somática no es un mecanismo plausible para explicar la migración de neuronas corticales que son generadas en estadios posteriores, particularmente en los estados donde el primordio cortical presenta ya un espesor de varios cientos de micras. Así, existe otro modo de migración guiada por glía (figura 3); la migración radial, la cual es utilizada predominantemente por las células piramidales (*Nadarajah et al., 2002*).

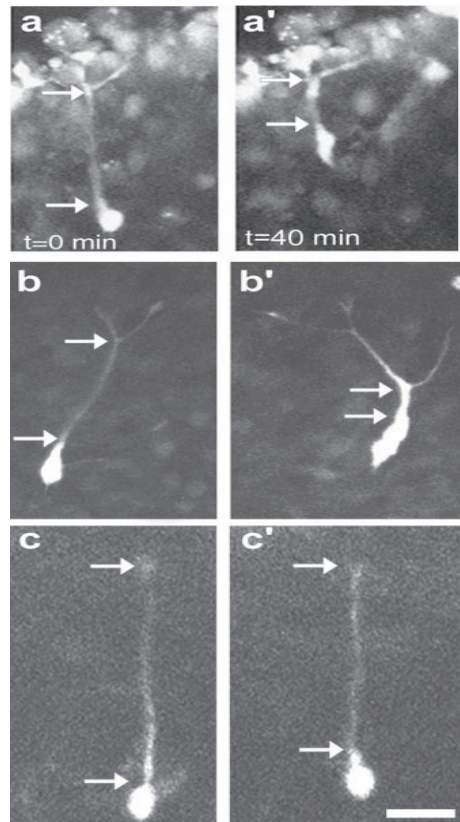


FIGURA 3. "Time-lapse images" de células del córtex en desarrollo que ilustran tres modos diferentes de migración: traslocación somática (a, a2), movimiento de las células ramificadas (b, b2), y locomoción guiada por glía (c, c2). Escala: 25µm.

Las dos variantes de migración radial, la traslocación somática y la migración guiada por glía, se pueden diferenciar por las características del propio proceso migratorio y por la morfología adoptada por los elementos migrantes. En la traslocación somática los neuroblastos que migran, inicialmente mantienen dos procesos, uno que se extiende hacia la superficie ventricular y otro que lo hace hacia la superficie pial. Después de su última división, dichas células pierden sus uniones con la superficie ventricular y translocan su soma hacia el proceso que se dirige a la pía (figura 4). El soma de las células que migran según esta modalidad muestra un avance continuo que resulta en un ritmo rápido de migración (*Morest., 1970*).

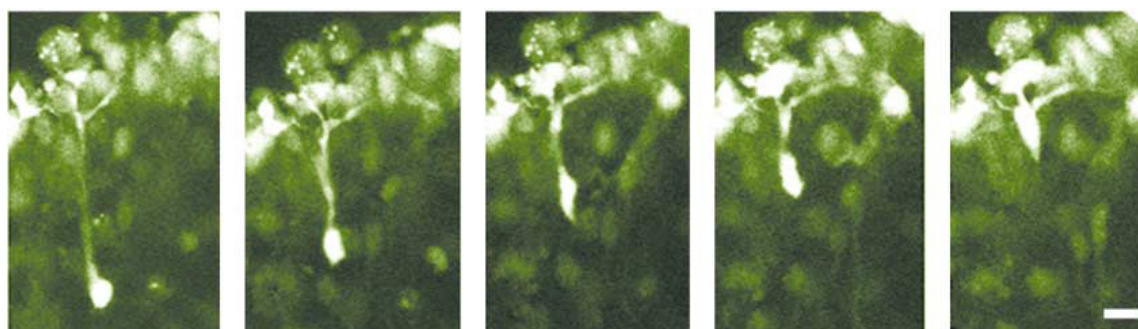


FIGURA 4. Traslocación somal. Time-lapse images de una célula experimentando traslocación somal en una rodaja cortical de ratón que fue marcada con Verde Oregon BAPTA-1488AM. Las imágenes se obtuvieron a intervalos de un minuto. Escala, 10 μ m.

En contraste, las células que adoptan migración guiada por glía, poseen un proceso radial corto, que no llega a contactar con la superficie pial (figura 5). Estas células muestran un patrón de locomoción saltatorio y lento (cortas ráfagas de avance intercaladas con fases estacionarias) (*Nadarajah et al., 2001*). Las neuronas que muestran este patrón saltatorio de movimiento pasan a migrar en modo de traslocación somática en la fase terminal de su migración, una vez que su proceso radial alcanza la ZM.

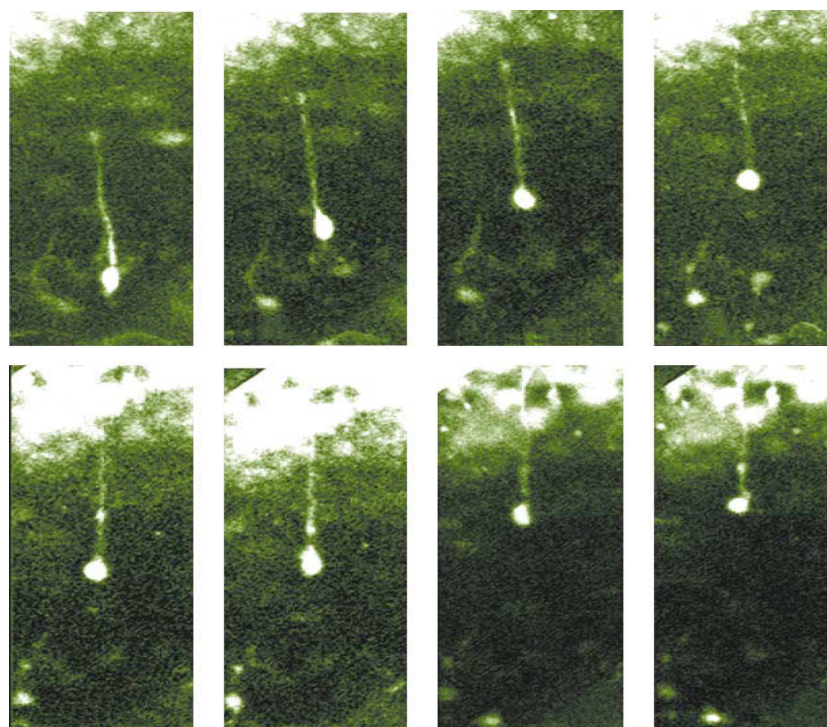


FIGURA 5. Migración guiada por glía. Time-lapse images de una célula moviéndose mediante migración guiada por glía en una rodada cortical de ratón que fue marcada con Verde Oregon BAPTA-1488AM. Las imágenes se obtuvieron a intervalos de un minuto. Como el soma se mueve hacia delante, el proceso delantero mantiene su longitud. Escala 10 μ m.

Como apuntamos anteriormente la traslocación somática tiene lugar durante la corticogénesis temprana y hay líneas de evidencia que sugieren que es distinta a la migración guiada por glía (Miyata *et al.*, 2001). Dicho grupo, identificó una población de “neuronas radiales” que difieren, tanto en morfología como en la posición de su soma, de la típica glía radial bipolar. Las neuronas radiales, generadas a partir de glía radial, son unipolares, con un proceso largo que conecta con la pia, y sus somas están posicionados en la zona subventricular o en la zona intermedia. Por tanto, las características morfológicas de las neuronas radiales son sorprendentemente similares a aquellas descritas para las células que experimentan traslocación somática (Morest, 1970; Nadarajah *et al.*, 2001). Las neuronas radiales, las cuales inicialmente son bipolares y no se distinguen de la glía radial, pierden su fijación con el ventrículo a la vez que salen de la ZV. Además, la glía radial da lugar a una segunda población de neuronas postmitóticas, las cuales típicamente se corresponden con la población que depende de la glía radial para su migración (Miyata, 2001; Hartfuss *et al.*, 2001). Aunque no hay evidencias claras para hacer ninguna distinción molecular entre células neuroepiteliales y glía radial, la observación de que las neuronas radiales y la población guiada por glía son generadas por glía radial es de interés, y esto plantea la posibilidad de que distintos subgrupos de progenitores pueden dar lugar a diferentes poblaciones postmitóticas. (Nadarajah *et al.*, 2002). Estas observaciones indican que durante la corticogénesis temprana, y particularmente durante la formación de la preplaca y durante la migración de las neuronas PC tempranas, la translocación somática es el modo prevalente de migración radial.

1.2.2. MIGRACIÓN TANGENCIAL

Durante mucho tiempo se creyó que el único mecanismo de migración neuronal que existía en el desarrollo del córtex cerebral era el modo de migración radial; sin embargo, sucesivos estudios confirmaron que, si bien la mayoría de las neuronas corticales experimentan rutas de migración radial, también algunas neuronas experimentan mecanismos tangenciales (*O'Rourke et al., 1992*). Los clones de neuronas organizadas radialmente contienen glutamato, la firma neuroquímica de las neuronas piramidales; mientras que las células dispuestas tangencialmente contienen GABA (ácido γ -aminobutírico) y en su mayoría se originan en la eminencia ganglionar, más concretamente en la eminencia ganglionar medial (EGM), el primordio del globo pálido (figura 6) (*Lavdas et al., 1999; Wichterle et al., 1999*).

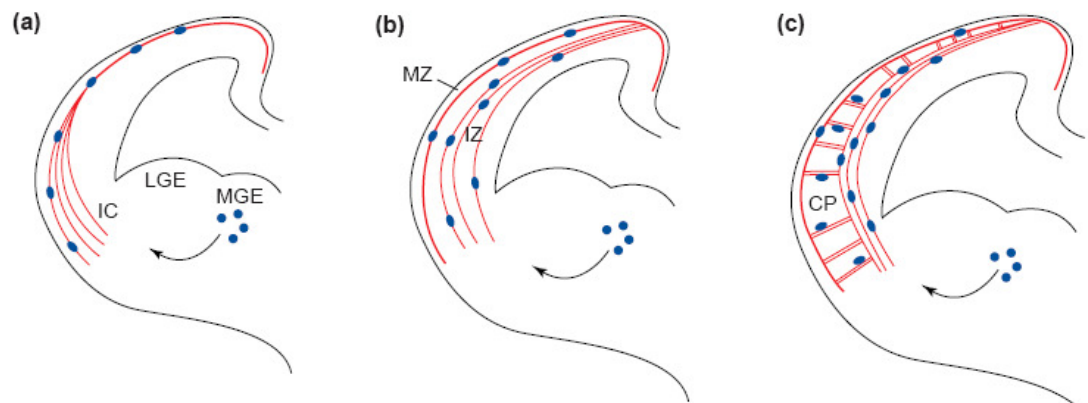


FIGURA 6. Las neuronas de la eminencia ganglionar migran al córtex en asociación con axones corticofugales. Esquema de la migración tangencial de las neuronas de la eminencia ganglionar medial (EGM) (representadas en azul) al córtex en desarrollo. Algunas evidencias sugieren que estas neuronas siguen diferentes rutas hasta el córtex, y su aparición en diferentes capas coincide con el desarrollo de paquetes axónicos del sistema corticofugal (mostrados en rojo) en las mismas capas. Éstas primero aparecen en la zona marginal (MZ) (a), y algo más tarde en la zona intermedia (IZ) baja y el plato cortical (CP) (b). Su migración a la MZ y la IZ tiene lugar lo largo de los axones tangenciales del sistema corticofugal en esas zonas, mientras que las neuronas destinadas al CP deben continuar a lo largo de los axones organizados radialmente (c). Abreviaturas: IC, cápsula interna; LGE, eminencia ganglionar lateral.

A diferencia de las neuronas piramidales, las interneuronas que se originan en el telencéfalo ventral necesitan migrar a lo largo de cientos de micras a través de regiones con alta densidad celular antes de alcanzar sus destinos en el córtex (*Nadarajah et al., 2002*). Dichas neuronas GABAérgicas migran tangencialmente en la zona intermedia baja más allá de los límites de dicho área en el córtex embrionario (*K. Nakajima, 2007*). Estas interneuronas dependen de una amplia variedad de sistemas de guía para navegar desde el telencéfalo ventral al dorsal. Como ejemplo podemos citar SLIT1 que es una proteína que funciona como repelente químico para las neuronas que

contienen GABA (*Yuan et al., 1999*), o el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que se expresa en la eminencia ganglionar, y se piensa que puede proporcionar señales motoras a las interneuronas, induciendo así su movimiento en dirección al palio dorsal (*Powell et al., 2001*).

Se conoce poco sobre los sustratos responsables que permiten a las interneuronas alcanzar el córtex, pero sí se sabe que su migración tangencial es totalmente independiente de la interacción con la glía radial (*Parnavelas et al., 2002*). Se ha descrito una estrecha asociación entre las células orientadas tangencialmente en el córtex en desarrollo con los paquetes del sistema de fibras corticofugales (figura 6) (*Metin et al., 1996*) sugiriendo que las interneuronas que migran usan este sistema de fibras como un andamio para su migración dentro del neocórtex (*Rakic, 1985*). En este sentido algunos estudios indican que los axones pueden proporcionar un sustrato a la migración neuronal no-radial en el desarrollo del SNC. Los axones corticofugales contienen la molécula neural de adhesión celular TAG-1 (también llamada contactina 2) y, llamativamente, el patrón espacial y temporal de expresión de TAG-1 en estas fibras coincide con el orden de aparición de las células GABAérgicas en el córtex (*Denaxa, M. et al., 2001*). Así, TAG-1 se constituiría como un posible candidato a actuar como una señal de guía para las interneuronas migrantes (*Denaxa et al., 2001*).

Existen múltiples vías de migración tangencial en el córtex en desarrollo del ratón (*Metin et al., 2006*). En etapas tempranas, las células que migran tangencialmente, entran en la preplaca o preplato, donde, al menos algunas, de ellas se diferencian en neuronas de Cajal-Retzius. En etapas intermedias de la corticogénesis, las células viajan tanto a través de la zona intermedia como a través de la zona marginal, mientras que en estados tardíos, las células migran tangencialmente, principalmente en la zona intermedia más profunda, zona subventricular, subplato y zona marginal (*Nakajima, 2007*). Después de que las interneuronas GABAérgicas alcanzan el córtex, aproximadamente el 70% de ellas se mueven hacia el interior hasta llegar a la superficie del ventrículo ("migración ventrículo-dirigida"). Después de hacer contacto, y, tras una pausa en esta zona proliferativa, migran radialmente hacia el plato cortical (*Nadarajah et al., 2002*). Se ha especulado que estas neuronas buscan la zona ventricular para allí recibir más información sobre su destino. Dentro del córtex, las neuronas GABAérgicas presentan migración tangencial multidireccional, al menos en la zona marginal y en la zona ventricular, y probablemente también en el plato cortical y el subplato (*Tanaka et al., 2006*). Así, después de alcanzar el córtex por migración tangencial desde la EGM las interneuronas corticales experimentan una segunda fase de migración tangencial en todas las direcciones. Las interneuronas migrantes que han viajado inicialmente por la MZ o SP/ZI/ZSV entran posteriormente de forma radial en la PC desde cualquier localización para finalmente alcanzar sus capas adecuadas (*Polleux et al., 2002; Ang et al., 2003; Tanaka et al., 2003*).

1.2.3. MIGRACIÓN VENTRÍCULO-DIRIGIDA DE INTERNEURONAS

A pesar de la acumulación de evidencias que llevan a pensar que la mayoría de las interneuronas corticales se generan en el telencéfalo ventral, se sabe relativamente poco sobre cómo esas neuronas se integran en sus capas específicas. Algunos estudios

(Miller, 1985; Wichterle et al., 2001) han demostrado que las interneuronas corticales también adoptan un patrón de organización de dentro a fuera en el PC, similar al de las células piramidales. Por tanto, es probable que las interneuronas corticales también requieran de información específica de capa que les permita integrarse dentro del PC siguiendo un gradiente de dentro a fuera. El estudio de Nadarajah y colaboradores (2002), ha mostrado que las interneuronas que se originan en el telencéfalo ventral migran activamente en dirección a la ZV cortical hasta llegar al telencéfalo dorsal, un modo de movimiento que ha sido llamado "migración ventrículo-dirigida". Las neuronas que migran dentro de la ZV cortical detienen su migración durante un largo periodo de tiempo, posteriormente reanudan su migración de forma radial en la dirección de la superficie pial hasta alcanzar sus posiciones en el PC. La prevalencia de interneuronas con características morfológicas propias de la migración ventrículo-dirigida en todas las regiones de la ZV cortical en todos los estadios de la corticogénesis ha dado lugar a la idea de que las poblaciones de interneuronas buscan activamente la ZV cortical para allí recibir la información de capa, que es esencial para su correcta integración dentro del córtex en desarrollo. Es posible que estas interneuronas obtengan señales del micro-ambiente local o de las células piramidales a través de interacciones directas neurona-neurona (figura 7) (Parnavelas et al., 2002).

1.2.4. LA ETAPA MULTIPOLAR

En los últimos años, se ha hipotetizado a cerca de si existe un nuevo estado morfológico en la migración neuronal, la llamada etapa multipolar, la cual, se encuentra alterada en muchos desórdenes del desarrollo cortical. La etapa multipolar ocurre cuando las células progenitoras bipolares se convierten en neuronas que migran radialmente (figura 8). Esta etapa es una etapa intermedia común para muchas neuronas. La salida de la etapa multipolar depende de la función de filamina 1, LIS1 y DCX. Mutaciones en los genes que codifican estas proteínas, en humanos, causan distintos desórdenes de la migración neuronal, incluyendo heterotopia nodular periventricular, heterotopia en banda subcortical y lisencefalia. Por tanto, la etapa multipolar es un punto crítico en el control de la migración y un objeto vulnerable para la interrupción del desarrollo cortical (LoTurco et al., 2006).

Los progenitores radiales situados en la zona ventricular (VZ) que dan lugar a las neuronas piramidales neocorticales poseen, todos, morfología bipolar: constan de un largo proceso que se extiende hacia la pia y un proceso corto que se extiende hacia la superficie ventricular. Las neuronas que migran y son generadas de los progenitores radiales (Noctor et al., 2001) también adoptan dicha forma bipolar característica, con un proceso delantero dirigido a la pia y un proceso de arrastre que se extiende hacia abajo (Rakic et al., 1996). Las neuronas que migran y poseen morfología bipolar están preferentemente en la zona intermedia (ZI) y el plato cortical (PC) del córtex en desarrollo durante los periodos migratorios (Tabata et al., 2003). Las células con morfologías complejas, no-bipolares, prevalecen en la zona subventricular (ZSV) y también en la zona intermedia (ZI) durante la migración. Hasta hace poco, no estaba claro si estas células morfológicamente más complejas que se encontraban en la ZSV y la ZI eran una población separada de los precursores piramidales, como las

interneuronas que migran o los progenitores gliales, o si algunas son intermediarios multipolares de las neuronas piramidales que migran (*LoTurco, J.J. et al., 2006*).

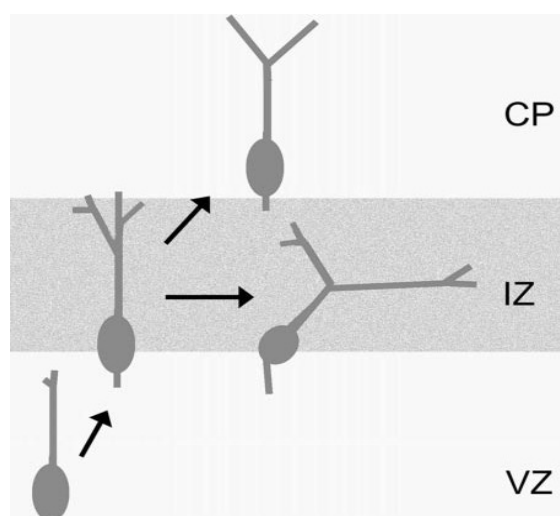


FIGURA 8. Ilustración esquemática de una célula ramificada mostrando su comportamiento migratorio típico.

Algunos experimentos han demostrado claramente que la mayoría de las células multipolares de la ZSV y la ZI de hecho, provienen de progenitores radiales (*Tabata et al., 2003; Kriegstein et al., 2004; Noctor et al., 2002*). Los progenitores marcados, ya sea por infección usando la proteína verde fluorescente (GFP) con retrovirus para marcar clones individuales (*Noctor et al., 2002*) o por electroporación *in utero* para marcar un mayor número de células (*Tabata et al., 2003*), han sido satisfactoriamente aplicados por co-transfección de combinaciones de plásmidos. Algunos de los primeros productos de genes manipulados de este modo, han sido previamente identificados por clonación posicional de mutaciones que interrumpen el patrón laminar neocortical en humanos (*desPortes et al., 1998; Gleeson et al., 1998; Sheen et al., 2003*). La manipulación de la expresión de los genes de roedores que codifican filamina 1, lisencefalia 1 y doblecortina por electroporación *in utero* altera significativamente el número de células en la etapa multipolar (*Tsai et al., 2005; Bai et al., 2003; Nagano et al., 2004*). Además, la localización de los fenotipos celulares sugiere que hay al menos dos subetapas dentro de la etapa multipolar.

Los experimentos de RNAi y los fenotipos de algunas malformaciones corticales indican que hay al menos dos etapas dentro de la migración temprana antes de la laminación de las neuronas en el plato cortical. La interrupción de la proteína filamina 1, por mutación, detiene la migración cerca de la zona ventricular y la zona subventricular, y la disrupción de la proteína DCX detiene la migración más superficialmente, en la ZI. La interrupción de la segunda fase multipolar parece conducir a la acumulación de células en la ZI, lo cual lleva a la formación de heterotopia en banda subcortical. LIS1 es probable que tenga un papel en cada nivel de la migración temprana y la polarización neuronal; sin embargo algunos casos de heterotopia en banda subcortical han sido asociados con mosaicismos en mutaciones en LIS1, (*Sicca et al., 2003*) por lo que es posible que LIS1 sea particularmente importante en la segunda etapa multipolar.

1.3. MECANISMOS CELULARES DE LA MIGRACIÓN

En el desplazamiento por parte de una célula se pueden distinguir tres etapas. La primera, es la llamada, *extensión delantera del borde*, la cual, en el caso de los neuroblastos, puede referirse a la extensión del axón, por crecimiento del cono crecimiento, o de las dendritas, por formación de puntas dendríticas. Esta extensión va precedida por filopodios y lamelopodios que exploran el micro-ambiente circundante, y a partir de las señales que reciban; positivas o negativas, que serán integradas por GTPasas pequeñas tipo-Rho, influirán sobre la red de microfilamentos periférica, regulando la polimerización de actina. La *nucleocinesis* es la segunda etapa del proceso de migración neuronal, consistente en el movimiento del núcleo hacia el interior del proceso de extensión y que es en gran medida dependiente de la red de microtúbulos. El tercer evento es la *retracción de los "procesos de rastreo"* (trailing processes), un aspecto que es poco abordado en la literatura (figura 9). A diferencia de otras estirpes celulares, las neuronas establecen definidos patrones morfológicos al final de la migración, y esto puede considerarse como una "cuarta etapa" de la migración celular. El patrón de formación es controlado a través de la señalización por Reelina. (De Rouvroit et al., 2001).

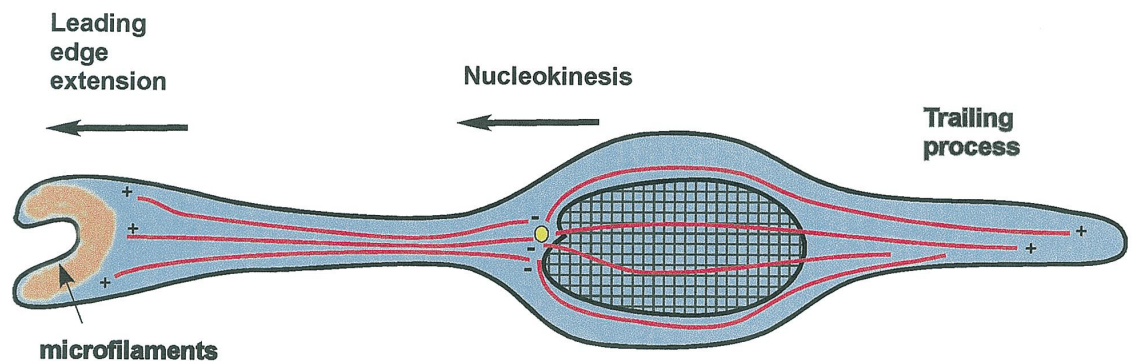


FIGURA 9. Art 2: Fig1: Esquema de una neurona migrando. La extensión delantera del borde se produce por polimerización de la malla de actina, mientras que la nucleocinesis depende de la organización de los microtúbulos cuyos extremos negativos irradian desde el centro organizador de microtúbulos (punto amarillo). La retracción de los procesos de rastreo generalmente no se considera decisiva en el proceso migratorio.

1.3.1. EXTENSIÓN DELANTERA DEL BORDE

Las neuronas en migración extienden numerosos procesos, pero la nucleocinesis posterior sólo va dirigida hacia uno de ellos, específicamente hacia aquel que marca la dirección de la migración. El crecimiento axonal por elongación del cono es el modo más estudiado de los procesos de extensión; (Tessier-Lavigne et al., 1996; Mueller, 1999), sin embargo, éste no suele ser considerado en los procesos de migración neuronal ya que rara vez va seguido de nucleocinesis dirigida hacia esta extensión. La diferencia entre el crecimiento del cono de elongación de una extensión con y sin

posterior nucleocinesis hacia esa extensión celular viene determinada por el control de la nucleocinesis subsiguiente más que al crecimiento del cono de navegación en sí (*De Rouvoit, 2001*).

Otro tipo de extensión delantera del borde viene dado por las puntas dendríticas de crecimiento. Lo más frecuente es que el proceso celular se elonge a lo largo de la dimensión radial del neuroepitelio y las células gliales radiales. Ocurre principalmente en el córtex cerebral y en el cerebelo y, se denomina migración gliofilica (*Rakic, 1990*). Así es como ocurren la mayoría de los procesos de migración en el cerebro. La punta gliofilica se elonga apoyada sobre la superficie de las células gliales radiales que les proporcionan sustrato y guían su extensión. La mayoría de las proteínas implicadas en las interacciones glía-neurona, son astrotactina (*Hatten, 1999*) e integrinas, particularmente integrina alfa3-beta1 (*Anton, 1999*). Durante el desarrollo cortical temprano, algunas neuronas migran radialmente sin formación de procesos de borde, simplemente por pérdida de sus conexiones con el ventrículo y por traslocación nuclear (*Nadarajah et al., 1999*). Además, las neuronas tempranas que migran al córtex cerebral no tienen forma bipolar sino estrellada (*Derer, 1994*). En comparación con las células que migran más tarde, estas neuronas estrelladas poseen más de un proceso de extensión, no siguen estrictamente a las células radiales y su migración es lenta. Claramente, la migración radial por formación de puntas dendríticas obedece a señales que son diferentes de aquellas que determinan la migración tangencial (*De Rouvoit, 2001*).

Además de los modos de migración expuestos anteriormente, podemos distinguir otros mecanismos celulares de migración tales como; la migración radial no-gliofilica, observada durante el desarrollo cortical temprano; la llamada "migración en cadena" que sufren las neuronas que migran al bulbo olfatorio (*Wichterle et al., 1997; Law et al., 1999*); y la migración de neuronas GABAérgicas de la eminencia ganglionar medial al córtex cerebral (*Anderson et al., 1997*).

La amplia variedad de procesos de borde, presumiblemente, refleja la diversidad de señales micro-medioambientales y la gran diversidad de vías de señalización que dirigen su crecimiento. Por ejemplo, estudios morfológicos sugieren que la forma de los procesos de extensión refleja su ritmo de extensión, máximo en el caso de los conos de crecimiento, menos rápido en la extensión tangencial, e incluso más lento todavía en la migración radial. Sin embargo, esta visión es demasiado simple y hay diferentes maquinarias para explicar la *extensión delantera del borde*. Como un primer ejemplo; las heterotopias periventriculares ligadas al cromosoma X han sido relacionadas con mutaciones en filamina, una proteína asociada a actina (*Fox et al., 1998*). Esta observación muestra que, al igual que el crecimiento de los conos axónicos, la elongación de las puntas de extensión requiere de la contractilidad de los microfilamentos de actina. Como veremos más adelante, la filamina es una proteína (265-280 kDa) con dos dominios de unión a actina, unidos entre sí mediante un largo eje flexible, que cruza las cadenas de los filamentos de actina formando una malla plástica, laxa. La filamina puede unirse al dominio intracelular de las integrinas, caveolina-1, receptor alfa TNF, y otras proteínas de superficie, favoreciendo así, la unión entre la superficie celular y la red de actina. Esta unión está regulada por GTPasas pequeñas de la familia Ras, tales como, Cdc42, Rac, Rho y Ra1a, las cuales, se unen a filamina. En el caso de la migración neuronal radial, déficits en filamina provocan el bloqueo de la elongación de la punta dendrítica a lo largo de las extensiones celulares

radiales. Como resultado, las neuronas no pueden abandonar la zona ventricular y se diferencian localmente provocando heterotopias nodulares (*de Rouvroit., 2001*).

Otro ejemplo en el que la formación de los procesos de extensión se ve afectada se ha detectado en los ratones deficientes en *Cdk5* ó *p35* (*Gilmore et al., 1998; Chae et al., 1997; Kwon et al., 2000*). Los ratones con mutaciones en *Cdk5* sufren defectos en la migración radial en todo el cerebro. También son defectuosas la migración neurofilica subpial de células granulares cerebelares y neuronas olivares inferiores y hay presentan signos de degeneración axonal. Sin embargo, algunos tractos se desarrollan normalmente, se forma el plato cortical inicial y la migración parenquimatosa de neuronas GABAérgicas de la eminencia ganglionar al córtex está relativamente inafectada (*de Rouvroit, 2001*).

1.3.2. NUCLEOCINESIS

Este proceso hace referencia principalmente a la traslocación del núcleo dentro de los procesos de extensión, lo que en definitiva marca la migración celular. Durante la nucleocinesis, el núcleo se mueve hacia un extremo de la célula por mecanismos que implican tanto a los microtúbulos como a sus proteínas motoras asociadas, resultando un corto proceso "de borde" y un largo proceso "de arrastre".

Usando *time lapse imaging* en el estudio del desarrollo del córtex cerebral, Nadarajah y colaboradores (*2002*) vieron claramente que durante la translocación somática, mientras el soma avanza, el proceso radial dirigido a la pía comienza a ser progresivamente más corto y fino. Aunque el acortamiento del proceso conectado a la pía está sincronizado con la translocación del soma, no está claro cual de los dos eventos ocurre primero. El proceso de extensión avanza radialmente desde la zona ventricular hacia la superficie pial, seguido de la nucleocinesis junto con una rápida reorganización de los microtúbulos, resultando en un acortamiento del proceso basal.

Dos ejemplos ilustran este punto. El primero son las células granulares cerebelares. Durante la migración tangencial, su núcleo se mueve dentro del axón inmaduro, formando la capa granular externa. En respuesta a una señal de las células de Purkinje (*Wechsler-Reya et al., 1999*) se extiende una punta dendrítica desde el soma, y se va elongando radialmente a lo largo de las células glias de Bergmann. Después, el núcleo se introduce en este proceso y se instala en la parte más profunda del córtex cerebral, formando la capa granular interna. En este caso, el cono de crecimiento axonal y la punta dendrítica van, ambos, seguidos de desplazamiento nuclear.

Un segundo ejemplo son las motoneuronas faciales. Se generan en la zona ventricular del cuarto ventrículo y envían su axón lateralmente para formar el nervio facial. Después extienden un proceso dendrítico que se extiende radialmente, probablemente, guiado por células glias, y seguido de nucleocinesis (*de Rouvroit., 2001*).

1.4. FACTORES QUE INTERVIENEN Y REGULAN LA TRASLOCACIÓN NUCLEAR Y SU IMPLICACIÓN EN ALTERACIONES EN LA MIGRACIÓN

Diferentes factores permiten y regulan la traslocación nuclear. Las alteraciones en la nucleocinesis, afectan lógicamente al proceso de migración, por lo que, en definitiva, suelen desembocar en toda una serie de malformaciones cerebrales conocidas como lisencefalia tipo 1, las cuales, se caracterizan por una migración neuronal defectuosa tanto hacia el córtex cerebral como a otras partes del cerebro. En la mayor parte de los casos, la lisencefalia tipo 1 tiene un origen genético. De hecho se han aislado dos genes, llamados Lis 1 (PAFAH1B1) y doblecortina (Dcx), cuyas mutaciones resultan, en humanos, en la llamada lisencefalia tipo 1 autosómica dominante, en el caso de mutaciones en Lis1 y en lisencefalia ligada al cromosoma X en machos y heterotopia subcortical en banda en hembras, en el caso de las mutaciones en el gen de la doblecortina. Por otra parte, ratones con mutaciones en Cdk5 y su cofactor p35 sufren defectos en la migración que, en cierta medida, recuerdan a las lisencefalias humanas. Además, en los últimos años, ha aumentado notablemente el número de nuevos genes a los que se les atribuye, de modo más o menos directo, su implicación en el proceso de traslocación nuclear y que, por tanto, su disfunción parece ser responsable de diferentes malformaciones cuyo origen se encuentra en alteraciones en el correcto desarrollo cerebral.

1.4.1. LIS1

Las primeras investigaciones sobre la nucleocinesis se llevaron a cabo en el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*, y a partir de estos estudios se ha establecido que el movimiento nuclear es un proceso dependiente de microtúbulos (Morris *et al.*, 1998; Oakley *et al.*, 1981; Xiang *et al.*, 1999). *A. nidulans* es susceptible de manipulaciones genéticas de forma relativamente sencilla, de manera que se han podido generar diferentes mutantes con alteraciones en la distribución nuclear (*nud*) para investigar los mecanismos celulares que subyacen a la nucleocinesis. En uno de estos mutantes, *nudF*, el factor mutado ha sido identificado como un componente de la vía de señalización que dirige el movimiento nuclear a lo largo de los microtúbulos a través de la regulación de la función del motor de dineína. El homólogo humano de *nudF* es LIS1, el cual, fue clonado siguiendo la asociación de la lisencefalia en humanos con anomalías en el cromosoma 17p13.3 que causa el síndrome de Miller-Dieker. (Dobyns *et al.*, 1993).

LIS1 tiene al menos dos funciones en mamíferos. Primero, actúa como la subunidad no-catalítica del factor activador de plaquetas (PAF) acetil hidrolasa 1b, también conocido como PAFAH1B1 (Hattori *et al.* 1994) y segundo, está implicado en la proliferación y migración celular (Xiang *et al.*, 1995).

Después de la generación de largas series de mutantes *nud* en *A. nidulans*, se consiguieron aislar varios genes directamente responsables del movimiento nuclear. Se cree que la vía de distribución nuclear está notablemente conservada en eucariotas, y

que la nucleocinesis en hongos y mamíferos comparte mecanismos comunes que implican la interacción entre nudF (Lis1 en mamíferos), nudE, microtúbulos y otras proteínas relacionadas con el como dineína y dinactina (Morris *et al.*, 1998; Wynshaw-Boris *et al.*, 2001). Algunos estudios han confirmado, incluso, una interacción física entre LIS1 y dineína. La conservación a lo largo de la evolución de estas proteínas en *A.nidulans* y estudios posteriores, han llegado a la conclusión de que el complejo proteico LIS1-dineína, ejerce fuerzas en los microtúbulos circundantes al núcleo, en las neuronas que están migrando, eventualmente tirando de éste y de otros orgánulos hacia el interior de los procesos de extensión del borde.

Esta hipótesis de migración nuclear para el papel de LIS1 está basada en la demostración de una interacción directa entre LIS1 y los homólogos de nudE de mamíferos, NUDEL y mNUDE, los cuales, se colocan en el centrosoma e interactúan con dineína, proporcionando una unión adicional entre LIS1 y dineína. Así, mientras NUDE se expresa por todos los órganos en etapas embrionarias tempranas, la expresión de NUDEL se restringe al cerebro y los testículos y sólo es detectada postnatalmente. Es interesante destacar que LIS1 y NUDEL colocalizan predominantemente en el centrosoma de células proliferativas, pero también se encuentran distribuidos por los procesos neuronales durante la diferenciación, en asociación con dineína. También se ha propuesto que el complejo LIS1/NUDEL/dineína influye en el movimiento de los microtúbulos dirigidos hacia la periferia de la neurona migrante, ayudando a la extensión de los procesos de borde y a la translocación nuclear. LIS1 estimula la actividad del motor de dineína, tirando de los centrosomas hacia dentro del proceso (Higginbotham, 2007). Es posible que LIS1 también participe en el transporte retrógrado de vesículas y orgánulos, como los endosomas, desde los procesos neuronales hacia la zona que ocupa el núcleo. Esta combinación de datos sugiere que LIS1 juega un papel decisivo en la migración nuclear en neuronas proliferativas y/o en migración (Friocourt, 2003).

Para investigar el papel de LIS1 en la migración neuronal, se obtuvieron ratones mutantes con deficiencia parcial de LIS1 o PFAH1B1 ya que los mutantes knockout totales no son viables (Hirotsune *et al.*, 1998). La pérdida parcial de esta proteína causa enlentecimiento y retraso en la migración neuronal durante el desarrollo cortical, aunque el gradiente normal de dentro a fuera de la formación de capas se mantiene. En otro estudio (Cahana *et al.*, 2001) se crearon cepas mutantes donde los animales heterocigotos fueron diseñados para que sintetizaran una proteína LIS1 truncada. En estos mutantes se vio que durante la corticogénesis temprana, las regiones caudales y mediales de la pared cerebral mostraban los fenotipos más defectuosos, que, a su vez, se correspondían con los lugares de mayor expresión de Lis1. Es interesante resaltar que en los dominios corticales afectados en el mutante, el preplato permaneció sin dividirse. Por tanto, LIS1 tiene un importante papel en la nucleocinesis, de modo que la reducción de los niveles de expresión de esta proteína podría implicar la interrupción de la migración de las neuronas corticales de generación más temprana.

Mutaciones espontáneas en un alelo de Lis1 causan lisencefalia heredada, clásica o tipo I, y raros mosaicismos somáticos de mutación Lis1 están asociados con heterotopía subcortical en banda. Las mutaciones nulas homocigóticas de Lis1 son letales para el embrión.

1.4.2. DOBLECORTINA (DCX)

El gen *Dcx* codifica una proteína de 361 aminoácidos que se asocia con microtúbulos, estabilizándolos (*Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999*). Posee un dominio evolutivamente conservado que consta de una región repetida en tándem en el extremo N-terminal, denominado repetición DC. La mayoría de los grupos de mutaciones puntuales humanas que afectan a este gen tienen lugar precisamente en estas repeticiones. La zona perteneciente a cada repetición por sí sola es capaz de unirse a tubulina, lo cual le permite interactuar con los microtúbulos, pero ninguna de estas repeticiones por sí solas es suficiente para mediar la estabilización de los microtúbulos. (*de Rouvroit., 2001*). Las evidencias bioquímicas y genéticas apuntan a un papel para DCX en los eventos mediados por microtúbulos que tienen lugar durante la migración neuronal (figura 10). La DCX es requerida específicamente en los extremos de los procesos de crecimiento neuronal, donde puede jugar un papel muy importante en la adición de membrana en estos lugares y/o en la regulación de ciertos receptores o moléculas de adhesión implicadas en la orientación celular y posiblemente axonal.

Además de la similitud entre los fenotipos de los mutantes para *Lis1* y para *Dcx*, se ha demostrado una interacción física entre LIS1 y DCX (*Horesh et al., 1999; Caspi et al.; 2000*). Ambas se asocian con microtúbulos facilitando su polimerización (figura 10) pero el modo preciso de interacción entre los tres elementos permanece desconocido.

Por otra parte, hay varias características que distinguen a la DCX de LIS1. Primero, la DCX posee un patrón de expresión mucho más restringido, de modo que esta proteína no se expresa en células en proliferación, si no que su expresión está limitada a neuronas post-mitóticas inmaduras, incluyendo neuronas que migran tangencialmente en el córtex embrionario, en la corriente migratoria rostral adulta y en neuronas que están diferenciándose en el plato cortical.

Segundo, cuando ha sido estudiada su expresión en células disociadas, se ha observado que presenta una compartimentalización subcelular muy definida, concentrándose en los extremos de las neuritas en crecimiento, y no asociada con los microtúbulos circundantes al núcleo. Esta combinación de datos sugiere que la DCX puede jugar un papel diferente al que se atribuye al complejo NUDEL/LIS1 en neuronas en diferenciación.

Tercero, a nivel molecular, la estructura secundaria de la DCX sugiere la existencia de un original dominio de unión a microtúbulos que no aparece en LIS1.

Finalmente, las proteínas motoras suelen estar caracterizadas por su disociación de los microtúbulos en presencia de ATP y su asociación en presencia de ADP. Sasaki y colaboradores, (2000) demostraron que LIS1 y NUDEL se disocian del motor proteico en presencia de ATP; sin embargo, la DCX tiene una relación diferente con los microtúbulos. Primero, la DCX interactúa directamente con los microtúbulos y no requiere de otras MAPs. Además, ni ATP, ADP, GTP o GDP influyen sobre dicha unión, mientras que se ha visto una asociación entre DCX y otras proteínas (AP1 y AP2) que están implicadas en el tráfico de vesículas (*Friocourt, 2003*).

Las mutaciones en el gen DCX ligado al cromosoma X, son la causa genética más frecuente de heterotopia subcortical en banda, o síndrome de doble córtex, en hembras, y la mayor causa de lisencefalia en machos.

Las mutaciones en LIS1 y DCX causan características similares tanto clínicas como neuroanatómicas y neurohistológicas. Existen, sin embargo, diferencias en el grado de afectación en las diferentes regiones anatómicas. Así, mientras que las mutaciones en DCX dan lugar a una afectación más severa del córtex frontal, las mutaciones de LIS1 afectan más severamente a las cortezas parietal y occipital. En estos casos, además de la lisencefalia y la heterotopía subcortical en banda, los individuos afectados sufren, lo que se ha denominado epilepsia criptogénica, e incluso extremadas malformaciones subcorticales. (*Friocourt et al., 2003*).

En algunos casos, sólo pequeños cambios en la función de una proteína puede explicar el fenotipo observado, aunque en otros casos la carga genética también es un factor que contribuye. Está claro que estos estudios genéticos, combinados con análisis funcionales de las proteínas DCX y LIS1, son apropiados para proporcionar importante información concerniente a las causas de la epilepsia y el retardo mental en los individuos afectados.

1.4.3. DCLK (Doublecortin-like kinase)

El gen DCLK se encuentra en el cromosoma humano 13q12.3. Además del motivo DC del extremo N-terminal, similar al de la DCX, la proteína DCLK contiene un dominio transmembrana y una región de gran similitud con las proteínas quinasas calcio-calmodulina-dependientes. El patrón espacio-temporal de expresión del mRNA de DCLK en el cerebro embrionario sugiere que el producto de este gen podría también estar implicado en el desarrollo cortical (*Sossey-Alaoui et al., 1999; Burgess et al., 2000; Matsumoto et al., 1999*). De hecho, ciertas isoformas de DCLK muestran un patrón de expresión muy similar al de la DCX durante el desarrollo embrionario, incluyendo su expresión en neuronas corticales migratorias (figura 10) (*de Rouvoit., 2001*).

De entre las numerosas isoformas de esta proteína, la isoforma más similar a la DCX es la DCLK1C, la cual, además de ser expresada en neuronas corticales del ratón en desarrollo, también se expresa en células astrogiales en cultivo, mostrando, por tanto, mayor amplitud de expresión que la DCX. Sólo esta isoforma de DCLK está presente en astrocitos. En particular, los estudios de inmunofluorescencia para la detección de esta isoforma mostraron que los procesos astrocitarios se encontraban intensamente marcados. Estos procesos son particularmente activos *in vivo*, extendiendo sus extremos en regiones perisinápticas, donde pueden modular la función sináptica y participar en la comunicación neurona-glia (*Chvatal et al., 2000*). Este patrón de distribución puede sugerir una función de este homólogo de la DCX en la plasticidad de los finos procesos altamente dinámicos de los astrocitos, implicados en estas funciones perisinápticas (*Derouiche et al., 2001*). La DCLK en los procesos astrocíticos podría, por tanto, jugar un papel similar al de la DCX en los procesos neuronales. (*Friocourt et al., 2003*).

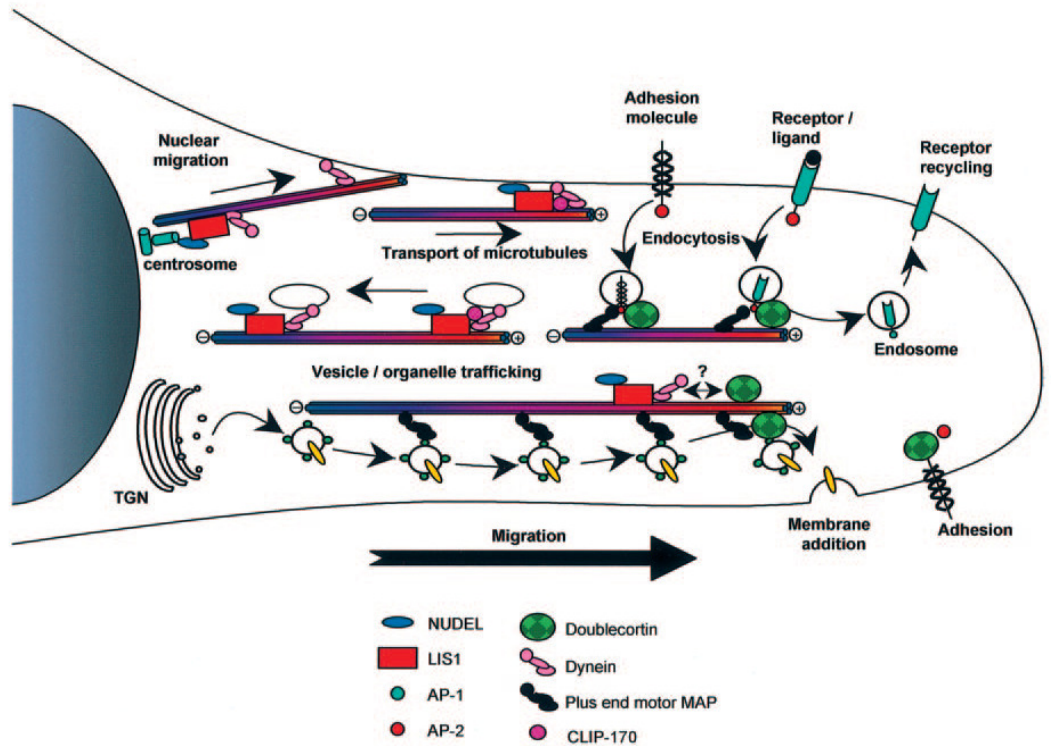
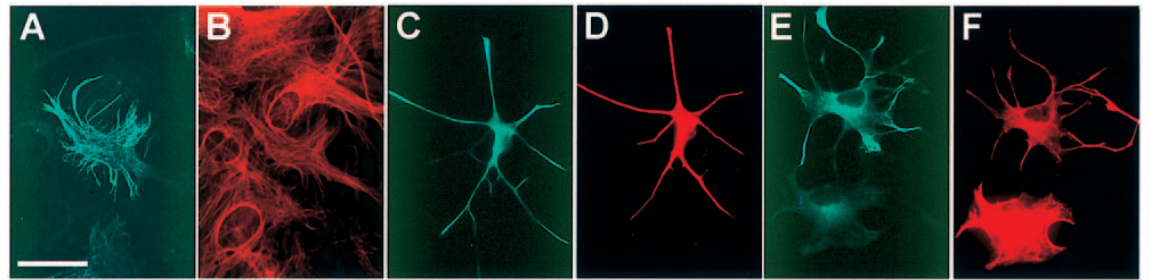


FIGURA 10. (superior) Localización subcelular de DCLK en astrocitos, similar a la localización de su proteína homóloga Doblecortina. Se prepararon cultivos de astrocitos de acuerdo con lo descrito por Nowak y colaboradores. (1987) a partir de hemisferios cerebrales de ratones recién nacidos. Se realizó tinción inmunohistoquímica usando anti-DCLK (1:300), anti-tubulina (1:1000) (Amersham no. 356) y anti-GFAP (1:200) (ICN Biomedicals). La preparación se estudió usando un microscopio Zeiss equipado con epifluorescencia. (A, B) Células gliales mantenidas en cultivo durante 7 semanas en las que se realizó doble marcaje con anti-DCLK y anti-tubulina. (C, D) Un astrocito estrellado marcado doblemente con anti-DCLK y anti-GFAP. (E, F) Astroцитos marcados doblemente con anti-DCLK y anti-GFAP. Se ven dos astroцитos, uno fuertemente marcado con anti-DCLK mientras que el astrocito inferior está ligeramente marcado. Observar la fuerte tinción con anti-DCLK en los extremos de los procesos astrocitarios. **(inferior)** Posibles papeles de la Doblecortina y LIS1 sobre neuronas en proceso de migración. El complejo dineína/NUDEL/LIS1, anclado a la membrana celular, puede estar implicado en el control del movimiento del núcleo y otros componentes del soma dentro de los procesos de extensión. Una función alternativa de este complejo puede estar relacionada con la elongación de los procesos de extensión por el transporte de microtúbulos hacia el extremo. Una tercera posibilidad se refiere a la conocida función de la dineína no-anclada en las vesículas y orgánulos que se transportan hacia el soma celular por movimiento a lo largo de los microtúbulos hacia sus extremos negativos. La Doblecortina interactúa

directamente con los microtúbulos en los extremos de las neuritas en neuronas en diferenciación y el extremo del proceso de extensión en algunas poblaciones de neuronas que están migrando tangencialmente. La doblecortina también interactúa con el complejo AP1 en estas regiones, y es posible que esto promueva la disociación de las vesículas de transporte de los microtúbulos, con el fin de regular la adición de nueva membrana a los procesos en crecimiento. La Doblecortina también interactúa con el complejo AP2, y esta unión puede formar parte de los procesos de endocitosis y reciclaje de moléculas de adhesión o receptores en los extremos de las neuronas en migración.

1.4.4. FILAMINA 1

Es evidente que las neuronas cuya migración es guiada por glía radial han de seguir varias etapas antes de alcanzar sus posiciones finales. Estos procesos son altamente dependientes de la red de microfilamentos, además de utilizar los mecanismos dependientes de microtúbulos. Durante la migración guiada por glía, el cuerpo celular completo, incluidos los procesos de avance y de arrastre, se mueven juntos como una unidad única (Rivas *et al.*, 1995). En este contexto, el gen que codifica para filamina 1 (Fln1), codifica una proteína que se une a receptores de membrana y al citoesqueleto de actina (Fox *et al.*, 1998). Se ha comprobado que FLN1 se une a varias proteínas de membrana, incluyendo integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$; las cuales son necesarias para la interacción entre las neuronas y la glía radial durante la migración (Loo *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 1995).

Mutaciones en el gen de la filamina 1 (Fln1) causan, en humanos, heterotopía periventricular, un desorden de la migración radial que resulta en neuronas en posición ectópica, próximas al ventrículo lateral, y que ha sido asociado a epilepsia, (Dobyns *et al.*, 1997; Sheen *et al.*, 2003) y más recientemente a desórdenes de lectura (Chang *et al.*, 2005). En esta malformación, la localización de agregados neuronales en la superficie ventricular indica que las neuronas, o bien no son capaces de salir de la superficie de la zona ventricular, o migran de forma inadecuada, en un movimiento adelante-atrás en la superficie ventricular. Experimentos de electroporación *in utero* indican un papel celular de la filamina A para salir de la etapa multipolar (Nagano *et al.*, 2002, 2004). Una expresión excesiva del gen de la filamina A en roedores, reduce el número de células multipolares en la zona subventricular y la zona ventricular. De forma inversa, una sobreexpresión de *Filip1* (el cual codifica una proteína de unión a filamina A que marca a la filamina para su degradación) (Nagano *et al.*, 2002) causa una acumulación de células en la etapa multipolar. Lo mismo ocurre con la expresión de *Flna* truncado, donde las células transfectadas no migran a pesar de tener procesos multipolares que continúan extendiéndose y retrayéndose dinámicamente (Nagano *et al.*, 2004). En contraste, la sobreexpresión de *Filip1* reduce la extensión de los procesos multipolares dinámicos sin interferir con la migración radial. Así, la Filamina 1 parece necesaria para la migración dentro de la etapa multipolar, y para la transición en modos bipolares de migración (LoTurco *et al.*, 2006).

1.4.5. KINASA DEPENDIENTE DE CICLINA 5 (Cdk5) Y SUS COFACTORES p35/p39

Otras dos proteínas que han sido asociadas con la regulación de la red de actina, y se ha comprobado que tienen un papel en la migración neuronal guiada por glía

son Cdk5 y su cofactor p35. Cdk5 se expresa en todas las neuronas postmitóticas y regula muchos procesos del desarrollo durante la diferenciación neuronal. Entre ellos, se ha comprobado que estas proteínas regulan la extensión de las neuritas de las neuronas corticales en cultivo (*Nikolic et al., 1998*). Se cree que Cdk5 reduce la expresión de N-cadherina mediada por la adhesión, en las neuronas, a través de una asociación entre p35 y β -catenina (*Kwon et al., 2000*) y facilita la navegación de neuronas a través de la IZ y el CP, regiones ricas en N-cadherina. (*Redies et al., 1993*).

Cdk5 posee varios sustratos de unión; uno de los principales es la proteína de asociación a microtúbulos "tau"; se cree que también a FLN1 y por último a NUDEL (*Sasaki et al., 2000*). Mientras LIS1 se une a las proteínas que regulan la función del motor de dineína y regulan la nucleocinesis, NUDEL es directamente fosforilado por Cdk5 y su cofactor p35, proporcionando una unión entre LIS1 y las cascadas de señalización Cdk5-p35.

Ratones deficientes en Cdk5 tienen graves defectos en la migración neuronal en el córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, así como en otras muchas partes del SNC (*Gilmore et al., 1998; Kwon, et al, 2000*). Además, algunos tractos de axones se muestran defectuosos. Sin embargo, la formación inicial del preplato telencefálico y el plato cortical temprano tiene lugar de modo normal, las neuronas GABAérgicas de la eminencia ganglionar migran normalmente en el córtex de los ratones deficientes en Cdk5, sugiriendo que algunos tipos de migración neural son independientes de Cdk5. La migración inicial en el preplato telencefálico y el plato cortical es más corta y morfológicamente diferente de la migración radial tardía, sugiriendo que Cdk5 sería sólo necesaria para la migración gliofílica de "largo alcance". Se cree que la principal función de Cdk5/p35/p39 durante la migración neuronal es a través del control de la nucleocinesis (*Nikolic et al., 1998*). Una inactivación de p35 resulta en un desorden en la migración más sutil, probablemente debido a la redundancia que existe entre p35 y p39.

1.4.6. REELINA

Una vez las neuronas alcanzan sus destinos finales, han de interrumpir el proceso migratorio, desenganchándose del sustrato glial y organizándose en las capas corticales apropiadas (*B. Nadarajah et al., 2002*). Estudios en ratones mutantes *reeler*, deficientes en Reelina, han mostrado que la Reelina y sus moléculas de señalización son esenciales para la etapa final de la migración neuronal y para una adecuada organización radial y una laminación de las neuronas postmigratorias en todas las regiones del SNC (*Pearlman et al., 1998; Rice et al, 2001*).

La Reelina es una glicoproteína larga (sobre 400 kDa), secretada por bastantes neuronas (*D'Arcangelo et al., 1995*) principalmente por células de Cajal-Retzius, hacia el espacio extracelular, en el córtex cerebral embrionario, hipocampo y cerebelo. La Reelina media su respuesta a través de proteínas tales como DAB1, el receptor de lipoproteínas de baja densidad (VLDLR), ApoER2 y la integrina $\alpha 3 \beta 1$. Los ratones deficientes en Reelina muestran el mismo fenotipo que los ratones doble-deficientes en VLDLR y Apo ER2 (*Trommsdorff et al., 1999*). Estas proteínas se expresan en células que responderán a la señal de Reelina uniéndose a Reelina de manera específica (*Hiesberger et al., 1999; D'Arcangelo et al., 1999*). VLDLR y Apo ER2

tiene una corta cola citoplasmática que interactúa con el adaptador tirosina kinasa, Dab1. Mutaciones en Dab1, de hecho, también generan fenotipo *reeler* (Howell et al., 1997; Sheldon et al., 1997). Dab1 se expresa en el citoplasma de neuronas corticales migratorias y posee un dominio N-terminal de unión a fosfotirosina (PTB), responsable de la interacción con los receptores lipoproteicos. La unión de Reelina a las células diana induce la fosforilación de Dab1 (Howell et al., 1999). La integrina alfa3-beta1 está implicada en la interacción entre las neuronas corticales que migran radialmente y las fibras gliales radiales. Esta integrina participa en la formación de un complejo supramolecular con Reelina y receptores de lipoproteína (Dulabon et al., 2000). La formación de este complejo sugiere que la integrina alfa3-beta1 puede estar eliminada por endocitosis tan pronto como las neuronas migrantes llegan a un área rica en Reelina, como es el borde de la zona marginal. Esto puede hacer separar a las neuronas inmaduras de fibras gliales radiales y desencadenar su organización laminar en el plato cortical. (Lambert de Rouvroit., 2001).

La Reelina se expresa en la zona marginal y gobierna la disposición y el despliegue dendrítico de sus células diana, que corresponden respectivamente a células del plato cortical, células piramidales y células de Purkinje. La respuesta de las células diana a la señal de Reelina implica la expresión de receptores de membrana y proteínas de señalización intracelulares. También la Reelina puede proporcionar una señal de stop para las células (Pearlman et al., 1998), probablemente de la nucleocinesis y las separa de la glía radial. La Reelina puede promover el reconocimiento-adhesión entre células postmigratorias, así, estabiliza los patrones arquitectónicos tempranos. También, en la fase terminal de la migración guiada por glía, la Reelina puede inhibir la migración, llevando a las neuronas a translocarse a capas superficiales. Sin embargo, contrariamente a esto, estudios posteriores (Magdaleno et al., 2002) han mostrado que la Reelina no funciona simplemente como una señal de stop para las neuronas que migran, sino más bien como una molécula con un papel mucho más complejo en los mecanismos de posicionamiento neural.

2. EPILEPSIA

2.1. INTRODUCCIÓN

El término epilepsia deriva del latín “epilepsia”, y éste del griego “epilambaneim”, que significa “coger por sorpresa”. La epilepsia es, según la ILAE (International League Against Epilepsy), un “trastorno neurológico crónico caracterizado por una predisposición del cerebro para generar crisis epilépticas recurrentes, y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición”. Debemos diferenciar lo que es epilepsia de una crisis epiléptica. La crisis epiléptica o comicial ha sido definida por la ILAE como “la aparición de signos y/o síntomas transitorios debidos a una anormal y excesiva, o bien sincrónica, actividad neuronal en el cerebro”. Las crisis epilépticas suelen ser transitorias, con o sin disminución del nivel de consciencia y/o movimientos convulsivos (y otras manifestaciones clínicas). No todas las personas que padecen una crisis epiléptica se

diagnostican de *epilepsia*. Habitualmente es necesario haber presentado al menos dos episodios de crisis epilépticas o un episodio asociado a hallazgos patológicos en el EEG interictal, y haberse excluido aquellas causas de crisis epilépticas tratables, por ser debidas a alteraciones estructurales, como tumores o hemorragias intracraneales, para ser diagnosticado de epilepsia. El término epilepsia puede resultar confuso, ya que en el ámbito coloquial se suele utilizar indiscriminadamente para toda aquella persona que presenta crisis comiciales. No obstante, en el ámbito médico se debe restringir su uso a aquellas personas que presentan crisis comiciales recurrentes de origen desconocido (*Foldvary-Schaefer et al., 2007*).

Una crisis epiléptica ocurre cuando una actividad eléctrica anormal en el cerebro causa un cambio involuntario de movimiento o función del cuerpo, de sensación, en la capacidad de estar alerta o de comportamiento. Las crisis epilépticas pueden surgir en diversas regiones del cerebro aunque los ataques o crisis focales más comunes son aquellos en los que sólo participa una población local de neuronas. La crisis puede durar desde unos segundos hasta varios minutos. Hay más de 20 tipos diferentes de crisis epilépticas.

Los síntomas que experimenta una persona durante una crisis epiléptica dependen del lugar en el cerebro en donde tiene lugar la alteración de la actividad eléctrica. La clínica más llamativa se produce cuando se activa la zona motora y la persona afectada sufre una serie de movimientos corporales incontrolados de forma repetitiva denominados convulsiones. No en todas las crisis o ataques epilépticos se pierde la conciencia ni se producen estos movimientos convulsivos. Una crisis epiléptica puede consistir simplemente en desconectarse transitoriamente del medio o realizar actos repetidos sin finalizar. La epilepsia puede aparecer a cualquier edad, desde la primera infancia hasta la senectud aunque suele ser más frecuente en los dos extremos de la vida.

Según el origen de las crisis epilépticas podemos clasificar las epilepsias en dos grandes grupos: las primarias, en las que en su origen suelen encontrarse trastornos importantes de base genética y donde no se detecta ningún daño en la estructura del cerebro. En este grupo las alteraciones que inducen la descarga eléctrica cerebral se encuentran en una alteración de la membrana de la neurona con cambios que corresponden a procesos moleculares a nivel de canales de calcio, cloro, aminoácidos y /o GABA. El grupo de las epilepsias secundarias corresponden a los procesos en los que un daño cerebral previo es el causante de la crisis epiléptica.

Los métodos esenciales para un correcto diagnóstico de la epilepsia son: la realización de una historia clínica completa y detallada, la realización de un electroencefalograma, en el EEG se recoge la actividad eléctrica cerebral de cada individuo, y los métodos de diagnóstico por imagen, el principal es la resonancia magnética, que van a mostrar los posibles cambios estructurales que den origen a las crisis epilépticas; tumores, malformaciones, hemorragias, etc.

Los síntomas dependerán del tipo de crisis con que se presenten y de la zona del cerebro afectada. Hay dos tipos de crisis epilépticas: *crisis parciales*, son aquellas en las que la actividad epiléptica comienza en una zona determinada del cerebro, las características de la crisis dependerán por tanto de la zona cerebral donde se origine. Las *crisis generalizadas* son aquellas en las que la actividad eléctrica epileptiforme se manifiesta en todo el cerebro, habitualmente se manifiesta con movimientos bruscos de todo el cuerpo. Si la actividad epileptiforme comienza en todo el cerebro se denominan primariamente generalizadas, si se originan a partir de una crisis parcial se denominan

secundariamente generalizadas. (http://www.sen.es/publico/video_epilepsia.htm, Sociedad Española de Neurología)

Un diagnóstico cuidadoso y exacto del tipo de epilepsia que padece el enfermo es fundamental para encontrar un tratamiento efectivo. Hay muchas formas diferentes de tratar la epilepsia, los tratamientos actuales: fármacos antiepilépticos, cirugía, etc, pueden controlar los ataques, durante al menos durante cierto tiempo, en aproximadamente un 80% de los pacientes con epilepsia. Sin embargo, el 20% restante de los pacientes epilépticos tienen ataques que no se pueden tratar adecuadamente con los medios disponibles actualmente, por ello, se están investigando nuevos tratamientos y fármacos con distintos mecanismos de actuación. (Krumdz et al., 2007).

2.5. CAUSAS:

La epilepsia es un trastorno con muchas causas posibles, cualquier cosa que impida o distorsione el patrón de actividad neuronal normal puede conducir a la aparición de una crisis epiléptica. Entre las variadas causas de la epilepsia se encuentran las lesiones cerebrales de cualquier tipo (traumatismos craneales, secuelas de meningitis, tumores, etc.) pero en muchos casos no hay ninguna lesión, sino únicamente una predisposición de origen genético a padecer las crisis. Cuando existe una predisposición o se padece la enfermedad, hay, además, factores que pueden inducir el que se desencadene la crisis tales como el exceso de alcohol, las drogas, la falta de sueño, la supresión de algunos medicamentos o niveles anormales de sodio o glucosa en la sangre. En estos casos, es posible que las convulsiones repetitivas no reaparezcan una vez que se corrija el problema subyacente. Algunas convulsiones son idiopáticas, lo que quiere decir que no se puede identificar la causa. Estas convulsiones generalmente se dan entre las edades de 5 a 20 años, pero pueden ocurrir a cualquier edad. Las personas con esta condición no tienen otros problemas neurológicos, pero con frecuencia presentan antecedentes familiares de convulsiones o epilepsia. Los trastornos que afectan a los vasos sanguíneos, como un accidente cerebrovascular y accidente isquémico transitorio (AIT), son la causa más común de convulsiones después de los sesenta años de edad. Los trastornos degenerativos, como la demencia senil de tipo Alzheimer, también pueden llevar a que se presenten convulsiones (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000694.htm>).

Algunas de las causas más comunes de convulsiones abarcan:

- Problemas de desarrollo, condiciones genéticas presentes al nacer o lesiones perinatales (las convulsiones generalmente comienzan en la lactancia o en la primera infancia)
 - Anomalías metabólicas que pueden afectar a personas de cualquier edad y pueden ser el resultado de:
 - complicaciones de diabetes
 - desequilibrios electrolíticos
 - insuficiencia renal, uremia (acumulación tóxica de residuos)
 - deficiencias nutricionales
 - fenilcetonuria (PKU) que puede causar convulsiones en bebés
 - otras enfermedades metabólicas tales como la metabopatía congénita
 - consumo de cocaína, anfetaminas, alcohol u otras drogas psicoactivas
 - síndrome de abstinencia de alcohol

- síndrome de abstinencia de drogas, particularmente barbitúricos y benzodiazepinas
 - Lesión cerebral. La lesión cerebral es más común en adultos jóvenes. Las convulsiones generalmente comienzan dentro de los dos años después de la lesión aunque pueden aparecer convulsiones tempranas (dentro de las dos semanas después de la lesión), que no necesariamente indican que se desarrollarán convulsiones crónicas (epilepsia).
 - Tumores y lesiones cerebrales (como hematomas), los cuales, pueden afectar a cualquier edad, pero es más común después de los 30 años. Inicialmente son más comunes las convulsiones parciales (focales) y puede evolucionar a convulsiones tónico-clónicas generalizadas.
 - Infecciones. Las infecciones pueden afectar a personas de todas las edades y ser una causa reversible de las convulsiones. Pueden ser el resultado de:
 - infecciones cerebrales como meningitis y encefalitis pueden producir convulsiones
 - absceso cerebral
 - infecciones severas agudas de cualquier parte del cuerpo
 - infecciones crónicas (como la neurosífilis)
 - complicaciones del SIDA u otros trastornos inmunitarios

Entre los factores de riesgo se encuentran antecedentes familiares de epilepsia, traumatismo craneal u otra condición que produzca daño cerebral.

Los siguientes factores pueden presentar un riesgo de empeorar las convulsiones en una persona con un trastorno convulsivo bien controlado con anterioridad:

- Embarazo
- Falta de sueño
- Pasar por alto dosis de los medicamentos para la epilepsia
- Consumo de alcohol u otras drogas psicoactivas
- Enfermedad

2.3. FOCOS ENCEFÁLICOS DE EPILEPSIA

Si estudiamos la actividad eléctrica cerebral de un paciente antes y durante un ataque, encontraremos una serie de peculiaridades que nos permiten identificar una o más áreas cerebrales de donde se puede originar la crisis. A esto le llamamos *el foco epiléptico*. La localización del foco epiléptico y las características del ataque ha permitido clasificar los ataques epilépticos en tres grupos de crisis epilépticas:

- *Crisis Parciales*: Se caracterizan por no perder el conocimiento (excepto un subgrupo a las que se denomina crisis parciales complejas). La actividad eléctrica anormal se podrá localizar en un punto específico del cerebro.
- *Crisis Generalizadas*: Se caracterizan por pérdida súbita del conocimiento mostrando actividad eléctrica anormal simultáneamente en ambos hemisferios del cerebro.

- *Crisis Parciales con generalización secundaria:* Comienzan con signos específicos seguidos por pérdida de conciencia y podrán aparentar una generalizada si no se distingue su inicio focal.

Cada uno de estos tres tipos de crisis tiene un número de subtipos que, estudiados en detalle, pueden hacer más fácil la caracterización de un desorden epiléptico en una persona

2.3.1. CRISIS PARCIALES INICIALES

La base fisiopatológica de las crisis de comienzo parcial es una descarga epileptiforme interictal (DEI) de un grupo pequeño de neuronas corticales, que se traduce en el EEG como una punta u onda aguda. Esta DEI se produce por una despolarización prolongada calcio-dependiente, seguida de una hiperpolarización posterior, la cual, está mediada por receptores GABA y entrada de cloro, o salida de potasio, dependiendo del tipo celular. Cuando el número de neuronas que descargan es de aproximadamente un millón, se podrá observar una punta en el EEG y se deberá de extender más de 6 cm² la DEI, para que pueda ser registrado. Los mecanismos que pueden dar lugar a una transición de una DEI a una crisis pueden ser varios y, cuando estos mecanismos originan una alteración permanente, los pacientes tendrán una propensión a que las crisis recurran (*Cavazos., 2009*).

La propagación del ataque, el proceso por el cual un ataque parcial se extiende dentro del cerebro, ocurre cuando hay suficiente activación para reclutar a las neuronas circundantes. Esto conduce a una pérdida de inhibición circundante y a la propagación de la actividad del ataque en áreas cerebrales contiguas a través de conexiones corticales locales, y a más áreas distantes a través de largas vías de asociación como el cuerpo calloso. La propagación de la actividad de explosión (bursting activity) está normalmente impedida por una hiperpolarización intacta y una región de inhibición circundante creada por neuronas inhibitorias. Con suficiente activación, hay un reclutamiento de neuronas circundantes a través de numerosos mecanismos. Descargas repetidas llevan a: 1) un incremento del potasio extracelular, tendiendo a despolarizar las neuronas vecinas; 2) la acumulación de calcio en los terminales sinápticos, dando lugar a una mayor liberación de neurotransmisor; y 3) la despolarización induce a la activación del subtipo NMDA de receptores glutamatérgicos, lo que causa más entrada de calcio y activación neuronal. De igual interés, pero menos entendido, es el proceso por el cual los ataques típicamente terminan, usualmente, después de segundos o minutos.

2.5.1.1. MECANISMOS QUE LLEVAN A LA DISMINUCIÓN DE LA INHIBICIÓN

Los mecanismos que llevan a la disminución de la inhibición incluyen una inhibición defectuosa de ácido gamma-aminobutírico (GABA), y un defectivo tamponamiento o secuestro del calcio intracelular protección intracelular.

2.3.1.1.1. Inhibición defectuosa a través de los receptores GABA-A y GABA-B:

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia. Se puede unir a dos tipos de receptores: GABA-A y GABA-B. Los receptores GABA-A están junto a los canales de cloro (*Houser et al., 1996*), y ellos son uno de los principales objetivos a modular por los anticonvulsivos de que se dispone actualmente (benzodiazepinas, fenobarbital, topiramato, etc.). Cada uno de estos fármacos aumentará la frecuencia de apertura de los canales de cloro o la duración de dicha apertura. La influencia de los canales de cloro sobre el potencial de membrana, incrementa cuando las neuronas comienzan a despolarizarse por sumación de potenciales excitatorios post-sinápticos (PEPS), aumentando el umbral de despolarización. Las alteraciones en el estado normal de los canales de cloro incrementan la permeabilidad de la membrana y la conductancia de los iones de cloro. Al final, el comportamiento de todos los canales individuales de cloro se suma para formar una gran corriente de hiperpolarización, mediada por cloro, que contrarresta las corrientes de despolarización creadas por sumación de los PEPS inducidos por activación de la entrada excitatoria.

El receptor GABA-B está acoplado a canales de potasio y produce una corriente de entrada que dura más tiempo que la del canal del cloro unido al receptor GABA-A, por lo que el primero estaría implicado en el inicio de la descarga epiléptica en la crisis parcial. Las proteínas G, un sistema de mensajero secundario, median el acoplamiento con el canal de potasio, explicando la latencia y la larga duración de la respuesta. En muchos casos, los receptores GABA-B se localizan en el elemento presináptico de una proyección excitatoria. Por tanto, la liberación de GABA del terminal de la interneurona inhibe a la neurona postsináptica. Los receptores GABA-A y B están formados por diferentes subunidades y cualquier anomalía genética de alguna de ellas podría producir un cambio en el umbral convulsivógeno del paciente y por tanto a la propensión de sufrir crisis epilépticas (*Cavazos., 2009*).

2.3.1.1.2. Tamponamiento o secuestro defectuoso del calcio intracelular

En algunos pacientes, un déficit de las proteínas tamponadoras del calcio intracelular podría ser la causa de un bajo umbral convulsivógeno. Los ataques recurrentes inducidos por una variedad de métodos resultan en un patrón de pérdida de interneuronas en la región polimórfica hilar en roedores, con una pérdida sorprendente de neuronas que pierden las proteínas ligantes de calcio, paralbúmina y calbindina D-28k. En secciones hipocámpales de ratas, estas interneuronas demuestran una progresiva incapacidad para mantener una hiperpolarización del potencial de membrana en reposo; y, eventualmente, mueren. Un experimento en el que los investigadores usaron microelectrodos conteniendo el quelante de calcio (BAPTA) demostraron la inversión del deterioro en el potencial de membrana cuando al quelante de calcio se le difundió en la interneurona. El resultado muestra el papel crítico de las concentraciones adecuadas de proteínas ligantes de calcio en el interior neuronal (*Scharfman et al., 1989*). Un postulado que apoya este aspecto es la intratabilidad médica en muchos pacientes, los cuales presentan concentraciones anormalmente bajas, o incluso disfunción, de estas proteínas quelantes de calcio.

2.3.1.2. MECANISMOS QUE LLEVAN A UN AUMENTO DE LA EXCITACIÓN:

Los mecanismos que llevan a un aumento de la excitación incluyen un incremento de la activación de los receptores de glutamato de tipo NMDA, un incremento sincrónico de la actividad neuronal debido a interacciones no-sinápticas, un incremento sincrónico y/o activación debido a colaterales excitatorios recurrentes.

2.3.1.2.1. Aumento de la activación de los receptores NMDA:

El glutamato es el mayor neurotransmisor excitatorio en el cerebro. Hay varios subtipos de receptores de glutamato. Los receptores de glutamato pueden encontrarse pre- y post-sinápticamente en las células principales excitatorias así como en las interneuronas inhibitorias, y también ha sido demostrada su presencia en ciertos tipos de células gliales. Las subclases de receptores ionotrópicos de glutamato son de tipo AMPA (denominados así por su agonista, el α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato, AMPA), los NMDA (cuyo agonista es el N-metil-D-aspartato), y receptores kainato (cuyo agonista es el ácido kaínico). Éstos se diferencian entre sí por su permeabilidad catiónica, así como por su sensibilidad diferencial a los agonistas/antagonistas farmacológicos. Todos los receptores ionotrópicos de glutamato son permeables a sodio y potasio, y es la entrada de sodio y la salida de potasio a través de estos canales lo que contribuye a la despolarización de la membrana y a la generación del potencial de acción.

La liberación de glutamato causa un PEPS en la neurona postsináptica por activación de los receptores glutamatérgicos tanto ionotrópicos (AMPA/kainato y NMDA) como metabotrópicos. La neurotransmisión rápida se consigue a través de los ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos alteran la excitabilidad celular por medio de un sistema de segundos mensajeros con inicio tardío, pero de duración prolongada. La mayor diferencia funcional entre los dos receptores ionotrópicos es que el receptor AMPA/kainato abre canales que primariamente permiten el paso de cationes monovalentes (ej: sodio y potasio), mientras que el de tipo NMDA está acoplado a canales que también permiten el paso de cationes bivalentes (ej: calcio).

Estudios experimentales, utilizando modelos animales de epilepsia, han mostrado que los agonistas de NMDA, AMPA y kainato inducen convulsiones, mientras que sus antagonistas las suprimen. Los agonistas de receptores de tipo metabotrópico parecen tener efectos convulsionantes variables, que probablemente dependen de su diferente ubicación y los mecanismos de transducción de la señal. Referentes a epilepsia, ambos, glutamato y GABA, requieren recaptación activa para ser eliminados del espacio sináptico. Los transportadores para glutamato y GABA existen tanto en neuronas como en glía (fundamentalmente astrocitos). La modificación de la actividad de estos transportadores se ha comprobado que activa o suprime la actividad epiléptica en modelos animales, dependiendo del transportador que esté siendo bloqueado.

2.3.1.2.2. El aumento de la sincronía entre las neuronas debido a interacciones eléctricas:

Los campos eléctricos creados por la activación sincrónica de las neuronas piramidales en las estructuras laminares, como es el hipocampo, pueden aumentar la excitabilidad de las neuronas vecinas mediante interacciones no sinápticas (eléctricas). Otras posibles interacciones no sinápticas son las interacciones electrotónicas debidas a uniones gap o cambios en las concentraciones iónicas extracelulares de potasio y calcio.

2.3.1.2.3. Incremento de la sincronía y/o activación debido a redes colaterales recurrentes excitadoras:

Los estudios neuropatológicos de pacientes con epilepsia intratable han puesto de manifiesto frecuentes anomalías en el sistema límbico, particularmente en la formación hipocampal. Una de las lesiones más características es la esclerosis hipocampal, que consiste en un patrón de gliosis y pérdida neuronal que afecta la región polimórfica hilar y la capa de células piramidales de la CA1. Una situación más delicada, y aparentemente más común que la descrita anteriormente, es el aumento de las colaterales de las fibras musgosas. Las fibras musgosas son los axones de las células granulares y típicamente las proyectan dentro del área CA3 del hipocampo. Estas colaterales son excitadoras, por lo que su incremento aumentará el balance excitatorio total en su región diana (*Cavazos et al, 1994*).

2.3.3. CONVULSIONES INICIALES GENERALIZADAS

En la fisiopatología de las crisis de comienzo generalizado tienen una importancia fundamental las interacciones tálamo-corticales que pueden subyacer a los típicos ataques “de ausencia”. Los circuitos tálamo-corticales tienen oscilaciones rítmicas, con periodos de incremento relativo de la excitación y otros de incremento de la inhibición. Este circuito incluye a las células piramidales del neocórtex, a las neuronas talámicas de relevo y a las neuronas del núcleo reticular del tálamo (NRT). Alteraciones en este circuito pueden producir crisis de comienzo generalizado. Este circuito recibe aferencias de la médula espinal y regula la actividad de las vías colinérgicas descendentes desde los lóbulos frontales y, serotoninérgicas, noradrenérgicas y colinérgicas, ascendentes desde el tronco cerebral (*McCormick, 1992*).

Las neuronas talámicas de relevo pueden tener oscilaciones en su potencial de membrana en reposo, lo que va a incrementar la probabilidad de activación sincrónica de la neurona piramidal neocortical durante la despolarización, lo que reduce significativamente la probabilidad de activación neocortical durante la hiperpolarización relativa, lo que, a su vez hace que la actividad de la corteza cerebral se sincronice y produzca la crisis. Estas oscilaciones en el potencial de membrana van a estar producidas por una disminución transitoria del umbral de los canales de calcio tipo T. Los canales calcio-T tienen tres estados funcionales: abiertos, cerrados e inactivados. El calcio entra en la célula cuando los canales de calcio-T están abiertos. Inmediatamente después de cerrados, el canal no se puede abrir otra vez hasta que no alcance un estado

de inactivación. Las neuronas de relevo talámicas tienen receptores GABA-B en el soma y reciben activación tónica por liberación de GABA desde la proyección NRT de la neurona talámica de relevo. El resultado es una hiperpolarización que sacan a los canales de calcio-T fuera del estado inactivo, permitiendo la apertura sincrónica de una larga población de canales de calcio-T cada 100 milisegundos aproximadamente (*Hosford et al., 1992*).

Los anticonvulsivos que previenen las crisis generalizadas tipo "pequeño mal", como el ácido valproico y la etosuximida, suprimen la corriente de calcio, bloqueando estos canales de calcio tipo T. Sin embargo, otros anticonvulsivos que incrementan los niveles de GABA, como la gabapentina y la tiagabina, producen una exacerbación de las crisis de "pequeño mal". Este incremento de los niveles de GABA podría producir una hipersincronización del circuito tálamo-cortical mediante una hiperactivación de los canales de calcio tipo T.

3. EPILEPSIA Y DEFICIENCIAS EN LA MIGRACIÓN NEURONAL (neural y molecular)

3.1. INTRODUCCIÓN

La adquisición definitiva de la estructura fisiológica sigue una serie de complejas etapas reguladas por los procesos normales de desarrollo y las influencias del medio externo. Se han descrito una serie de etapas en este proceso que son fundamentales, en el sentido de que un fallo en alguna de ellas puede desembocar en consecuencias dramáticas. De ahí la importancia de determinar procesos tan decisivos como la maduración secuencial de neuronas así como el establecimiento de sinapsis y mapas corticales. Esto también es importante para determinar como se desarrollan espaciotemporalmente los diferentes eventos, y como la actividad neuronal interviene en todas estas etapas y modula, para bien o para mal, el resultado. Una consecuencia fundamental de esta secuencia de eventos es que cualquier interrupción puede dar lugar a consecuencias muy diferentes dependiendo de cuando ésta ocurra. Un aspecto obvio de estas características generales está relacionado con los ataques epilépticos. De hecho, durante el desarrollo del cerebro, tanto en humanos como en modelos animales, hay una alta incidencia de descargas; y estas experiencias pueden producir consecuencias a largo plazo que también son estado-dependientes.

Existe una paradoja para la epilepsia en lo que concierne al desarrollo del cerebro. La incidencia de los ataques es más alta en la vida temprana y los ataques dan lugar a secuelas importantes y duraderas; todo esto a pesar de que las neuronas inmaduras son menos vulnerables que las adultas a una gran variedad de daños, como por ejemplo, episodios "anoxo-isquémicos". En otras palabras, los ataques son más frecuentes en esta etapa, indicando que las redes neuronales inmaduras están dotadas de una alta capacidad de excitabilidad y de desarrollar eventos sincronizados.

Estas, y otras observaciones llevaron a algunas conclusiones: Primero, los ataques se generan más fácilmente durante el desarrollo del cerebro porque uno o más

de los mecanismos que en adultos previenen la actividad excesiva, no están aún establecidos en ese momento. Segundo, los ataques pueden producir sus efectos por una alteración de procesos generales más que "simplemente" por causa de puntuales lesiones neuronales. (*Ben-Ari, 2005*).

3.2. MECANISMOS TEMPRANOS DE EXCITACIÓN NEURONAL

En un amplio rango de sistemas neuronales, los receptores sinápticos están presentes antes de que el propio aparato sináptico esté completamente establecido, y la cuestión es si estos receptores son capaces de conferir algún tipo de funcionalidad a las sinapsis en formación. En otras palabras, ¿la intervención de factores medio ambientales, incluyendo actividad neuronal, comienza con la formación definitiva de las sinapsis o ésta ocurre en un estado temprano, cuando las sinapsis todavía no son operativas?.

Si en estas etapas los neurotransmisores son liberados y son capaces de actuar sobre neuronas inmaduras, que se encuentran dotadas de receptores aunque sus sinapsis no estén completamente establecidas, estos neurotransmisores podrían ser capaces de generar una corriente de despolarización por activación de estos receptores ya presentes. Partiendo de esta base, Yehezkel Ben-Ari y su equipo (*Ben-Ari, 1997*), por medio de la técnica del *patch-clamp*, registraron neuronas inmaduras en las que, mientras las respuestas sinápticas convencionales rápidas no podían ser generadas, la estimulación eléctrica evocaba corrientes gigantescas que eran de varios órdenes de magnitud mayores que las corrientes sinápticas convencionales. Observaron, además, que estas corrientes estaban mediadas por la activación de receptores GABA y glutamato tipo NMDA, pero no por receptores AMPA, que son responsables, en su mayoría, como receptores ionotrópicos, de la neurotransmisión rápida en el cerebro adulto. Dicho equipo también encontró que hay una liberación tónica de GABA y glutamato en las etapas tempranas, desde que un antagonista del receptor de GABA genera una corriente tónica, desencadenando así una continua liberación de GABA (*Demarque et al., 2002*).

Los mecanismos de liberación son únicos en el sentido de que no siguen los mecanismos normales a través de los cuales se produce la liberación vesicular de proteínas y factores. De hecho, esta liberación puede ser inducida incluso en animales en los que el mecanismo de liberación de neurotransmisor ha sido inhabilitado. Esta liberación paracrina de GABA actúa sobre neuronas situadas a cierta distancia y genera en ellas grandes corrientes, antes incluso de la formación de las sinapsis. En un estado más tardío, este sistema desaparece y es reemplazado por la acción focal (sináptica), más convencional de los transmisores. Por tanto, existe un mecanismo que permite la comunicación entre las neuronas antes incluso de la formación y maduración de las sinapsis. Este mecanismo se basa en una liberación no-canónica de transmisor que puede actuar de forma difusa en sitios alejados de su lugar de liberación.

3.2.1. LIBERACIÓN DE TRANSMISOR Y MIGRACIÓN NEURONAL

¿Tiene implicaciones funcionales la liberación paracrina de neurotransmisores y puede ésta afectar de algún modo a la migración neuronal? Yehezkel Ben-Ari y su equipo (2005), probaron el posible papel de esta liberación paracrina sobre la migración en estudios *in vitro*, usando una original estrategia, según la cual, dos rodajas hipocampales fueron cocultivadas una al lado de otra. Una de las rodajas se obtuvo de un ratón transgénico cuyas células expresaban la proteína verde fluorescente GFP, de modo que se podía seguir fácilmente el proceso de migración de estas neuronas verdes sobre la rodaja procedente de un ratón silvestre.

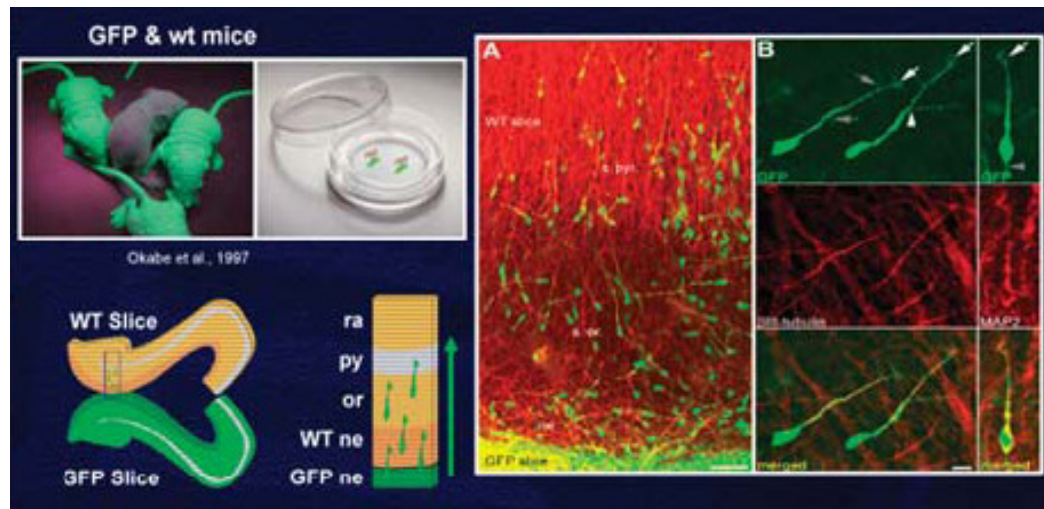


FIGURA 11. Cocultivo de rodajas de corteza cerebral de un ratón silvestre y un ratón verde (por expresión de GFP) para visualizar la migración de neuroblastos. (Manent et al. *J Neurosci* 2005).

Observaron que, bloqueando los receptores GABA, se retardaba considerablemente la migración neuronal, dato que sugeriría que la migración estaría modulada por la acción paracrina, no-focal, de los neurotransmisores, fundamentalmente del GABA. Éstas y otras observaciones están en línea con la evidencia de que el GABA es un agente morfogenético que, en etapas tempranas, no sólo modula la migración neuronal, sino que también está implicado en procesos de diferenciación. Así, los neurotransmisores, principalmente el GABA, pueden modular los procesos de desarrollo temprano actuando sobre los receptores que son, en ese momento, en esencia, extra-sinápticos. Por ello, los agentes que actúan sobre los receptores GABA se puede esperar que actúen sobre neuronas que se encuentren en una fase en la que pocas o incluso ninguna sinapsis esté completamente establecida o madura.

3.3. DESÓRDENES DE LA MIGRACIÓN NEURONAL

La migración neuronal es una compleja etapa ontogénica cuyo control implica a diferentes poblaciones celulares y la integración de múltiples mecanismos moleculares. La complejidad y multiplicidad de estos mecanismos explica la

heterogeneidad clínica, anatomohistológica y genética en que derivan los desórdenes de la migración neuronal (tabla 1) (*Gressens, 2000*).

El desarrollo cortical anormal representa la principal causa de epilepsia. El grado de afectación es muy variado, de modo que se pueden encontrar malformaciones severas, que se manifiestan con un profundo retraso del desarrollo y ataques tempranos, hasta malformaciones más ligeras, sólo detectables después de la primera crisis, con debut a diferentes edades, mientras que por lo demás se trata de individuos sanos.

En los últimos años ha habido un mayor progreso en el reconocimiento del diagnóstico de tales malformaciones, especialmente a través del uso de las imágenes por resonancia magnética (MRI). Variaciones en la distribución y profundidad de los surcos corticales, el grosor cortical y los límites entre las sustancias blanca y gris, son características que permiten el reconocimiento de diferentes patrones de malformación. Las anomalías en cualquiera de estas características, o en todas ellas, pueden ser restringidas a áreas corticales discretas o, alternativamente, difusas. El estudio de muchos casos homogéneos y la comparación con estudios neuropatológicos clásicos ha permitido la construcción de subdivisiones nosológicas y, estudios de acoplamiento genético han llevado a la identificación varios genes que regulan el desarrollo del cerebro. Algunas malformaciones corticales están asociadas directamente con síndromes epilépticos particulares o con determinados tipos de ataques. Revisamos estas malformaciones del córtex cerebral para las cuales ha sido elucidada, o se sospecha, una base genética y los tipos asociados de epilepsia (*Guerrini et al., 2001*).

3.3.1. LISENCEFALIA

La lisencefalia (incluyendo agiria y paquigiria) es la más severa de las malformaciones conocidas resultante de una migración neuronal defectuosa. Defectos menos severos en los mismos genes y procesos del desarrollo resultan en heterotopía subcortical en banda. En este grupo de malformaciones, las neuronas comienzan su proceso migratorio pero no lo completan. Las mutaciones de seis genes han sido asociadas a diferentes tipos de lisencefalia: *Lis1* (*Lisencefalia1*), autosómico dominante), *Dcx* (*Doblecortina*, dominante ligado al cromosoma X), *TUBA1A* (*Tubulina alfa 1A*, autosómico dominante), *Reln* (*Reelina*, autosómico recesivo), *VLDLR* y *Arx* (*Aristaless*, dominante ligado al cromosoma X) (*Pang et al., 2008*). Los fenotipos asociados incluyen lisencefalia secuencial aislada (*Dcx* en machos, *Lis* y raramente *TUBA1A*), heterotopia subcortical en banda (*Dcx* en hembras y excepcional en machos, y *Lis1*), síndrome de Miller-Dieker (co-delección de *Lis1* y *YWHAE*), lisencefalia moderada con hipoplasia cerebral “grupo b” o el “síndrome de desequilibrio” (*Reln* y *VLDLR*) y lisencefalia ligada al cromosoma X con genitales anormales (*Arx*).

Las mutaciones de *Lis1* (incluyendo delecciones), *Dcx* y *TUBA1A* representan el 65%, 12% y un desconocido, pero pequeño porcentaje, respectivamente, de pacientes con lisencefalia y generalmente causan fenotipos similares, tales como microcefalia, retraso mental, con o sin epilepsia, y déficits motores (*Pang et al., 2008*). Todas las proteínas codificadas por estos genes regulan la función de microtúbulos y dineína citoplasmática y, al menos en el caso de *Lis1*, interfieren con la migración neuronal

TABLA 1. Malformaciones del desarrollo cortical con los genes asociados y las características clínicas.

Etapa del desarrollo	Malformación cortical	Causa Genética	Características clínicas
Migración neuronal anormal	Heterotopia Periventricular	FLNA	Inteligencia normal, primeros ataques en la adolescencia, trastornos ligados a X con letalidad en machos
	Heterotopia en banda subcortical	ARFGEF2 DCX	Retraso mental, microcefalia Heterotopia en banda subcortical en hembras, retraso mental, epilepsia
	Lisencefalia	LIS1 DCX	Síndrome de Miller-Dieker Lisencefalia en machos
		TUBA1A	Lisencefalia, características clínicas similares a las causadas por LIS1 y DCX
Detención anormal de la migración neuronal	Lisencefalia cobbestone	ARX	Asociado con ambigüedad genital, disfunción hipotalámica, epilepsia neonatal
		RELN	Asociado con hipoplasia cerebelar, epilepsia
Organización neuronal anormal	Polimicrogiria	<i>Fukutin</i>	Distrofia muscular congénita de Fukuyama
		POMGnT1	Enfermedad cerebro ojo Músculo
		POMT1 GPR56	Síndrome de Walker-Walburg Polimicrogiria frontoparietal bilateral, epilepsia

afectando a distintos mecanismos: bloqueo de los microtúbulos que dirigen el movimiento nuclear en los neuroblastos de la zona ventricular, conversión de las neuronas postmitóticas nacientes en células premigratorias multipolares y conversión de células multipolares en bipolares (*Guerrini et al., 2007*).

El gen TUBA1A codifica la proteína alfa tubulina específica del cerebro. Las tubulinas alfa y beta son los componentes principales de los microtúbulos. En humanos, las mutaciones en TUBA1A afectan al plegamiento de los heterodímeros de tubulina y también influyen en las interacciones entre los microtúbulos y las proteínas que se unen a ellos (Doblecortina y cinesina KIF1A) (*Moores et al., 2004*). Dada la importancia del papel de los microtúbulos en la migración neuronal, es razonable pensar que disrupciones en la función de los microtúbulos provocan déficits en la motilidad de las células progenitoras neuronales y, de este modo, lisencefalia (*Poirier et al., 2007; Keays et al., 2007*). Las mutaciones en estos tres genes dan lugar a la forma clásica de lisencefalia o lisencefalia tipo I, en la cual, el grosor cortical está incrementado cuatro veces y produce un gradiente identificable en el que la malformación es más severa en la región anterior (mutaciones en *Dcx*) o en la posterior (mutaciones en *Lis1* y TUBA1A) (*Guerrini., 2007*).

Las cuatro capas corticales se componen de una capa molecular, una desorganizada capa celular exterior, una capa plexiforme pobre en células, y una capa celular interna (probablemente compuesta por neuronas cuya migración se ha detenido prematuramente) (*Gressens., 2000*) (figura 12).

El síndrome de Miller-Dieker (caracterizado por lisencefalia con adicionales características faciales distintivas, tales como, frente prominente, nariz corta, labio superior prominente y mandíbula pequeña (*Dobyns et al., 1991.*) y hasta un 40% de los casos de lisencefalia aislada (*Lo Nigro et al., 1997*) resultan de una hemidelección o mutaciones del gen *Lis1*. *Lis1* codifica la subunidad beta de la acetilhidrolasa del cerebro, la cual, degrada el factor activador de plaquetas (PAF). En consecuencia, la estimulación *in vitro* del receptor PAF interrumpe la migración neuronal (*Bix 1998*) y ratones con un alelo *Lis1* inactivo muestran retraso en la migración neuronal hipocámpal y cortical (*Hirotsune et al., 1998*). PAF es un fosfolípido que actúa en el cerebro sobre los receptores presentes en los terminales sinápticos y las membranas intracelulares. Como PAF incrementa la concentración de calcio intracelular e incrementa las corrientes iónicas mediadas por el receptor NMDA, es tentador especular que algunas anomalías del cerebro observadas en el síndrome de Miller-Dieker son secundarias a un exceso de transmisión glutamatérgica. Una hipótesis alternativa es que la acetilhidrolasa de PAF podría actuar como vínculo entre la red de microtúbulos y el aparato que permite la motilidad a las neuronas que migran (*Walsh, 1999*).

Las mutaciones de *Arx* son una causa rara de lisencefalia (*Kato, 2004*). Este gen es un factor de transcripción que regula la migración tangencial de interneuronas desde regiones ventrales (eminencia ganglionar) al córtex en desarrollo (*Kitamura et al., 2002*). Los ataques epilépticos severos están relacionados con una deficiencia severa de interneuronas inhibitorias, y sugiere un mecanismo novedoso para algunas formas de epilepsia severa de aparición temprana. Los pacientes con mutaciones en *Arx* poseen anomalías de los ganglios basales y ausencia de cuerpo calloso (*Kato et al., 2004*),

mientras que aquellos con mutaciones *Reln* y *VLDLR* poseen menor grosor cortical, ausencia de una zona escasa de células e hipoplasia cerebelar profunda (figura 12) (*Boycott et al., 2005; Hong et al., 2000*).

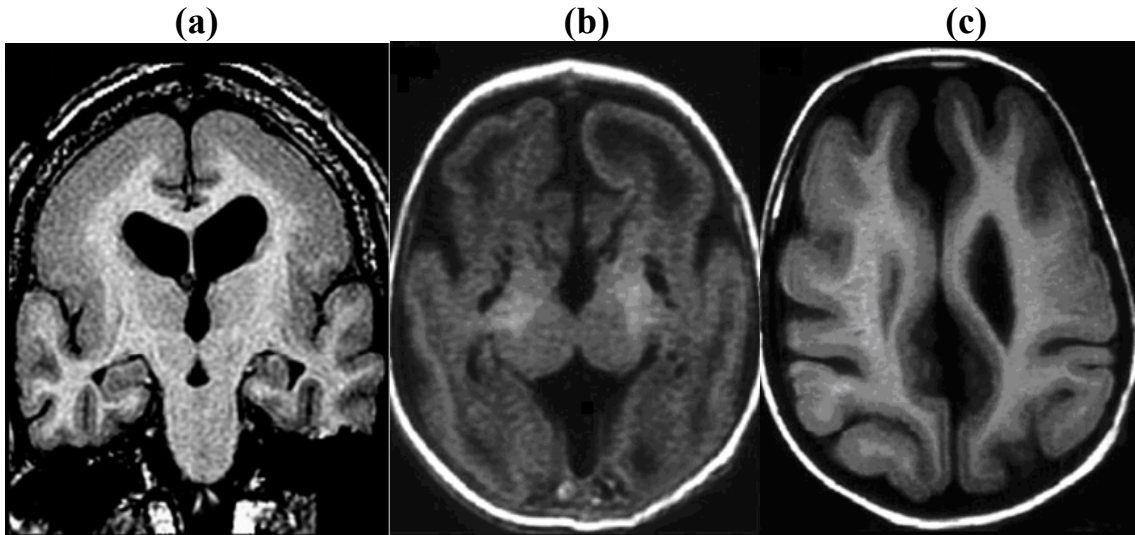


FIGURA 12. Lisencefalia. (a) Lisencefalia con mutación en el gen *Dcx* en la que se observa una malformación cortical severa en los lóbulos frontales. (b) Lisencefalia por mutación en *Arx*. Está caracterizada por ausencia del cuerpo calloso, una displasia quística en los ganglios basales y agiria occipitotemporal. (c) Lisencefalia por mutaciones en el gen que codifica para la Reelina. Está caracterizada por un engrosamiento cortical severo e hipoplasia cerebelar profunda.

3.3.2. LISENCEFALIA TIPO II O "COBBLESTONE"

Este tipo de lisencefalia es provocada por desórdenes en la detención de la migración neuronal. Se caracteriza por una apariencia nodular del córtex cerebral causada por una desorganización de las capas corticales, y una migración de las neuronas que sobrepasa la superficie pial del cerebro hacia las leptomeninges, afectando a la lámina basal externa y a la capa externa de la corteza (*Pang et al., 2008*). Estas estructuras funcionan como lindero, evitando la fusión de las circunvoluciones adyacentes e impidiendo a la capa cortical invadir las meninges. Un defecto en estas estructuras lleva a la fusión de las circunvoluciones contiguas y a la penetración del tejido cortical en las meninges (figura 13).

Según su severidad, la lisencefalia de tipo II se divide en tres clases diferentes. La forma más leve se conoce como distrofia muscular congénita de Fukuyama (DMCF) y afecta principalmente a la población japonesa (*Fukuyama et al., 1981*). Los pacientes típicamente presentan hipotonía, debilidad general en su infancia, retraso mental y muchos de ellos, epilepsia. La forma moderada se conoce como Enfermedad Músculo Ojo Cerebro, la cual, afecta principalmente a la población finlandesa (*Santavuori et al., 1989*). Los pacientes padecen retraso mental, ataques mioclónicos y distrofia muscular congénita. Finalmente, la forma más severa de lisencefalia tipo II se conoce como

Síndrome de Walder-Walburg (SWW) y los pacientes mueren a los pocos meses de vida (*Dobyns et al., 1989*). Se caracteriza por anomalías complejas del sistema nervioso central, alteraciones oculares y distrofia muscular congénita.

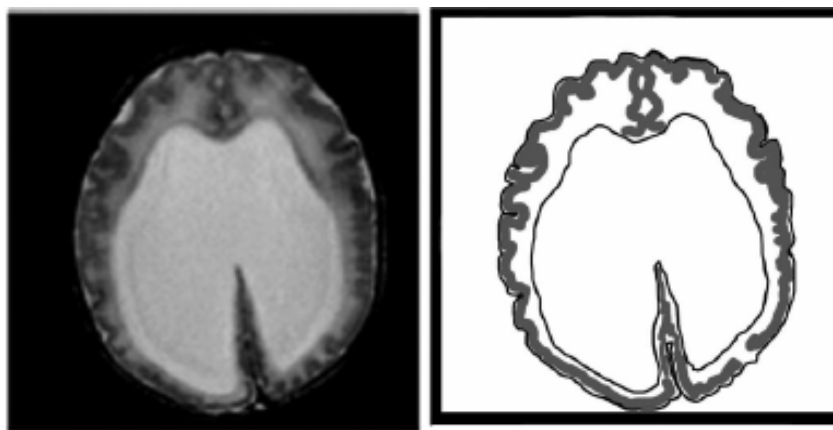


FIGURA 13. Lisencefalia tipo II o “cobblestone”. Imagen de resonancia magnética axial de un cerebro con lisencefalia tipo II o cobblestone. Se puede observar la apariencia “cobblestone” del córtex, la ausencia de cuerpo calloso, y los ventrículos laterales dilatados.

La lisencefalia cobblestone sigue un patrón de herencia autosómica recesiva. Se han identificado cuatro genes asociados a ella: POMT1 y POMT2, para el SWW; POMGnT1 ligado al cromosoma 1p32-34 para la Enfermedad Músculo Ojo Cerebro (*Yoshida et al., 2001*); y *Fukutin* para la DMCF (*Toda et al., 1994*). Todos estos genes están implicados en la glicosilación del distroglicano alfa, que es una proteína que actúa como receptor de múltiples moléculas de la matriz extracelular encargadas de mantener la estabilidad de la superficie celular. Mutaciones en estos genes afectan a la O-glicosilación del distroglicano alfa, influyendo así sobre la integridad del complejo de adhesión matriz extracelular-distroglicano, lo cual conduce a un debilitamiento de la integridad estructural de la zona marginal superficial o del córtex. Las neuronas que están migrando son capaces de "sobre-migrar" más allá de la barrera estructural sobre la superficie pial, formando la típica superficie cobblestone (en adoquines) o baches (*Pang et al., 2008*).

3.3.3. HETEROTOPÍA PERIVENTRICULAR

La heterotopía consiste en la acumulación de grupos de neuronas normales en localizaciones anormales. El tipo más común es la heterotopía nodular periventricular, en la que se observan restos de acúmulos neuronales que nunca comenzaron la migración, junto a los ventrículos laterales (figura 14) (*Guerrini et al., 2007*). Esta afección representa un desorden en el inicio de la migración, en una pequeña subpoblación de neuronas, a pesar de esto, la mayoría de las neuronas migran exitosamente al córtex cerebral. Los nódulos heterotópicos consisten en neuronas de apariencia normal y células gliales (*Tassi et al., 2005*).

La mayoría de los pacientes desarrolla varios tipos de ataques convulsivos que suelen aparecer en la adolescencia. Aproximadamente el 90% de ellos padecen epilepsia

(Dubeau *et al.*, 1995). Todavía no está clara la relación entre la severidad de la epilepsia y la extensión de las masas heterotópicas. En general, estos pacientes poseen una inteligencia normal; aunque algunos presentan problemas de aprendizaje (Chang *et al.*, 2005).

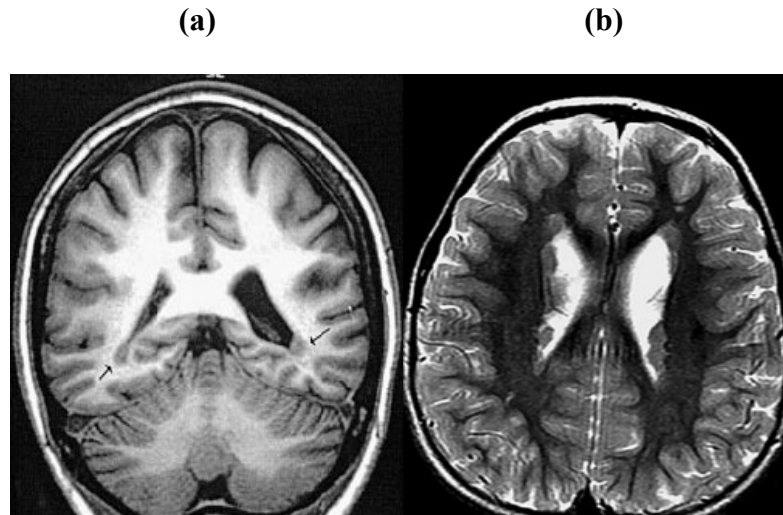


FIGURA 14. (a) Heterotopia periventricular bioccipital (flechas). (b) La heterotopia nodular periventricular son nódulos de sustancia gris adyacente a los ventrículos laterales.

Se han descrito varios síndromes. El más común es el bilateral clásico (PNH), el cual es mucho más frecuente en hembras; más del 50% tienen mutaciones del gen *FlnA* (*Filamina A*) ligado al cromosoma X. *FLNA* es una fosfoproteína que se une a actina, estabiliza el citoesqueleto y media la adhesión focal a lo largo del epitelio ventricular (Lu *et al.*, 2006). La microcefalia recesiva autosómica con heterotopia periventricular es un raro fenotipo causado por mutaciones de *ARFGEF2*. *ARFGEF2* codifica la proteína *BIG2*, la cual, convierte la guanina bifosfato en guanina trifosfato, y por lo tanto, activa a los factores de ADP-ribosilación. Los factores de ADP-ribosilación regulan el tráfico vesicular y el transporte de moléculas desde el interior de la célula hasta su superficie, donde pueden unirse e interactuar con otras sustancias, o ser secretadas por la célula. Respecto a esto, *ARFGEF2* puede ayudar en el transporte de *FLNA* a la superficie celular. *FLNA* puede ser requerido, posteriormente, para la adhesión inicial de las neuronas al andamio de glía radial antes de migrar desde la zona ventricular (Lu *et al.*, 2005). Un fallo en la unión de las neuronas migratorias a la glía radial puede llevar a la formación de heterotopia.

3.3.4. HETEROTOPIA EN BANDA SUBCORTICAL

La heterotopia en banda subcortical, también conocida como síndrome del "córtex doble", es un trastorno de la migración neural caracterizado por la presencia de bandas simétricas y bilaterales de sustancia gris heterotópica localizada entre las paredes ventriculares y el manto cortical y separadas entre sí por una delgada capa de sustancia blanca (figura 15) (Flores Río, 2006). Dicho síndrome aparece principalmente en hembras y típicamente causa retraso mental en diferentes grados y la mayoría

padecen de epilepsia. Aproximadamente dos tercios de los pacientes con epilepsia, con el tiempo, desarrollan ataques intratables (*Guerrini et al., 2001*).

La RMI de un cerebro con heterotopia en banda subcortical muestra dos capas paralelas de sustancia gris: una fina cinta exterior y una gruesa banda interior, separadas por una capa muy fina de sustancia blanca (figura 15). La gravedad de la epilepsia y el retraso mental está directamente relacionada con el grado de detención de la migración, como se indica por el grosor de la banda heterotópica (*Barkovich et al., 1994*).

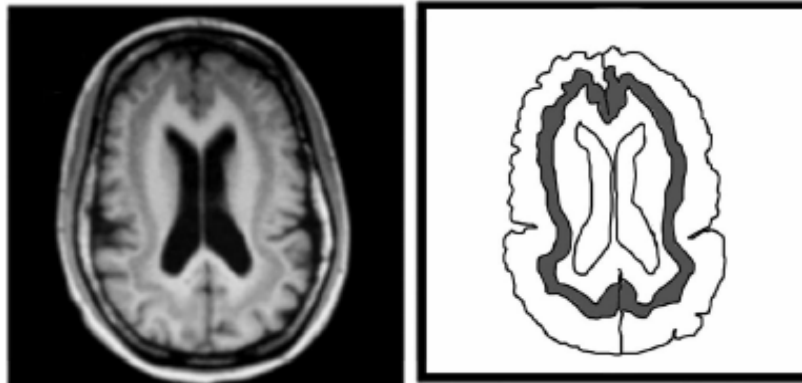


FIGURA 15. Heterotopia en banda subcortical. Imagen de resonancia magnética axial de un paciente con una mutación en *Dcx*. Se puede observar la gruesa banda de sustancia gris situada profundamente y paralela al delgado córtex exterior. Una fina banda de sustancia blanca separa el córtex exterior y la banda subcortical interior de neuronas heterotópicas.

La heterotopia en banda subcortical está causada por mutaciones en el gen *Dcx*. La proteína *DCX* dirige la migración neuronal, ya que regula la organización y la estabilidad de los microtúbulos, necesarios para la motilidad neuronal. La malformación aparece principalmente en hembras, donde el gen se encuentra en el cromosoma X. Como hay dos cromosomas X en hembras, después de la inactivación de uno de ellos, sólo algunas neuronas pierden la expresión de *Dcx*. Estas neuronas con el gen *Dcx* mutado no migran dentro del córtex y así forman la banda heterotópica subyacente, mientras que las neuronas que expresan el gen normal migran con éxito al plato cortical. Los hombres con mutaciones en *Dcx*, sin embargo, desarrollan lisencefalia clásica (*Pang et al., 2008*).

3.3.5. POLIMICROGIRIA

El término polimicrogiria define un número excesivo de circunvoluciones pequeñas y anormales separados por surcos superficiales, que forman una superficie cortical irregular (figura 16) (*Guerrini et al., 2007*). La polimicrogiria puede ser focal o difusa, unilateral o bilateral (figura 17). La unilateral puede estar asociada con varias discapacidades cognitivas, hemiparesis, ataques focales, y defectos en el campo visual (*Chang et al., 2006*). La afectación bilateral del córtex aparece frecuentemente, con una distribución simétrica o asimétrica, afectando a las regiones frontal, fronto-parietal, parieto-occipital, perisilviana, y occipital. Esta es una malformación cortical común y

está asociada con una vertiginosa serie de manifestaciones clínicas y síndromes. Como por ejemplo, la polimicrogiria frontoparietal bilateral o el síndrome perisilviano bilateral congénito.

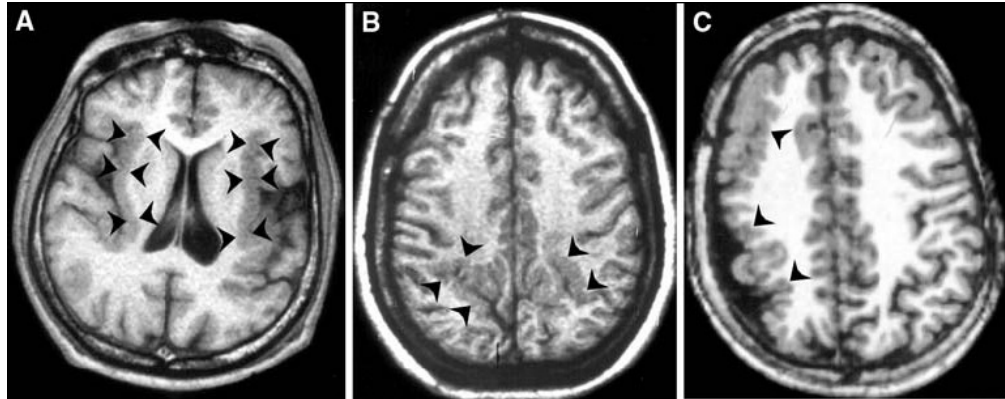


FIGURA 16. Imágenes de Resonancia Magnética axial (a) Polimicrogiria perisilviana bilateral. Las fisuras silvianas están abiertas y el córtex está engrosado e irregular (flechas negras). Varón joven con síndrome de Lennox-Gastaut (b) Polimicrogiria parasagital bilateral. Engrosamiento irregular del córtex (flechas negras). Chica joven con epilepsia parcial intratable. (c) Polimicrogiria unilateral. El hemisferio derecho es más pequeño que el izquierdo y el espacio subaracnoideo subyacente al hemisferio izquierdo está dilatado (flechas negras). El córtex de la derecha es irregular, con áreas engrosadas. Varón de ocho años con hemiparesis izquierda, retraso mental moderado, ausencias atípicas y ataques motores parciales.

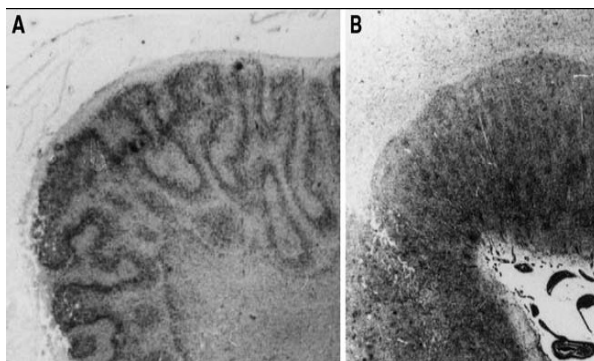


FIGURA 17. (a) Polimicrogiria con las cuatro capas características en el córtex temporal. Se observa la microgiria con las capas moleculares fusionadas. (b) Ampliación del córtex en la que se puede apreciar su apariencia irregular y una pérdida de la laminación normal en seis capas.

La polimicrogiria ha sido asociada con mutaciones de algunos genes incluyendo: SPRX2 (Roll *et al.*, 2006), PAX6 (Glaser *et al.*, 1994), TBR2 (Baala *et al.*, 2007), KIAA1279 (Brooks *et al.*, 2005), RAB3GAP1 (Aligianis *et al.*, 2005) y COL18A1 (Sertie *et al.*, 2000). Además, la polimicrogiria parietal y bilateral frontal están asociadas con mutaciones en el gen receptor acoplado a proteínas G (GPR56). La expresión de este gen parece ser mayor en las células progenitoras neuronales a lo largo de las zonas ventricular y subventricular. La hipótesis es que este gen juega un papel en la organización regional del cerebro (Pang *et al.*, 2008).

Los estudios de desarrollo están disponibles sólo para los genes PAX6 y TBR2, pero éstos sugieren un mecanismo importante. Específicamente, los homólogos de estos dos genes, más el gen Trb1, son expresados secuencialmente por glía radial (Pax6), progenitoras celulares intermedias (Tbr2) y neuronas postmitóticas (Tbr1) en el neocórtex en desarrollo, una vía de desarrollo que produce muchas neuronas corticales

de proyección. La interrupción de esta vía puede llevar a la pérdida de neuronas corticales o alterar su destino final.

Un desorden conocido como polimicrogiria frontoparietal bilateral (BFPP) está asociado con mutaciones en el gen GPR56. GPR56 codifica para un receptor acoplado a proteínas G que se expresa en las células neurales progenitoras de las zonas germinales ventricular y subventricular durante los periodos de neurogénesis (Piao *et al.*, 2004). Normalmente, la proteína GPR56 sufre dos grandes modificaciones, escisión de su dominio GPS y N-glicosilación; el fragmento N-terminal puede ser liberado de la superficie celular. Parece ser que las mutaciones en GPR56 resultan en una alteración en el tráfico de la proteína mutante a la membrana plasmática (Jin *et al.*, 2007). Las características que acompañan a la BFPP (defectos en la mielinización, displasia cortical cerebelar con quistes) se asemejan más a aquellas de las llamadas malformaciones "cobblestone" (enfermedad Músculo Ojo Cerebro y distrofia muscular congénita de Fukuyama) que también están asociadas con defectos en la N-glicosilación del cerebro en desarrollo. Por tanto, este desorden es mejor clasificarlo como una malformación de tipo "cobblestone".

La extensión y localización de la anomalía cortical influye en la severidad de las manifestaciones neurológicas. El córtex polimicrogírico en las áreas relacionadas con el lenguaje, alrededor de la fisura perisilviana izquierda, fue identificado en una autopsia en individuos con displasia en el desarrollo o dislexia (Cohen *et al.*, 1989), y es considerada por ser una importante causa de desórdenes del lenguaje del desarrollo. Las mutaciones del gen SRPX2 se han asociado con polimicrogiria perisilviana bilateral, la cual, normalmente va acompañada de dispraxia, pero también con dispraxia y convulsiones en individuos con un MRI normal (Roll *et al.*, 2006). Estas observaciones, y el descubrimiento de que el gen ortólogo *Srpx2* no es detectado durante la embriogénesis en murinos, sugiere un mayor papel del gen SRPX2 en el desarrollo y el funcionamiento de las áreas relacionadas con el lenguaje en humanos.

4. ABORDAJES EXPERIMENTALES Y POSIBILIDADES TERAPEÚTICAS

4.1. INTRODUCCIÓN

A pesar de los recientes avances en el desarrollo de nuevas drogas antiepilépticas, la epilepsia sigue representando un gran problema clínico. Actualmente hay algunas terapias dirigidas a solucionar los procesos subyacentes a la enfermedad, pero se necesita urgentemente el desarrollo nuevas aproximaciones terapéuticas.

La epilepsia, como ya hemos visto anteriormente, se debe a un desequilibrio entre el sistema glutamatérgico, que media las redes excitatorias y los sistemas GABAérgicos, que median las redes inhibitorias, a cambios en la función y composición de los receptores ionotrópicos, a alteraciones en las actividades mediadas

por calcio como segundo mensajero, o a la alteración de las actividades anticonvulsivas endógenas y neuroprotectoras (tabla 2).

TABLA 2. Causas de epilepsia y posibles intervenciones terapéuticas.

Causes for Epilepsy	Therapeutic Intervention*
Changes in ion channels: K ⁺ , Na ⁺ , Ca ⁺⁺	Modulation of ion channels: carbamazepine, phenytoin, valproate, ethosuximide, lamotrigine, levetiracetam; Ineffective in pharmacoresistant epilepsy
Decreased inhibitory neurotransmission	Increase of inhibitory neurotransmission: barbiturates, benzodiazepines, felbamate, vigabatrin, tiagabin, gabapentin; Ineffective in pharmacoresistant epilepsy
Excessive excitatory neurotransmission	Decrease of excitatory neurotransmission: felbamate, topiramate; Ineffective in pharmacoresistant epilepsy
Deficiency in endogenous neurotransmitters and neuromodulators	Restoration/augmentation of neuromodulatory systems: GABA, adenosine, galanin, neuropeptide Y; Focal application by cell and gene therapies; Effective in pharmacoresistant epilepsy?

*algunas de las drogas enumeradas aquí poseen más de un modo de acción

Así, disfunciones en los componentes de estos bloques de redes neuronales se combinan, provocando excesivas descargas de las neuronas, lo que causa ataques epilépticos y el posterior daño cerebral (Holmes *et al.*, 2003). Aparte de la disfunción de las redes neuronales, el papel de la astrogliá en la epileptogénesis está siendo cada vez más reconocido, añadiéndose así un nivel adicional de complejidad a los procesos que subyacen a esta enfermedad (Borges *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2005).

La farmacoterapia convencional para la epilepsia ha estado dirigida, en gran medida, hacia los canales iónicos postsinápticos responsables de la neurotransmisión y de la modulación de los diferentes sistemas de neurotransmisores. Sin embargo, a pesar del tratamiento óptimo con las actuales drogas antiepilépticas, la aparición de tolerancia (Loscher *et al.*, 2006) y los importantes efectos secundarios de éstas, siguen siendo grandes problemas, junto con que los ataques persisten en el 35% de los pacientes con epilepsia (Nadkarni *et al.*, 2005). Para estos casos intratables, la resección quirúrgica ofrece una última opción, pero sólo si el inicio de los ataques se restringe a un foco discreto y si la intervención quirúrgica no interfiere con funciones cerebrales esenciales (Boison, 2007). Aunque la cirugía de la epilepsia tiene efectos paliativos en muchos pacientes, una terapia menos invasiva constituiría un mayor avance terapéutico para el

tratamiento de la epilepsia. Aparte del control de los ataques, la prevención de la epileptogénesis sigue siendo un importante objetivo terapéutico.

Recientemente han surgido nuevos conceptos sobre los mecanismos endógenos del cerebro que controlan y modulan la excitabilidad neuronal y la epileptogénesis y éstos han abierto nuevos horizontes para el desarrollo, no sólo, de nuevos fármacos anticonvulsivos, sino también de terapias antiepileptogénicas. Así, aparte de los conocidos efectos anticonvulsivos del GABA, neuromoduladores como la adenosina, galanina, o el neuropéptido Y poseen potentes efectos anticonvulsivos y antiepileptogénicos. Sin embargo, la aplicación sistemática de estos compuestos se ve comprometida por una viabilidad limitada, una mala penetración a través de la barrera hematoencefálica, y/o la amplia distribución de sus respectivos receptores (*Boison, 2007*). A pesar de todo, el desarrollo de estas terapias celulares experimentales y genéticas puede tener importantes ventajas en comparación con la farmacoterapia sistémica convencional: (i) Especificidad sobre los mecanismos que subyacen a la patogénesis; (ii) especificidad sobre las redes epileptogénicas por liberación focal; y (iii) anulación de los efectos secundarios.

Por tanto, en los últimos años se ha abierto un nuevo campo de neurofarmacología basada en terapias génicas y celulares, destinadas tanto a la entrega de compuestos anticonvulsivos endógenos por trasplante intracerebral de células modificadas genéticamente (terapia génica *ex vivo*), o por inducción de áreas cerebrales epileptogénicas a producir estos compuestos *in situ* (terapia génica *in vivo*).

4.2. TERAPIAS CELULARES PARA LA EPILEPSIA

Investigaciones realizadas en los últimos años han demostrado que la liberación focal de drogas/medicamentos es, por lo general, bien tolerada y carece de grandes efectos secundarios (*Nilsen et al., 2004*). La estrategia para conseguir dicha liberación puede consistir en la construcción de dispositivos tales como polímeros sintéticos de liberación lenta, sistemas de bombeo, los cuales, pueden estar acoplados a sistemas de predicción de ataques (*Stein et al., 2000*), o incluso, el establecimiento de implantes celulares. Las estrategias seguidas se basaron en la liberación paracrina, mediada por células, de compuestos antiepilepticos, la reposición de neuronas perdidas, la integración funcional de los implantes celulares en las redes neuronales preexistentes, o varias combinaciones de los mismos.

Un método prometedor consiste en el empaquetamiento e implantación de dispositivos celulares cargados dentro del cerebro mediante el encapsulamiento de suspensiones celulares en una membrana de determinados polímeros antes de la implantación (*Emerich et al., 2000*). El dispositivo de salida se puede cuantificar previamente a la implantación y las células encapsuladas sobreviven durante al menos un año en los recipientes injertados (*Winn et al., 1996*). Además, la relativamente fácil capacidad de recuperar los dispositivos del lugar donde han sido injertados, confiere un margen adicional de seguridad ante los implantes celulares no-encapsulados. Pese a todas estas ventajas, la supervivencia a largo plazo de los implantes celulares encapsulados sigue siendo un objetivo primordial, se necesita mejorar tanto los biomateriales como las células que los acompañan.

Por otro lado, el trasplante directo y la integración funcional de células con fines terapéuticos dentro del cerebro ofrece una supervivencia celular a más largo plazo. Sin embargo, a la hora de diseñar terapias celulares directas hay que tener en cuenta las respuestas inflamatorias e inmunológicas que puedan acontecer, ya que pueden comprometer la eficacia del implante. Aún así, ya se han hecho ensayos clínicos con trasplantes celulares para tratar diferentes enfermedades, entre ellas la epilepsia, con el objetivo de lograr el reemplazamiento celular (*Barker et al., 2004*). En muchos de estos ensayos el material de origen para el trasplante celular procedía de fetos humanos (*Pankratov et al., 2003*).

El trasplante celular para el tratamiento de la epilepsia se puede lograr más fácilmente mediante injertos de células o tejidos fetales. Dichos trasplantes fetales de tejidos y células han dado importantes resultados, pero en los últimos años a las células madre se les ha dado mayor importancia como fuente alternativa para la medicina regenerativa. Las células madre son capaces de auto-renovarse y al mismo tiempo dar lugar a progenitores celulares (*Morrison et al., 1997*). Así, las células madre pueden convertirse en una fuente ilimitada capaz de generar neuronas específicas, y preparaciones celulares que pueden ser controladas y estandarizadas previamente a ser trasplantadas.

Dependiendo de su origen, podemos distinguir entre células madre embrionarias y adultas. La diferenciación dirigida de las células madre embrionarias puede llevar a la generación de tipos celulares clínicamente relevantes, incluyendo neuronas (*Okabe et al., 1996*) y glía (*Brüstle et al., 1999*). Se ha visto que después del trasplante de dichas células, en el SNC de roedores, los precursores neuronales derivados de ellas están integrados dentro del tejido del huésped y ofrecen mejoras funcionales (*Kim et al., 2002*). Desde que las células madre embrionarias son susceptibles a un amplio espectro de modificaciones genéticas, la tecnología que implica el uso de células madre es prometedora no sólo para terapias de reemplazamiento celular, sino también para la liberación de diversos factores por parte de estas células.

Las células madre adultas dan lugar preferentemente a células diferenciadas de la misma línea que la del tejido de origen. Sin embargo, algunos estudios indican que las células madre adultas también pueden generar células de una línea embrionaria diferente *in vivo* (*Bjornson et al., 1999; Galli et al., 2000*). Estos descubrimientos tienen implicaciones terapéuticas, ya que las células madre neurales pueden promover la recuperación funcional de zonas dañadas del sistema nervioso (*Chu et al., 2004; Jeong et al., 2003; Pluchino et al., 2003*). Así, las células madre adultas proporcionan una fuente fácilmente accesible de trasplantes autólogos de progenitores (neuronales) derivados de células madre.

4.3. TERAPIAS GÉNICAS

A diferencia de los objetivos de la terapia celular, destinados al reemplazamiento y reparación de las interacciones entre las redes neuronales, la capacidad de la transferencia génica se basa en proporcionar niveles prolongados de un compuesto terapéuticamente activo de manera localizada en el SNC (*Hsieh, G. et al., 2002*), lo que sugiere que las terapias génicas son adecuadas para el tratamiento de los ataques

crónicos, para los que se ha identificado un foco intratable de actividad eléctrica. En contraste a la supresión de los ataques, la terapia génica tiene el potencial para hacer frente a los mecanismos que subyacen a la enfermedad y por lo tanto, teniendo el potencial para curar.

Desgraciadamente, las formas prevalentes de epilepsia no resultan de un único defecto genético (*Berkovic et al., 2006*). Por ello, la terapia génica puede ser utilizada para inducir la liberación local de componentes anticonvulsivos o antiepileptogénicos con el objetivo de restaurar el balance entre inhibición y excitación en el cerebro, para reforzar los canales iónicos, o para apoyar la función de los neuromoduladores endógenos. Otra estrategia puede ser tratar de prevenir los ataques induciendo la pérdida de células neuronales, como ya hicieron Sapolsky y sus colaboradores (1995) a través de herpes virus, induciendo la sobreexpresión del gen que codifica el transportador de glucosa (*Lawrence et al., 1995*). Han sido desarrollados varios sistemas como potenciales vectores, los cuales, pueden ser usados para “entregar” ADN a las células del cerebro. Algunos de estos vectores son los virus herpes simples, los adenovirus, los virus adenoasociados (VAA), los lentivirus y los espumavirus humanos (tabla 3).

TABLA 3. Vectores virales de la terapia génica para epilepsia

Vector	Targets	Advantages	Disadvantages	Selected Examples
Herpes simplex virus (HSV)	Neurons Possibility for nasal administration	Life-long persistence	Gene inactivation during latency	Delivery of the antiapoptotic gene ICP10PK: prevention of KA-induced seizures, neuronal loss and inflammation [55]
Adenovirus	Dividing and non-dividing cells	No permanent alteration of host genome through episomal configuration	Risks of: - inflammation - immune responses - demyelination	Intracerebroventricular gene transfer of aspartoacylase ameliorated tonic convulsions in spontaneously epileptic rats [48]
Adeno-associated virus (AAV)	High efficacy in neurons	Non-pathogenic Lack of CNS toxicity Long-term gene expression	Size-limitations for therapeutic gene inserts	Therapeutic delivery of galanine and neuropeptide Y in several models of epilepsy (see text for details) [129-131, 133, 162]
Lentivirus	High efficacy in multiple cell types, preference for neurons	Lack of CNS toxicity Infection of non-cycling and post-mitotic cells Lack of gene silencing during development	Permanent integration/alteration of host genome	Lentiviral expression of GAD ameliorated seizures in genetically epilepsy prone rats [86]
Human foamy virus (HFV)	Wide tissue tropism	Non-pathogenic	Permanent integration/alteration of host genome	No <i>in vivo</i> studies to date; <i>In vitro</i> : efficient expression of GAD [65]

4.4. TERAPIA CON GABA

Como ya hemos visto, la epilepsia puede resultar de un desequilibrio entre los sistemas excitadores e inhibidores, que desencadena una disminución de la inhibición. La supresión de los ataques se puede conseguir mediante el trasplante de células que liberen neurotransmisores inhibitorios dentro del núcleo cerebral que modula los ataques (*Bjorklund, 2000*). Basándose en esto, se han hecho varios experimentos en los que se han trasplantado células que liberan GABA en regiones discretas del sistema límbico, ya que en dicho sistema, un desequilibrio en los niveles de GABA,

generalmente, provoca ataques epilépticos (*Haberly et al., 1992*). El trasplante de células madre neuronales dentro del hipocampo dañado, disminuye la excitabilidad neuronal y suprime los ataques epilépticos recurrentes (*Chuk et al., 2004*). Otra estrategia hace uso de células que liberan neurotransmisores con el objetivo de modular la excitabilidad de la red. Así, el tejido fetal del estriado que contenga neuronas GABAérgicas reduce los umbrales de descarga y los ataques en la amígdala de ratas, cuando se injerta en la sustancia nigra. Sin embargo, la supresión de los ataques es transitoria, por lo que se están diseñando nuevas estirpes celulares que liberen sustancias anticonvulsivas endógenas. Así, Thompson y colaboradores (2000) diseñaron neuronas de ratón que liberaban GABA bajo el control de GAD65 (*Thompson et al., 2000*), pero los resultados no fueron los esperados. En un estudio más reciente, se inyectaron las mismas células en la sustancia nigra, en un modelo epiléptico con ataques espontáneos (*Thompson et al., 2004*). En este caso, en los lugares donde se injertaron las células que liberaban GABA, se observó un efecto anticonvulsivo entre 7 y 10 días después del trasplante.

También se infectaron células neuronales con vectores virales portadores del gen GAD, que codifica la enzima encargada de la síntesis de GABA. Así, neuronas hipocampales transfectadas con el vector-HFV que incluía el gen GAD mostraban un incremento significativo de la expresión de GAD, síntesis y liberación de GABA evocada por estimulación (*Liu et al., 2005*). Igualmente, la expresión de GAD mediante el uso de lentivirus como vectores aminora los ataques en ratas genéticamente propensas a padecer epilepsia (*Epps et al., 2006*).

Los ejemplos expuestos sugieren que el control focal de la neuromodulación GABAérgica mediante terapias génicas o celulares tiene el potencial de suprimir los ataques y prevenir la epileptogénesis.

4.5. TERAPIA CON ADENOSINA

La adenosina es un neuromodulador endógeno que ejerce su función uniéndose a cuatro subtipos de receptores de adenosina (A1R, A2Ra, A2Rb, A3R). Todos ellos pertenecen a la familia de los receptores de adenosina acoplados a proteínas G (*Fredholm et al., 2001; 200; 2007*). La adenosina es un anticonvulsivo endógeno del cerebro (*Lee et al., 1984; Dunwiddie 1995*) con gran capacidad para controlar los ataques (*Boison 2005*). Aparte de regular la actividad de los ataques, la adenosina ejerce potentes efectos neuroprotectores (*Cunha 2005; Fredholm 1997*) y está implicada en el control del dolor neuropático (*McGaraughty et al., 2006*). Intracelularmente, la adenosina es rápidamente fosforilada en adenosina 5' monofosfato por la adenosina quinasa (ADK). Se cree que los niveles sinápticos de adenosina son controlados por la ADK, que además participa en el sistema de recaptación de adenosina, a diferencia de los neurotransmisores clásicos, que poseen transportadores específicos para ser recaptados (*Boison, 2006*). Es importante destacar que en el cerebro adulto la ADK solamente se expresa en astrocitos (*Studer et al., 2006*).

En general, parece ser que los ataques agudos están asociados con el aumento de la expresión de los receptores A1R, mientras que los ataques crónicos están usualmente

acompañados por una disminución en la expresión de los receptores A1R (*Glass et al., 1996*).

La terapia celular basada en adenosina, ha sido desarrollada basándose en la ingeniería de fibroblastos BHK y mioblastos C2C12 para eliminar la expresión de ADK. Se demostró que, las células modificadas eran capaces de liberar adenosina y posteriormente fueron encapsuladas en membranas de polímeros semipermeables para estudiar selectivamente los efectos paracrinos de la adenosina y para evitar el rechazo inmune. Dichos implantes proporcionaron protección frente a las crisis convulsivas y las descargas epileptiformes en el hipocampo de ratas “kindled”, un modelo de epilepsia parcial (*Güttinger et al., 2005*). Así, la liberación paracrina de adenosina mediada por injertos celulares, es una prometedora estrategia para controlar los ataques sin efectos secundarios.

A diferencia de los implantes de células encapsuladas, que causan efectos terapéuticos exclusivamente por acción paracrina, los implantes celulares directos de células madre combinan efectos paracrinos con interacciones en la red neuronal. Con el objeto de crear células con un sistema de liberación de adenosina, ambos alelos de la proteína ADK fueron interrumpidos por recombinación homóloga en células madre (*Fedele et al., 2004*). Dichas células fueron diferenciadas a células gliales maduras capaces de liberar adenosina. Estas células fueron trasplantadas en el cerebro de ratón una semana antes de la oclusión de la arteria cerebral media, donde suprimieron eficazmente el daño cerebral isquémico, demostrando así, *in vivo*, la funcionalidad de las células (*Pignataro et al., 2006*).

También, se probó la eficacia de la liberación paracrina por células madre Adk+. Las ratas con implantes derivados de células madre capaces de liberar adenosina, mostraban una protección transitoria frente a las convulsiones y una profunda reducción de la actividad tras la descarga que provoca las convulsiones (*Güttinger et al., 2005*). Así, se ha probado que los implantes de células madre capaces de liberar adenosina pueden suprimir los ataques por un modo de acción paracrino. Posteriormente, las mismas células, después de la inducción de diferenciación neuronal e inyección directa en el interior del hipocampo, se vio que: (i) se integraban y sobrevivían durante al menos 26 días en el hipocampo de ratas, (ii) expresaban NeuN, un marcador que indicaba que había habido diferenciación neuronal, y (iii) suprimían la epileptogénesis (*Li et al., 2007*).

4.6. TERAPÉUTICA CON GALANINA

La galanina es un péptido neuroactivo con actividad anticonvulsiva *in vivo*. Este neuropéptido es altamente inducible y puede mostrar tanto incremento como reducción de su expresión después de un trastorno patológico del sistema nervioso. Así, la expresión de galanina está incrementada después de un daño en el sistema nervioso, mientras que la actividad convulsiva agota la galanina en el hipocampo. La galanina actúa principalmente como un neuromodulador inhibitorio, hiperpolarizante. La unión de la galanina a dos tipos de receptores de galanina; el receptor de galanina tipo I (GalR1) y el receptor de galanina tipo II (GalR2), contribuye a la inhibición de la actividad epiléptica (*Mazarati, 2004*). La supresión de los ataques por galanina se debe

a la apertura de canales de potasio activados por proteínas G o sensibles a ATP, y en última instancia, a la inhibición presináptica de la transmisión glutamatérgica.

Hasta el momento, el uso terapéutico de la galanina para el tratamiento de la epilepsia se ha centrado en la expresión mediada por virus adenoasociados (VAA) y secreción de galanina. Inicialmente, la inclusión de la secuencia de la señal secretora de fibronectina (FIB) en un vector integrado en VAA causa abundante producción de producto génico *in vitro*. Además, la combinación de esta señal secretora con la secuencia que codifica para el péptido galanina, *in vivo*, atenúa la sensibilidad focal a los ataques, y previene la muerte celular inducida por un agente convulsionante como el ácido kaínico. (Habermen *et al.*, 2003). Administrando ácido kaínico en el hipocampo de ratas 2,5 meses después de la infusión del vector VAA que expresaba galanina (VAA-GAL) o el correspondiente control (VAA-vacío), las ratas inyectadas con VAA-GAL mostraron una disminución en el número de ataques y en el tiempo total del ataque en comparación con las ratas control (Lin *et al.*, 2003). Estos datos demuestran que el VAA media y estabiliza la sobreexpresión de galanina cuando es inyectado en el hipocampo de rata proporcionando un importante efecto anticonvulsivo. En otro estudio más reciente, la infusión bilateral del vector de expresión de galanina VAA-FIB dentro del córtex piriforme, también atenúa significativamente los ataques inducidos por ácido kaínico (McCown, 2006).

Estos experimentos sugieren que la supresión de los ataques mediada por galanina, en el hipocampo, a través de vectores virales de terapia génica, puede dar lugar a nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento y manejo de los ataques epilépticos intratables con un origen focal. Aunque son técnicamente viables y están científicamente justificadas, las terapias celulares para la secreción local de galanina todavía no están lo suficientemente perfeccionadas.

4.7. TERAPIA CON NEUROPEPTIDO Y

El neuropéptido Y (NPY) modula diversas funciones fisiológicas tales como, la homeostasis, funciones cardiovasculares y neuroendocrinas, ansiedad y cognición; y también interviene en la excitabilidad neuronal, los ataques, y la neuroprotección (Silva *et al.*, 2005; Vezzani *et al.*, 2004). El NPY y sus receptores juegan un importante papel en el inicio y propagación de la actividad epileptiforme, como ocurre por ejemplo en el hipocampo (Furtinger *et al.*, 2002). Además, se ha comprobado que el NPY actúa como un potente anticonvulsivo, ya que, si se administra él o sus análogos mediante infusión intracerebral, es capaz de suprimir la actividad epiléptica en varios modelos experimentales de epilepsia (Ulrich *et al.*, 2006; Woldbye *et al.*, 2005). Los potentes efectos terapéuticos del NPY están mediados por su unión a receptores acoplados a proteínas G, de los que se han identificado seis subtipos (Y1-Y6) (Herzog *et al.*, 1997; Redrobe *et al.*, 2003). Los subtipos Y1 e Y2 son los receptores dominantes en el hipocampo.

El primer intento de terapia génica con NPY fue realizado por Richichi y colaboradores (2004), quienes demostraron un amplio rango de efectos anticonvulsivos a través de la expresión del NPY mediada por VVA. En este estudio, la expresión génica de NPY en el hipocampo prevenía la aparición de estados epilépticos tras la

administración intracerebroventricular de ácido kaínico. Además, la expresión intrahipocampal de estos vectores incrementaba los umbrales de los ataques en el hipocampo y retardaba la tasa de la epileptogénesis. Este estudio también sirvió para comprobar que era más efectiva la transducción neuronal con el serotipo híbrido VAA1/2 que con el serotipo VAA2. Así, se estableció un importante potencial antiepiléptico de la expresión del NPY, mediado por VVA, *in vivo*, que duraba meses.

4.8. TERAPIAS GÉNICAS PREVENTIVAS

A lo largo de toda esta revisión se han apuntado muy diversas evidencias que muestran cómo las alteraciones de la migración neuronal en el desarrollo del córtex tienen importantes consecuencias funcionales del SNC, entre otras la aparición de episodios convulsivos de tipo epiléptico. Tras hacer un repaso por los mecanismos celulares que desencadenan estos episodios convulsivos, hemos recogido en el apartado anterior algunas de las más novedosas terapias, tanto celulares como génicas, que, a pesar de encontrarse aún en periodo experimental, muestran notables resultados que las hacen constituirse como base para el desarrollo de nuevas y efectivas estrategias terapéuticas en el tratamiento de la epilepsia. No obstante, estas terapias van todas encaminadas a eliminar o paliar la frecuencia, intensidad y duración de los episodios convulsivos interviniendo sobre algunos de los mecanismos desencadenantes de los mismos, mientras que ninguna de estas terapias aborda la eliminación de éstos a través de estrategias que posibiliten la reparación de las alteraciones que sufren los sistemas celulares y que subyacen a estas patologías.

Por ello, en este último apartado comentamos de forma breve datos referentes a una novedosa y prometedora metodología relacionada con la terapia génica. Ésta incide fundamentalmente, ya no en estrategias encaminadas a paliar los efectos de las malformaciones derivadas de los defectos en la migración, si no a reactivar los mecanismos celulares que permiten la correcta migración neuronal y de este modo reparar los sistemas dañados, responsables de la sintomatología típica de estas malformaciones. Los resultados derivados de estos trabajos sugieren la posibilidad de tratamiento de las alteraciones derivadas de una migración neuronal defectuosa a través de estrategias que consiguen reactivar los programas de migración alterados.

4.8.1. La reexpresión de doblecortina reduce la heterotopia subcortical en banda y el umbral de los ataques en un modelo animal con desórdenes en la migración neuronal.

Para llevar a cabo este estudio, se desarrolló un modelo de rata con heterotopia subcortical en banda (HBS) obtenido mediante la reducción de la expresión de *Dcx* por electroporación *in utero* de RNA de interferencia (RNAi) sobre embriones (*Bai et al., 200; Manent et al., 2009*). La introducción mediante electroporación de los correspondientes vectores hacía expresar un shRNA, que a su vez generaba ARNi's, que interferían con el ARNm de doblecortina, de modo que la expresión de esta proteína quedaba total, o casi totalmente, silenciada. Así, el déficit de doblecortina en este modelo reproduce las características anatómicas de las malformaciones presentes en el síndrome del doble córtex humano. El modelo consistía además en un sistema de

expresión condicional de modo que, tras el nacimiento, en el día deseado, la inyección intraperitoneal de 4-hidroxitamoxifen (4-OHT) hacía que en las células transfectadas se iniciara la expresión de doblecortina que era, además, insensible a los efectos del ARNi. De este modo se reproducían inicialmente las malformaciones corticales típicas de la ausencia de doblecortina, pero con posterioridad, podía inducirse su expresión y así comprobar si las neuronas con defectos migratorios podrían ser “recuperadas” *a posteriori*.

Los resultados que obtuvieron fueron los siguientes:

1. La inducción de la reexpresión de Dcx en periodos postnatales reduce la HBS y restaura la posición laminar de las neuronas, ya que, las células que en un principio estaban destinadas a formar parte de las capas superiores del córtex, pero que se encontraban estancadas en posiciones aberrantes fueron inducidas, por la reexpresión de Dcx, a migrar su capa de destino correcta.

2. Las neuronas rescatadas eran morfológicamente normales. Las neuronas rescatadas, las cuales, fueron estimuladas para que migrasen fuera de sus posiciones aberrantes y se colocasen en las capas apropiadas, continuaron expresando los marcadores específicos de lámina y mostraron una adecuada diferenciación de los patrones dendríticos y axonales.

3. La reducción de la heterotopía comienza a ser menos efectiva con la edad a la que se reintroduce la expresión de doblecortina. Los resultados que obtuvieron mostraron que la reexpresión de Dcx a P5 era mucho más efectiva que si se producía en P19, a lo hora de reducir el tamaño de las malformaciones heterotópicas.

4. Por último, comprobaron que la reducción de la HBS reduce la susceptibilidad a los ataques convulsivos y su severidad.

Este estudio sirve como una prueba de que las células cuya migración fue interrumpida, pueden ser manipuladas para restaurar el patrón morfológico normal y el nivel de excitabilidad correcto en el córtex cerebral, demostrando que la terapia génica puede reducir el tamaño y los efectos funcionales de una disrupción preexistente en la migración neuronal.

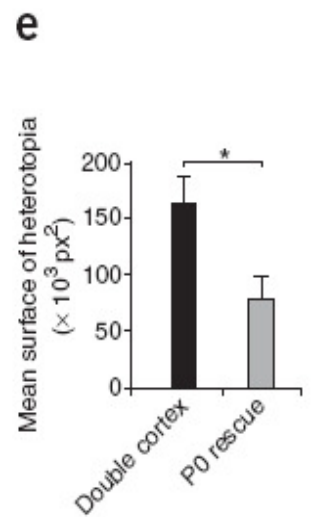
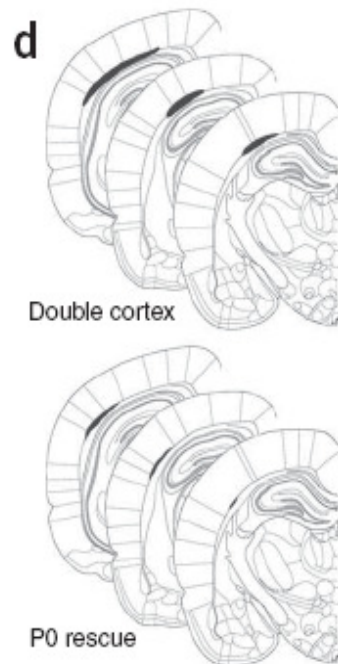
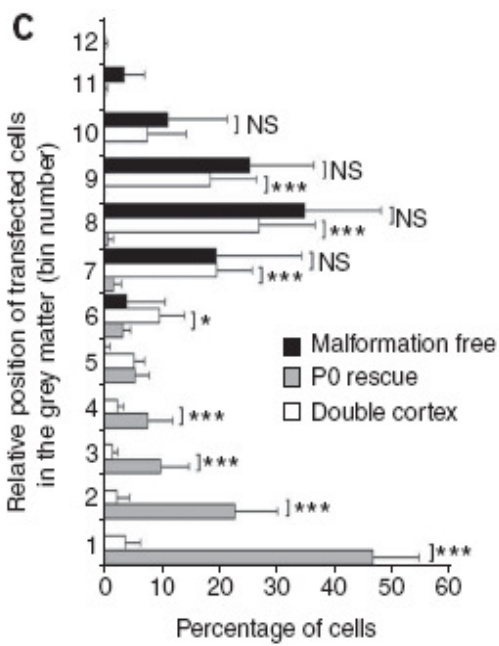
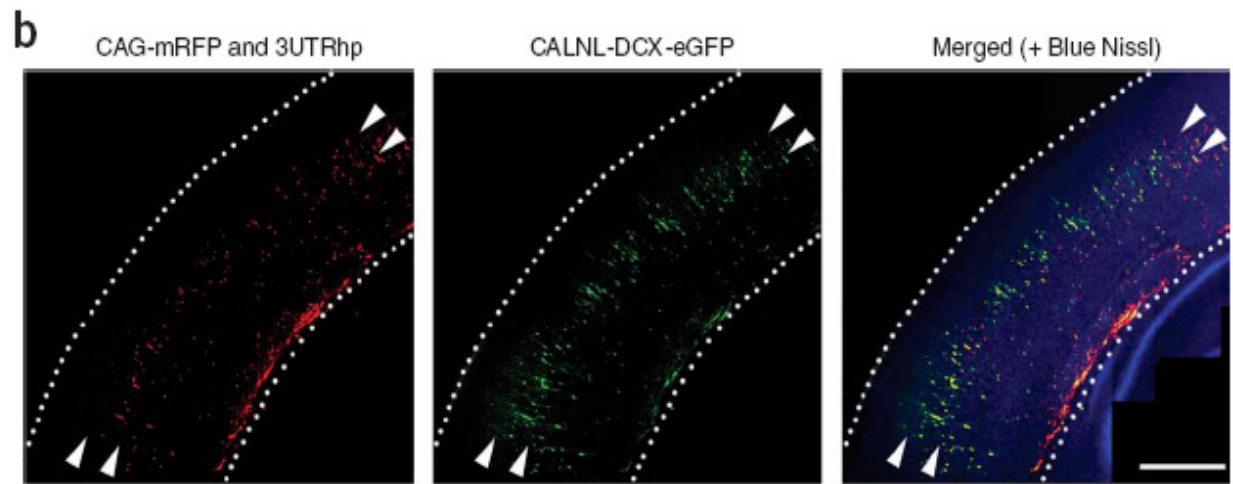
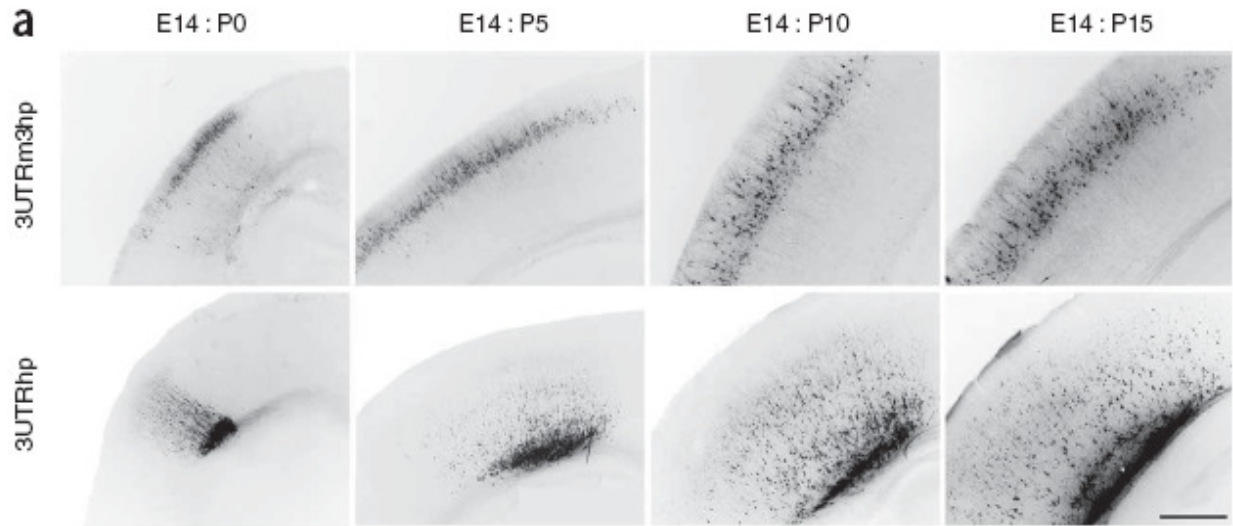


FIGURA 18. Restauración de la laminación neocortical y regresión de la HBS después de la reexpresión de Dcx a P0. (a) Restauración de la laminación neocortical y regresión de la HBS después de la expresión de Dcx. Secciones neocorticales mostrando la posición laminar de las células transfectadas en ratas electroporadas en E14 ya sea con un control shRNA (3UTRm3hp, fila superior) no efectivo para el silenciamiento de doblecortina, con efectivos vectores shRNA DCX-targeting? Junto con CAG-mRFP y procesadas postnatalmente desde P0 hasta P1. (b) Secciones neocorticales representativas de la restauración de la laminación cortical en P20 después de la reexpresión de Dcx en neuronas fuera de su posición en P0. Cuatro plásmidos fueron electroporados a E14: CAG-mRFP, CAG-ERT2CreERT2, CALNL-DCX-eGFP y 3UTRhp, y 4-OHT fueron administrados en el momento del nacimiento. (c) Cuantificación de la distribución de células transfectadas dentro de la sustancia gris del neocórtex después de la inducción de la expresión de eGFP o DCX-eGFP en ratas electroporadas en E14 con el vector shRNA targeting? Dcx efectivo (3UTRhp) o no-efectivo (3UTRm3hp) con CAG-mRFP, CAG-ERT2CreERT2 y ambos CALNL-DCX-eGFP o CALNL-eGFP (10-12 secciones de dos o tres ratas). NS, no significativa. (d) Tamaño y posición de la HBS en tres niveles rostro-caudales después de la inducción de la expresión de eGFP (arriba) o DCX-eGFP (abajo) en ratas electroporadas en E14 con CAG-mRFP, CAG-ERT2CreERT2, 3UTRhp y ambos, CALNL-eGFP (arriba) o CALNL-DCX-eGFP (abajo). (e) Cuantificación de la superficie con HBS después de la inducción de eGFP o DCX-eGFP en las mismas condiciones experimentales (8-9 secciones de 2-3 ratas). ***Po 0.001, *Po 0.05. Escala: 500 μ m.

4.9. PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES

Todos los ejemplos vistos, demuestran que el incremento en la existencia de modelos terapéuticos de todos estos anticonvulsivos endógenos (GABA, adenosina, galanina, neuropéptido Y) es muy prometedor para el desarrollo de nuevas terapias para la epilepsia, encaminadas no sólo a la supresión de los ataques y a la neuroprotección, sino también a la prevención de la epileptogénesis.

Aunque son muy prometedoras, en modelos roedores con epilepsia, estas terapias génicas y celulares tienen que cumplir una serie de requisitos antes de pasar a su utilización en ensayos clínicos. Algunos de estos requisitos suponen probar su eficacia a largo plazo, probar su eficacia en modelos animales que sean clínicamente relevantes, demostrar su seguridad a largo plazo y demostrar su eficacia en hipocampos humanos epilépticos procedentes de resecciones.

En conclusión, las terapias génicas y celulares para la epilepsia son muy prometedoras en el momento actual, pero aún quedan diferentes obstáculos por superar antes de pasar a ensayos clínicos. En cualquier caso, esto hace que el perfeccionamiento y el desarrollo de dichas terapias continúen progresando.

4.10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aligianis, I.A. et al. (2005) Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome. *Nat. Genet.* 37, 221–223.
2. Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., Rubenstein, J.L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278, 474-476.
3. Ang Jr., E. S., Haydar, T. F., Gluncic, V., Rakic, P. (2003). Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J. Neurosci.* 23, 5805-5815.
4. Anton, E.S., Kreidberg, J.A., Rakic, P. (1999). Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* 22, 277-289.
5. Baala, L. et al. (2007) Homozygous silencing of T-box transcription factor *EOMES* leads to microcephaly with polymicrogyria and corpus callosum agenesis. *Nat. Genet.* 39, 454–45.
6. Bai, J., Ramos R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R.V., LoTurco, J.J. (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci.* 6(12): 1277-1283.
7. Barker, R. A., Widner, H. (2004) Immune problems in central nervous system cell therapy. *NeuroRx*, 1, 472-481.
8. Barkovich, A.J., Guerrini, R., Battaglia, G. Et al. (1994). Band heterotopia: correlation of outcome with magnetic resonance imaging parameters. *Ann Neurol.* 36:609-617.
9. Bartolomé, M.T.A., de Castro García, F.J., Alonso Navarro, H., Framiñan de Miguel, A. (2007). Heterotopia subcortical. *Neurología* 22(1):47-48.
10. Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Caillard, O. et al. (1997). GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated “ménage à trois”. *Trends Neurosci*; 20: 523-529.
11. Berkovic, S. F., Mulley, J. C., Scheffer, I. E., Petrou, S. (2006) Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends Neurosci.*, 29, 391-397.
12. Berry M, Rogers AW (1965) The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J Anat* 4:691–709.
13. Bix, G.J, Clarck, G.D. (1998) Platelet-activating factor receptor stimulation disrupts neuronal migration in vitro. *J Neurosci* 18:307–318
14. Bjorklund, A. (2000) Cell replacement strategies for neurodegenerative disorders. *Novartis Found. Symp.*, 231: 7-15
15. Bjornson, C. R. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C., Vescovi, A.L. (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, 283: 534-537.
16. Björklund A, Hökfelt T & Swanson LW (Editors), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. 7. Integrated Systems of the CNS, Part II.* Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1-164.
17. Boison, D. (2005) Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist*, 11: 25-36.
18. Boison, D. (2007). Cell and gene therapies for refractory epilepsy. *Curr. Neuropharmacology*, 5, 115-125.
19. Borges, K., McDermott, D., Irier, H., Smith, Y., Dingledine, R. (2006) Degeneration and proliferation of astrocytes in the mouse dentate gyrus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp. Neurol.*, 201, 416-427.
20. Boycott, K.M. et al. (2005) Homozygous deletion of the very low density lipoprotein receptor gene causes autosomal recessive cerebellar hypoplasia with cerebral gyral simplification. *Am. J. Hum. Genet.* 77: 477–483
21. Brooks, A.S. et al. (2005) Homozygous nonsense mutations in *KIAA1279* are associated with malformations of the central and enteric nervous systems. *Am. J. Hum. Genet.* 77: 120–126.
22. Burgess, H.A., Reiner, O., 2000. Doublecortin-like kinase is associated with microtubules in neuronal growth cones. *Mol. Cell. Neurosci.* 16: 529-541.
23. Brüstle, O., Jones, K. N., Learish, R. D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O. D., Duncan, I. D., McKay, R. D. (1999) Embryonic stem cell derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, 285: 754-756.

24. Cahana, A. et al. (2001). Targeted mutagenesis of *Lis1* disrupts cortical development and *LIS1* homodimerization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 6429-6434.
25. Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T., Reiner, O., (2000). Interaction between *LIS1* and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum. Mol. Genet.* 9: 2205-2213.
26. Cavazos, J.E., Das, I., Sutula, T.P. (1994). Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci*;14(5 Pt 2):3106-3121.
27. Chae, T., Kwo, Y.T., Bronson, R., Dikkes, P., Li, E., Tsai, L.-H. (1997). Mice lacking *p35*, a neuronal specific activator of *Cdk5*, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18: 29-42.
28. Chang, B.S. et al. (2005) Reading impairment in the neuronal migration disorder of periventricular nodular heterotopia. *Neurology* 64: 799-803.
29. Chang, B.S., Aspe, K.A., Caraballo, R. et al. (2006). A familial syndrome of unilateral polymicrogyria affecting the right hemisphere. *Neurology.* 66:133-135.
30. Chevassus-au-Louis, N., Represa, A. 1999. The right neuron at the wrong place: biology of heterotopic neurons in cortical neuronal migration disorders, with special reference to associated pathologies. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 55:1206-1215.
31. Chu, K., Kim, M., Jung, K. H., Jeon, D., Lee, S. T., Kim, J., Jeong, S. W., Kim, S. U., Lee, S. K., Shin, H. S., Roh, J. K. (2004) Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpin induced status epilepticus in adult rats. *Brain Res.*, 1023: 213-221.
32. Chvatal, A., Sykova, E. (2000) Glial influence on neuronal signaling. *Prog Brain Res* 125:199-216.
33. Cohen, M. et al. (1989) Neuropathological abnormalities in developmental dysphasia. *Ann. Neurol.* 25: 567-570.
34. Committee, B. (1970). Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anatomical Record*, 166: 257-262.
35. Cunha, R. A. (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: from *A1* receptor activation to *A2A* receptor blockade. *Purinergic Signal.*, 1: 111-134.
36. D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M., Curran, T., 1999. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24: 471-479.
37. D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I., Curran, T., 1995. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374: 719-723.
38. D'Agostino MD, Bernasconi A, Das S, Bastos A, Valerio RM, Palmmini A, Costa da Costa J, Scheffer IE, Berkovic S, Guerrini R, Dravet C, Ono J, et al. (2002) Subcortical band heterotopia (SBH) in males: clinical, imaging and genetic findings in comparison with females. *Brain* 125:2507-2522.
39. Demarque M, Represa A, Becq H, et al. Paracrine intercellular communication by a Ca^{2+} - and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron* 2002; 36: 1051-1061.
40. Denaxa, M., Chan, C. H., Schachaner, M., Parnavelas, J. G., and Karagogeos, D. (2001). The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128: 4635-4644.
41. Delatycki, MB., Leventer, RJ. (2008) Listen carefully: *LIS1* and *DCX* MLPA in lissencephaly and subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet.* 1-2.
42. Derer, P. (1994). HistogèneÁse du neÁocortex du Rat albinos durant la peÁriode fÚtale et neÁonatale. *J. Hirnforsch.* 15: 1-34.
43. Des Portes, V. et al. (1998) A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* 92, 51-61
44. Derouiche A, Frotscher M (2001) Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia* 36:330-341.
45. Dobyns, W. B., Reiner, O., Carrozzo, R. and Ledbetter, D. H. (1993). Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the *LIS1* gene located at chromosome 17p13. *JAMA* 270, 2838-2842.
46. Dobyns, W.B. et al. (1997) Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and syndactyly in boys: a new X-linked mental retardation syndrome. *Neurology* 49, 1042-1047.

47. Dobyns, W.B., Curry, C.J., Hoyme, H.E. et al. Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet.* 48:584-594.
48. Dobyns, W.B., Pagon, R.A., Armstrong, D. et al (1989). Diagnostic criteria for Walker-Warburg syndrome. *Am J Med Genet.* 32: 195-210.
49. Dubeau, F., Tampieri, D., Lee, N. Et al. (1995). Periventricular and subcortical nodular heterotopia. A study of 33 patients. *Brain.* 118:1273-1287.
50. Dulabon, L., Olson, E.C., Taglienti, M.G., Eisenhuth, S., MacGrath, B., Walsh, C.A., Kreidberg, J.A., Anton, E.S., (2000) Reelin binds alpha3-beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27: 33-44.
51. Dunwiddie, T. V. (1999) Adenosine and suppression of seizures. *Adv. Neurol.*, 79, 1001-1010.
52. Emerich, D. F., Winn, S. R. (2000) Application of polymer-encapsulated cell therapy for CNS diseases. In: Dunnett, S.B., Boulton, A.A., Baker, G.B., Eds.; *Neural transplantation methods*, Humana Press: Totowa, New Jersey, 36: 233-278.
53. Epps, S. A., Venable, D. E., Faingold, C. L., Wilson, S. P., Coleman, J. R. (2006) Effects of alterations of GAD by lentivirus mediated gene transfer on seizure severity in genetically epilepsy prone rats. *Exp. Neurol.*, 198: 568-568.
54. Fedele, D. E., Koch, P., Brüstle, O., Scheurer, L., Simpson, E. M., Mohler, H., Boison, D. (2004) Engineering embryonic stem cell derived glia for adenosine delivery. *Neurosci. Lett.*, 370: 160-165.
55. Flores Río de la Loza, L.J. 2006. Heterotopia en banda subcortical. *Medicas vis* 19:301-305.
56. Foldvary-Schaefer N, Wyllie E. Epilepsy. In: Goetz, CG, ed. *Textbook of Clinical Neurology*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2007: chap 52.
57. Fox, J.W., Lamperti, E.D., Eksioglu, Y.Z., Hong, S.E., Feng, Y., Graham, D.A., Scheffer, I.E., Dobyns, W.B., Hirsch, B.A., Radtke, R.A., Berkovic, S.F., Huttenlocher, P.R., Walsh, C.A., (1998). Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 21: 1315-1325.
58. Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., McConnell, S.K., Berwald-Netter, Y., Denoulet, P., Chelly, J. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23: 247-256.
59. Fredholm, B. B. (1997) Adenosine and neuroprotection. *Int. Rev. Neurobiol.*, 40: 259-280.
60. Fredholm, B.B., Chen, J.F., Masino, S.A., Vaugeois, J.M., (2005). Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 385-412.
61. Fredholm, B.B., Hokfelt, T., Milligan, G., (2007). G-protein-coupled receptors: an update. *Acta Physiol. (Oxf.)* 190: 3-7.
62. Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J., (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53: 527—552.
63. Friocourt, G., Koulakoff, A., Chafey, P., Boucher, D., Fauchereau, F., Chelly, J., Francis, F. (2003) Doublecortin Functions at the Extremities of Growing Neuronal Processes. *Cereb Cortex* 13 (6): 620-6.
64. Frotscher M (1997). Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell and Tissue Research*, 290: 315-322.
65. Fukuyama, Y., Osawa, M., Suzuki, H. (1981). Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type-clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev.* 3:1-29.
66. Furtinger, S., Pirker, S., Czech, T., Baumgartner, C., Sperk, G. (2002) Altered expression of neuropeptide Y, -Y(1), and -Y(2) receptors in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 43:152.
67. Galli, R., Borello, U., Gritti, A., Minasi, M. G., Bjornson, C., Coletta, M., Mora, M., De Angelis, M. G., Fiocco, R., Cossu, G., Vescovi, A. L. (2000) Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat. Neurosci.*, 3: 986-991.
68. Gilmore, E.C., Ohshima, T., Gof@net, A.M., Kulkarni, A.B., Herrup, K.,(1998). Cyclin-dependent kinase 5-decient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J. Neurosci.* 18: 6370-6377.

69. Glaser, T. et al. (1994) PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat. Genet.* 7: 463–471.
70. Glass, M., Faull, R. L., Bullock, J. Y., Jansen, K., Mee, E. W., Walker, E. B., Synek, B. J., Dragunow, M. (1996) Loss of A1 adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res.*, 710: 56-68.
71. Gleeson, J.G. (2000). Classical lissencephaly and double cortex (subcortical band heterotopia): LIS1 and doublecortin. *Current Opinion in Neurology* 13:121-25.
72. Gleeson, J.G. et al. (1998) Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 92: 63–72
73. Gleeson, J.G., Lin, P.T., Flanagan, L.A., Walsh, C.A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23: 257-271.
74. Gressens, P. (2000) . Mechanisms and disturbances of neuronal migration. *Pediatr Res.* 48 (6): 725-30.
75. Guerrini, R., Carrozzo, R. (2001). Epilepsy and genetic malformations of the cerebral cortex. *American Journal of Medical Genetics* 106:160-173.
76. Guerrini, R., Carrozzo, R. (2001). Epileptogenic brain malformations: clinical presentation, malformative patterns and indications for genetic testing. *Seizure* 10:532-547.
77. Guerrini, R., Marini, C. (2006). Genetic malformations of cortical development. *Exp Brain Res* 173:322-333.
78. Guerrini, R., Carrozzo, R. (2001). Epilepsy and genetic malformations of the cerebral cortex. *Am J Med Genet.* 106:160-173.
79. Güttinger, M., Fedele, D. E., Koch, P., Padrun, V., Pralong, W., Brüstle, O., Boison, D. (2005) Suppression of kindled seizures by paracrine adenosine release from stem cell derived brain implants. *Epilepsia*, 46: 1-8.
80. Güttinger, M., Padrun, V., Pralong, W., Boison, D. (2005) Seizure suppression and lack of adenosine A1 receptor desensitization after focal long-term delivery of adenosine by encapsulated myoblasts. *Exp. Neurol.*, 193: 53-64.
81. Haberly, L. B., Sutula, T. P. (1992) Neuronal processes that underlie expression of kindled epileptiform events in the piriform cortex in vivo. *J. Neurosci.*, 12: 2211-2224.
82. Haberman, R. P., Samulski, R. J., McCown, T. J. (2003) Attenuation of seizures and neuronal death by adeno-associated virus vector galanin expression and secretion. *Nat. Med.*, 9: 1076-1080.
83. Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N. and Gotz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* 229,:15-30.
84. Hatten, M.E., (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 511-539.
85. Hattorri, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1994). Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 360: 216-218.
86. Herzog, H., Darby, K., Ball, H., Hort, Y., Beck-Sickingler, A., Shine, J. (1997) Overlapping gene structure of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation. *Genomics*, 41: 315-319.
87. Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A.M., Mumby, M.C., Cooper, J.A., Herz, J., (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24: 481-489.
88. Higginbotham, H.R., Gleeson, J.G. (2007) The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci.* 30 (6): 276-83.
89. Hirotsune, S et al. (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nature Genet.* 19: 333-339
90. Hsich, G., Sena-Esteves, M., Breakefield, X. O. (2002) Critical issues in gene therapy for neurologic disease. *Hum. Gene Ther.*, 13: 579-604
91. Holmes, G. L., Ben-Ari, Y. (2003) Seizing hold of seizures. *Nat. Med.*, 9: 994-996.
92. Hong, S.E. et al. (2000) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat. Genet.* 26: 93–96
93. Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S.G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J., Reiner, O., (1999). Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum. Mol. Genet.* 8: 1599-1610.

94. Houser CR, Esclapez M. Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures. (1996) *Epilepsy Res.* 26(1):207-218.
95. Hosford DA, Clark S, Cao Z, et al. (1992) The role of GABAB receptor activation in absence seizures of lethargic (lh/lh) mice. *Science.* 257(5068): 398-401.
96. Howell, B.W., Hawkes, R., Soriano, P., Cooper, J.A., (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389: 733-737.
97. Howell, B.W., Herrick, T.M., Cooper, J.A., (1999). Reelin-induced tyrosine phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev.* 13: 643-648.
98. Kato, M. et al. (2004) Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. *Hum. Mutat.* 23:147-159.
99. Jeong, S. W., Chu, K., Jung, K. H., Kim, S. U., Kim, M., Roh, J. K. (2003) Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 34: 2258-2263.
100. Jin, Z. et al. (2007) Disease-associated mutations affect GPR56 protein trafficking and cell surface expression. *Hum. Mol. Genet.* 16: 1972- 1985.
101. Keays, D.A., Tian, G., Poirier, K. et al. Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell.* 128:45-57.
102. Kerjan, G., Gleeson JG. (2007) A missed exit: Reelin sets in motion Dab1 polyubiquitination to put the break on neuronal migration. *Genes Dev* 21 (22): 2850-4.
103. Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodriguez-Gomez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., McKay, R. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 418: 50-56.
104. Kim, MK., Park, MS., Kim, BC., Cho, KH., Kim, YS., Kim, JH., Lee, MC., Heo, T., Kim, EY. (2005). A novel missense mutation of doublecortin: Mutation analysis of Korean patients with subcortical band heterotopia. *J Korean Med Sci* 20:670-3.
105. Kitamura, K. et al. (2002) Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat. Genet.* 32: 359-36.
106. Kriegstein, A.R. and Noctor, S.C. (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27: 392-399
107. Krumholz A, Wiebe S, Gronseth G, et al. (2007) Practice Parameter: evaluating an apparent unprovoked first seizure in adults (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology.* 69(21):1996-2007.
108. Kuruba, R., Hattiangady, B., Shetty, AK. (2009) Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy and Behavior* 14:65-73.
109. Kwon, Y.T., Tsai, L.H. (2000). The role of the p35/cdk5 kinase in cortical development. *Results Probl. Cell Differ.* 30: 241-253
110. Kwon, Y.T., Gupta, A., Zhou, Y., Nikolic, M. and Tsai, L.H. (2000). Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35/Cdk5 kinase. *Curr. Biol.* 10: 363-372
111. Lambert de Rouvroit, C., Goffinet, M. (2001) Neuronal migration. *Mechanisms of Development* 105: 47-56.
112. Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V. and Parnavelas J. G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 19: 7881-7888.
113. Law, A.K., Pencea, V., Buck, C.R., Luskin, M.B. (1999). Neurogenesis and neuronal migration in the neonatal rat forebrain anterior subventricular zone do not require GFAP-positive astrocytes. *Dev. Biol.* 216: 622-634.
114. Lawrence, M. S., Ho, D. Y., Dash, R., Sapolsky, R. M. (1995) Herpes simplex virus vectors overexpressing the glucose transporter gene protect against seizure-induced neuron loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7247-7251.
115. Lee, K. S., Schubert, P., Heinemann, U. (1984) The anticonvulsive action of adenosine: a postsynaptic, dendritic action by a possible endogenous anticonvulsant. *Brain Res.*, 321: 160-164.

116. Levison SW & Goldman JE (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron*, 10: 201-212
117. Lin, E. J., Richichi, C., Young, D., Baer, K., Vezzani, A., During, M. J. (2003) Recombinant AAV-mediated expression of galanin in rat hippocampus suppresses seizure development. *Eur. J. Neurosci.*, 18: 2087-2092.
118. Li, T., Steinbeck, J. A., Lusardi, T., Koch, P., Lan, J. Q., Wilz, A., Segschneider, M., Simon, R. P., Brustle, O., Boison, D. (2007) Suppression of kindling epileptogenesis by adenosine releasing stem cell-derived brain implants. *Brain*, in press.
119. Liu, W., He, X., Cao, Z., Sheng, J., Liu, H., Li, Z., Li, W. (2005) Efficient therapeutic gene expression in cultured rat hippocampal neurons mediated by human foamy virus vectors: a potential for the treatment of neurological diseases. *Intervirology*, 48: 329-335.
120. Lo Nigro C, Chong CS, Smith AC, Dobyns WB, Carrozzo R, Ledbetter DH (1997) Point mutations and an intragenic deletion of LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Human Mol Genet* 6:157-164.
121. Loo, D.T., Kanner, S.B. and Aruffo, A. (1998). Filamin binds to the cytoplasmic domain of the β 1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction. *J. Biol. Chem.* 273: 23304-23312.
122. Loscher, W., Schmidt, D. (2006) Experimental and clinical evidence for loss of effect (tolerance) during prolonged treatment with antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 47: 1253-1284.
123. LoTurco, J., Bai, J. (2006). The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *TREND in Neurosciences Vol.29 No.7*
124. LoTurco, J. (2004). Doublecortin and a Tale of Two Serines. *Neuron*. 41(2):175-7.
125. Lu, J., Sheen, V. (2005). Periventricular heterotopia. *Epilepsy Behav.* 7:143-149.
126. Lu, J. Tiao, G., Folkert, R. et al. (2006). Overlapping expression of ARFGEF2 and Filamin A in the neuroependymal lining of the lateral ventricles: insights into the cause of periventricular heterotopia. *J Comp Neurol.* 494:476-484.
127. Magdaleno, S., Keshvara, L. and Curran, T. (2002). Rescue of ataxia and preplate splitting by ectopic expression of reelin in reeler mice. *Neuron* 33: 573-586.
128. Manent, J.B., Demarque, M., Jorquera, I., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., Represa, A. (2005). A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration, *J Neurosci.* 25:4755-65.
129. Manent, JB., Wang, Y., Chang, Y., Paramasivam, M., LoTurco, JJ. (2009) Dcx reexpression reduces subcortical band heterotopia and seizure threshold in an animal model of neuronal migration disorder. *Nat Med* 15(1): 84-90.
130. Marín- Padilla, M. (1999). Desarrollo de la corteza cerebral humana. Teoría citoarquitectónica. [RevNneuro] 1999; 29: 208-16].
131. Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA, Mewborn SK, Dudlicek LL, Ramocki MB, Pilz DT, Mills PL, Das S, Ross ME, Ledbetter DH, Dobyns WB. (2001) Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet.* 9(1):5-12.
132. Matsumoto, N., Pilz, D.T., Ledbetter, D.H., (1999) Genomic structure, chromosomal mapping, and expression pattern of human DCAMKL1 (KIAA0369), a homologue of DCX (XLIS). *Genomics* 56: 179-183.
133. Mazarati, A. M. (2004) Galanin and galanin receptors in epilepsy. *Neuropeptides*, 38: 331-343.
134. McCormick DA. (1992) Cellular mechanisms underlying cholinergic and noradrenergic modulation of neuronal firing mode in the cat and guinea pig dorsal lateral geniculate nucleus. *J Neurosci.* 12(1):278-89.
135. McCown, T. J. (2006) Adeno-associated virus-mediated expression and constitutive secretion of galanin suppresses limbic seizure activity in vivo. *Mol. Ther.*, 14: 63-68.
136. McGaraughty, S., Jarvis, M. F. (2006) Purinergic control of neuropathic pain. *Drug Dev. Res.*, 67: 376-388.
137. Metin, C., Baudoin, J. P., Ropert, N. (2006). Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 23: 894-900.

138. Metin, C. and Godement, P. (1996). The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons. *J. Neurosci.* 16:3219-3235.
139. Meyer G, Goffinet AM & Fairén A (1999). What is a Cajal-Retzius cell? A reassessment of a classical cell type based on recent observations in the developing cortex. *Cerebral Cortex*, 9: 765-775.
140. Miller, M. W. (1985). Cogeneration of retrogradely labelled corticocortical projection and GABA-immunoreactive local circuit neurons in cerebral cortex. *Brain Res.* 355: 187-192.
141. Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. and Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31: 727-741.
142. Moores, C.A., Perderiset, M., Francis, F. et al. Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol. Cell.* 14:833-839.
143. Morest, D. K. A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 130: 265-305.
144. Morris, N. R., Efimov, V. P., and Xiang, X. (1998). Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol.* 8: 467-470.
145. Morrison, S. J., Shah, N. M., Anderson, D. J. (1997) Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88: 287-298.
146. Mueller, B.K. (1999). Growth cone guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 351-388.
147. Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R. O. and Parnavelas, J. G. (2002). Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nature Neurosci.* 5: 218-224.
148. Nadarajah, P., Alifragis, R.O.L., Wong² and J.G. Parnavelas. (2003). Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex: Observations Based on Real-time Imaging. *Cerebral Cortex*; 13:607–611; 1047–3211/03
149. Nadarajah, B., Brunstrom, J. E. Grutzendler, J., Wong, R. O. and Pearlman, A. L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature Neurosci.* 4: 143-150.
150. Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Wong, R.O.L., Pearlman, A.L. (1999). Somal translocation during early layer formation in developing neocortex. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25: 504.
151. Nadarajah, B., Parnavelas, J.G., (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 3 (6): 423-32.
152. Nadkarni, S., LaJoie, J., Devinsky, O. (2005) Current treatments of epilepsy. *Neurology*, 64: S2-11.
153. Nagano, T. et al. (2002) Filamin A-interacting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone. *Nat. Cell Biol.* 4: 495–501
154. Nagano, T. et al. (2004) Filamin A and FILIP (filamin A-interacting protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration. *J. Neurosci.* 24: 9648–9657
155. Nakajima, K. (2007) Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Neurochemistry International* . 51: 121-131.
156. Nikolic, M. Chou, M.M., Lu, W., Mayer, B.J. and Tsai, L.H. (1998). The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 395: 19-24.
157. Nilsen, K. E., Cock, H. R. (2004) Focal treatment for refractory epilepsy: hope for the future? *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 44: 141-153.
158. Noctor, S.C. et al. (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714–720.
159. Noctor, S.C. et al. (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci.* 22: 3161–3173.
160. Nomura, T., Takahashi, M., Hara, Y., Osumi, N. 2008 Jan. Patterns of Neurogenesis and Amplitude of Reelin Expression Are Essential for Making a Mammalian-Type Cortex. *Plos One*; 3(1): e1454.
161. Oakley, B. R. and Morris, N. R. (1981). A β -tubulin mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without blocking assembly. *Cell* 24: 837-845.
162. Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M., McKay, R. D. (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech. Dev.*, 59: 89-102.

163. O'Rourke, N. A., Dailey, M. E., Smith, S. J. and McConnell, S. K. (1992). Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258: 299-302.
164. Pankratov, Y. V., Ivanov, A. I., Kolokoltsova, T. D., Nechayeva, Y. A., Radayeva, I. F., Korochkin, L. I., Revischin, A. V., Naumov, S. A., Khlusovi, I. A., Autenshlus, A. I. (2003) Cell-based therapy of chronic degenerative diseases of the central nervous system. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 534: 97- 105
165. Park, HT., Wu, J., Rao, Y. 2002. Molecular control of neuronal migration. *BioEssays* 24: 821-27.
166. Parnavelas JG (1999). Glial cell lineages in the rat cerebral cortex. *Experimental Neurology*, 156: 418-429.
167. Parnavelas JG. 2(000). The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci*; 23 (3): 126-31.
168. Parnavelas, J.G. (2002). The origin of cortical neurons. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35:1423-1429.
169. Parnavelas, J.G., Dinopoulos A & Davies SW (1989). The central visual pathways.
170. Pearlman, A.L., Faust, P.L., Hatten, M.E. and Brunstrom, J.E. (1998). New directions for neuronal migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 45-54.
171. Piao, X. et al. (2004) G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science* 303: 2033–2036.
172. Pignataro, G., Studer, F. E., Wilz, A., Simon, R. P., Boison, D. (2006) Neuroprotection in ischemic mouse brain induced by stem cell derived brain implants. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22.
173. Pilz, DT., Kuc, J., Matsumoto, N., Bodurtha, J., Bernardi, B., Tassinari, CA., Dobyns, WB., Ledbetter, DH. (1999). Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in DCW (XLIS) or LIS1. *Human Molecular Genetics*, 8(9):1757-60.
174. Pilz, D., Stoodley, N., Golden JA. (2002) Jan. Neuronal Migration, Cerebral Cortical Development, and Cerebral Cortical Anomalies. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(1): 1-11.
175. Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A., Furlan, R., Comi, G., Vescovi, A. L., Martino, G. (2003) Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature*, 422: 688-694.
176. Poirier, K., Keays, D.A., Francis, F. et al. Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). *Hum. Mutat.* 28:1055-1064.
177. Polleux, F., Whitford, K. L., Kijkhuizen, P. A., Vitalis, T., Ghosh, A. (2002). Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signalling. *Development* 129: 3147-3160.
178. Powell, E. M., Mars, W. M., and Levitt, P. (2001). Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* 30, 79-89.
179. Rakic, P. (1985). Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227: 1054-1056.
180. Rakic P. (1974) Neurons in Rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183:425–427.
181. Rakic, P. et al. (1996) Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 9218–9222
182. Rakic, P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia* 46: 882-891.
183. Rakic, P. (1995) Radial versus tangential migration of neuronal clones en the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (25):11323-7.
184. Rakic, P. (2007) The radial edifice of cortical architecture: From neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Res Rev*, 55 (2): 204-19.
185. Redies, C. and Takeichi, M. (1993) Expression of N-cadherin mRNA during development of the mouse brain. *Dev. Dyn.* 197: 26-39.
186. Redrobe, J. P., Dumont, Y., Herzog, H., Quirion, R. (2003) Neuropeptide Y (NPY) Y2 receptors mediate behaviour in two animal models of anxiety: evidence from Y2 receptor knockout mice. *Behav. Brain Res.*, 141: 251-255.
187. Reiner, O., Coquelle, FM., Peter, B., Levy, T., Kaplan, A., Sapir, T., Orr, I., Barkai, N., Eichele, G., Bergmann, S. (2006) The evolving doublecortin (DCX) superfamily. *BMC Genomics* 7:188.

188. Richichi, C., Lin, E. J., Stefanin, D., Colella, D., Ravizza, T., Grignaschi, G., Veglianesi, P., Sperk, G., During, M. J., Vezzani, A. (2004) Anticonvulsant and antiepileptogenic effects mediated by adeno-associated virus vector neuropeptide Y expression in the rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 24: 3051-3059.
189. Rice, D.S. and Curran, Y. (2001). Role of the reelin signalling pathway in central nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1005-1039.
190. Rivas, R.J. and Hatten, M.E. (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 15: 981-989.
191. Roll, P. et al. (2006) SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Hum. Mol. Genet.* 15: 1195-1207.
192. Santavuori, P., Somer, H., Sainio, K. Et al. (1989). Muscle-eye-brain disease (MEB). *Brain Dev.* 11:147-153.
193. Sasaki S, Shionoya A, Ishida M, Gambello MJ, Yingling J, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S (2000) A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* 28:681-696.
194. Scharfman HE, Schwartzkroin PA. (1989). Protection of dentate hilar cells from prolonged stimulation by intracellular calcium chelation. *Science*;246(4927):257-60.
195. Scheffer, IE., Berkovic, SF. (2003) The genetics of human epilepsy. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 24(8):428-433.
196. Sertie, A.L. et al. (2000) Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). *Hum. Mol. Genet.* 9: 2051-2058.
197. Sharma, C.P., Ezzell, R.M. and Arnaout, M.A. (1995). Direct interaction of filamin (ABP-280) with the β 2-integrin subunit CD18. *J. Immunol.* 154: 3461-3470.
198. Sheen, V.L. et al. (2003) Periventricular heterotopia associated with chromosome 5p anomalies. *Neurology* 60: 1033-1036.
199. Sheen, V.L. and Walsh, C.A. (2003) Developmental genetic malformations of the cerebral cortex. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 3: 433-441
200. Sheldon, M., Rice, D.S., D'Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Howell, B.W., Cooper, J.A., Goldowitz, D., Curran, T. (1997) Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature* 389: 730-733.
201. Shetty-Alva, N. (2007) Lissencephaly Variant of Band Heterotopia: PET Peeves. *Pediatr Neurol.* 37(6):454-5.
202. Sicca, F. et al. (2003) Mosaic mutations of the LIS1 gene cause subcortical band heterotopia. *Neurology* 61: 1042-1046
203. Silva, A. P., Xapelli, S., Grouzmann, E., Cavadas, C. (2005) The putative neuroprotective role of neuropeptide Y in the central nervous system. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, 4: 331-347.
204. Sociedad Española de Neurología (http://www.sen.es/publico/video_epilepsia.htm).
205. Sossey-Alaoui, K., Srivastava, A.K., 1999. DCAMKL1, a brain-specific transmembrane protein on 13q12.3 that is similar to doublecortin (DCX). *Genomics* 56, 121-126.
206. Spencer SS. Seizures and epilepsy. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2007: chap 426.
207. Stein, A. G., Eder, H. G., Blum, D. E., Drachev, A., Fisher, R. S. (2000) An automated drug delivery system for focal epilepsy. *Epilepsy Res.*, 39: 103-114
208. Studer, F.E., Fedele, D.E., Marowsky, A., Schwerdel, C., Wernli, K., Vogt, K., Fritschy, J.-M., Boison, D., (2006). Shift of adenosine kinase expression from neurons to astrocytes during postnatal development suggests dual functionality of the enzyme. *Neuroscience* 142: 125-137.
209. Tabata, H. and Nakajima, K. (2003) Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 23: 9996-10001.
210. Taylor, I., Scheffer, IE., Berkovic, SF. (2003) Occipital epilepsies: identification of specific and newly recognized syndromes. *Brain* 126(4): 753-69.
211. Tanaka, T., Koizumi, H., Gleeson, JG. (2006) The doublecortin and doublecortin-like kinase 1 genes cooperate in murine hippocampal development. *Cereb Cortex* 16:i69-i73.

212. Tanaka, D. H., Maekawa, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Murakami, F. (2006). Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. *Development* 133: 2167-2176.
213. Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., Murakami, F. (2003). Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* 130: 5803-5813.
214. Tassi, L., Colombo, N., Cossu, M. Et al. (2005). Electroclinical, MRI and neuropathological study of 10 patients with nodular heterotopia, with surgical outcomes. *Brain*. 128:321-337.
215. Tessier-Lavigne, M., Goodman, C., (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274: 1123-1133.
216. Tian, G. F., Azmi, H., Takano, T., Xu, Q. W., Peng, W. G., Lin, J., Oberheim, N., Lou, N. H., Wang, X. H., Zielke, H. R., Kang, J., Nedergaard, M. (2005) An astrocytic basis of epilepsy. *Nat. Med.*, 11: 973-981.
217. Thompson, K., Anantharam, V., Behrstock, S., Bongarzone, E., Campagnoni, A., Tobin, A. J. (2000) Conditionally immortalized cell lines, engineered to produce and release GABA, modulate the development of behavioral seizures. *Exp. Neurol.*, 161: 481-489.
218. Tomson T, Hiilesmaa V. (2007) Epilepsy in Pregnancy. *BMJ*. 335(7623):769-73.
219. Thompson, K. W., Suchomelova, L. M. (2004) Transplants of Cells Engineered to Produce GABA Suppress Spontaneous Seizures. *Epilepsia*, 45: 4-12.
220. Toda, T., Ikegawa, S., Okui, K. et al. (1994). Refined mapping of a gene responsible for Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: evidence for Sorong linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet*. 55:946-950.
221. Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Herz, J., (1999) Reeler/ Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, 689±701.
222. Trudy Pang, MD., Ramin Atefy, MD., Volney Sheen, MD. 2008 May. Malformations of cortical development. *The Neurologist* 14(3):181-91.
223. Tsai, J.W. et al. (2005) LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *J. Cell Biol.* 170: 935–945.
224. Ulrich, H., Majumder, P. (2006) Neurotransmitter receptor expression and activity during neuronal differentiation of embryonal carcinoma and stem cells: from basic research towards clinical applications. *Cell Prolif.*, 39: 281-300.
225. Uylings HBM, Van Eden CG, Parnavelas JG & Kalsbeek A (1990). The prenatal and postnatal development of rat cerebral cortex. In: Kolb B & Tees RC (Editors), *The Cerebral Cortex of the Rat*. MIT Press, Cambridge, MA, USA, 35-76.
226. Vezzani, A., Sperk, G. (2004) Overexpression of NPY and Y2 receptors in epileptic brain tissue: an endogenous neuroprotective mechanism in temporal lobe epilepsy? *Neuropeptides*, 38: 245-252.
227. Walsh CA. (1999) Genetic malformation of the cerebral cortex. *Neuron* 23:19–29
228. Wechsler-Reya, R.J., Scott, M.P. (1999) Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22: 103-114.
229. Weimer, JM., Anton, ES. (2006) Doubling Up on Microtubule Stabilizers: Synergistic Functions of Doublecortin-like Kinase and Doublecortin in the Developing Cerebral Cortex. *Neuron*. 49 (1): 3-4.
230. Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18: 779-791.
231. Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M., Herrera, D. G. and Alvarez-Buylla, A. (1999). Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nature Neurosci.* 2: 461-466.
232. Wichterle, H., Turnbull, D. H., Nery, S., Fishell, G. and Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128: 3759-3771.
233. Winn, S. R., Lindner, M. D., Lee, A., Haggett, G., Francis, J. M., Emerich, D. F. (1996) Polymer-encapsulated genetically modified cells continue to secrete human nerve growth factor for over one year in rat ventricles: behavioural and anatomical consequences. *Exp. Neurol.*, 140: 126-138.

234. Woldbye, D. P., Nanobashvili, A., Sorensen, A. T., Husum, H., Bolwig, T. G., Sorensen, G., Ernfors, P., Kokaia, M. (2005) Differential suppression of seizures via Y2 and Y5 neuropeptide Y receptors. *Neurobiol. Dis.*, 20: 760- 772.
235. Wynshaw-Boris, A. and Gambello, M. J. (2001). LIS1 an dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes Dev.* 15: 639-651.
236. Xiang, X., Osmani, A. H., Osmani, S. A., Xin, M. and Morris, N. R. (1995) NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS1-1 gene required for neuronal migration. *Mol. Biol. Cell* 6:297-310.
237. Xiang, X., Zuo, W., Efimov, V. P. and Morris, N R. (1999). Isolation of a new set of *Aspergillus nidulans* mutants defective in nuclear migration. *Curr. Genet.* 35: 626-630.
238. Yoshida, A., Kobayashi, K., Manya, H. et al. (2001). Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell.* 1:717-724.
239. Yuan, W. et al. (1999). The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev. Biol.* 212: 290-306.
240. Yusta, A. (2005) Crisis convulsivas. Concepto, clasificación y etiología. Servicio de Neurología. Hospital Universitario de Guadalajara. *Emergencias*; 17:S68-S73.