

**Tesis presentada para optar al título de Magister en Biología
Molecular Médica de la Universidad de Buenos Aires**

“Evaluación de células progenitoras de tipo OPCs (Oligodendroglial precursor cells) en especímenes cerebrales quirúrgicos obtenidos de pacientes con epilepsia focal farmacorresistente: análisis inmunohistoquímico y molecular”

Médica Mónica Beatriz Mezmezian

Director: Dr. Gustavo Sevlever

Co-Director: Dr. Horacio Martinetto

Institución de desarrollo: Laboratorio de Neuropatología y de Biología Molecular.
Fundación de Lucha contra las enfermedades neurológicas de la infancia (FLENI)

Buenos Aires, Julio de 2016

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi director, el Dr. Gustavo Sevlever, por permitirme realizar el proyecto de tesis en el Laboratorio de Neuropatología y Biología molecular de FLENI. También por aceptar todas mis ideas y proposiciones para el proyecto, transmitirme su experiencia y darme los medios y recursos necesarios para llevar adelante el trabajo.

Al Dr. Horacio Martinetto por haberme enseñado las técnicas de biología molecular y por estar siempre disponible cuando tenía una duda o necesitaba discutir los resultados que iba teniendo a cada paso.

Al Dr. Ezequiel Surace por su gran ayuda en la comprensión de la metodología de la técnica de PCR en tiempo real y su interpretación y análisis. También le agradezco sus opiniones y sugerencias en el análisis estadístico de los datos.

A la Dra. Eugenia Arias Cebollada por haberme ayudado a obtener las muestras congeladas y por sus comentarios y opiniones en el desarrollo de mi proyecto.

A la Dra. Agata Fernandez Gamba por brindarme todos los datos necesarios para hacer las PCR y explicarme las dudas que me iban surgiendo de la técnica y del análisis.

Al histotécnico Marcelo Schultz por realizar las técnicas de inmunohistoquímica y por la puesta a punto de las mismas.

A la Dra. Naomi Arakaki y al Dr. Miguel Riudavets por permitirme utilizar los casos diagnosticados por ellos y por sus opiniones y consejos en distintos momentos de mi proyecto.

Y en general, quiero agradecer a todos en el laboratorio por haberme tratado como una integrante más del lugar y estar bien predispuestos para cualquier inquietud o necesidad que tuviera a lo largo de la realización de mi tesis.

Así mismo, quiero agradecerle a la Dra. María Luisa Deforel por su gran ayuda en el análisis de los datos y por explicarme y ayudarme con el análisis estadístico, tanto en este proyecto como en cada trabajo de investigación que realizo.

También le agradezco a la Dra. Mónica Carassai por sus consejos y su apoyo en los proyectos en conjunto y en los que realizo fuera del hospital.

Y especialmente, quiero agradecerles a Caro, Lau Santola y a mi familia por su compañía y ánimo a lo largo de este trabajo de tesis y por todo el cariño que me dan cada día.

Índice

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCION	
1. Epilepsia, crisis epiléptica, epilepsia farmacorresistente: definiciones	6
2. Epilepsia: clasificación de convulsiones	6
3. Epilepsia: etiologías	7
3.1- Displasias corticales focales (DCF)	7
3.2- Esclerosis del hipocampo (HS)	8
4. Epilepsia: Tratamiento quirúrgico	9
5. Células precursoras de oligodendrocitos (OPCs)	
5.1- Características, funciones y marcadores	9
5.2- Relación con patología de la epilepsia	10
OBJETIVOS DEL PROYECTO	14
MATERIALES Y METODOS	15
1. Estudios moleculares	
1.1- Extracción del ARN	15
1.2- Cuantificación del ARN	15
1.3- Técnica de transcripción reversa	16
1.4- Técnica de Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real	16
1.5- Método de análisis de PCR en tiempo real	17
2. Técnica de doble tinción de inmunohistoquímica	17
3. Análisis estadístico	18
RESULTADOS	19
1. Comparación entre Patologías no tumorales asociadas a epilepsia farmacorresistente	19
1.1- Expresión de ARNm de genes marcadores de OPCs: NG2 y PDGF α R	19
1.2- Tinción doble de inmunohistoquímica con anticuerpos marcadores de OPCs: PDGF α R y Olig2	20
2. Comparación entre pacientes con distintos tiempos de evolución	21
2.1- Expresión de ARNm de genes marcadores de OPCs: NG2 y PDGF α R	21
2.2- Tinción doble de inmunohistoquímica con anticuerpos marcadores de OPCs: PDGF α R y Olig2	22
3. Comparación entre pacientes con distinta edad de inicio de los síntomas	23
3.1- Expresión de ARNm de genes marcadores de OPCs: NG2 y PDGF α R	23
3.2- Tinción doble de inmunohistoquímica con anticuerpos marcadores de OPCs: PDGF α R y Olig2	24
4. Comparación entre pacientes con distinta edad en el momento de la cirugía	25
4.1- Expresión de ARNm de genes marcadores de OPCs: NG2 y PDGF α R	25
4.2- Tinción doble de inmunohistoquímica con anticuerpos marcadores de OPCs: PDGF α R y Olig2	26
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	29
CONCLUSIÓN	35
BIBLIOGRAFIA	37
APENDICE 1	
A. Citoarquitectura normal de la Corteza cerebral	38
B. Citoarquitectura normal del Hipocampo	38
APENDICE 2	
Información ética de investigación del proyecto	39

RESUMEN

Introducción. La epilepsia es una enfermedad neurológica frecuente que afecta a más de 50 millones de personas en todo el mundo. Cuando las crisis epilépticas permanecen por dos años refractarias al tratamiento farmacológico se plantea la intervención quirúrgica. Las entidades clínico-patológicas más frecuentemente observadas en los especímenes quirúrgicos por farmacorresistencia son la Esclerosis del hipocampo (HS), los Tumores asociados a epilepsia de larga data y las Malformaciones del desarrollo cortical dentro de las cuales se encuentran las Displasias corticales focales (DCF). Tanto para la HS como para la DCF existe una clasificación principalmente histopatológica publicada por la Liga internacional contra la epilepsia que las divide en distintos tipos. A su vez, cuando la HS se asocia a DCF tipo II se define como Patología dual (PD). Se ha descrito, en algunas de estas patologías y en entidades histopatológicas no definidas asociadas a epilepsia farmacorresistente, un incremento de células oligo-like en sustancia blanca y en capas corticales profundas. En algunos de estos estudios han identificado que parte de esas células correspondían a células precursoras oligodendrogiales (OPCs). **Objetivos.** Evaluar las OPCs en las DCF, HS y PD con el fin de determinar su implicancia en estas patologías. **Materiales y métodos.** Se han evaluado las OPCs utilizando doble inmunotinción con los anticuerpos PDGF α R y Olig2 y por medio de la técnica de PCR en tiempo real para evaluar la expresión relativa de los transcritos de PDGF α R y de NG2 (marcadores putativos de las OPCs) a nivel de sustancia gris de neocorteza en 8 casos con DCF, 5 casos con HS y 3 con PD. La edad media de los pacientes fue de 33 ± 15 años, siendo 10 mujeres y 6 varones. **Resultados.** Al evaluar el nivel de expresión relativa de los transcritos de PDGF α R y NG2 no se observaron diferencias significativas entre las tres patologías estudiadas. Tampoco se detectaron diferencias significativas en la mediana de células doble positivas. Al dividir los casos en base a la edad al inicio de las crisis se evidenció un incremento significativo en el número de OPCs totales en los pacientes con un inicio de crisis a edades mayores de 16 años comparados con los que iniciaron sus crisis a edades menores a 5 años ($p=0,022$, Test de Kruskal Wallis), mostrando a su vez correlación positiva significativa entre la edad de inicio y el número de OPCs totales ($r=0,706$, $p=0,0029$; correlación de Spearman) y en posición de satelitosis perineuronal ($r=0,695$, $p=0,003$). El análisis en base al tiempo de evolución de las crisis no mostró diferencias significativas ni en el nivel de transcritos ni en el número de células dobles positivas. Al agrupar los casos en base a la edad en el momento de la cirugía se observó incremento significativo del número de OPCs en posición de satelitosis perineuronal entre el grupo de pacientes mayores a 36 años y el de menores a 20 años ($p=0,049$), detectándose a su vez correlación positiva significativa entre ambas variables ($r=0,694$, $p=0,003$). Posteriormente, identificamos que los casos de pacientes mayores al momento de la cirugía se correspondían en parte con aquellos que presentaban edades tardías de inicio de las crisis. **Conclusiones.** La población de células precursoras oligodendrogiales a nivel de sustancia gris de neocorteza no mostró diferencias significativas entre casos con displasia cortical focal, esclerosis del hipocampo y patología dual, interpretando que estas células no se verían afectadas en forma diferente entre estas patologías y especulando así mismo, en asociación con hallazgos en trabajos previos, que no intervendrían en forma significativa con el incremento de células oligo-like descrito en estas patologías. A su vez, hemos identificado que la afectación de crisis convulsivas desde edades tempranas de la vida generaría una reducción del número de estas células con respecto a pacientes con debut más tardío de inicio de las crisis. Consideramos que este hallazgo podría deberse a una mayor susceptibilidad de estas células ante el daño producido por las crisis en pacientes pediátricos menores a 5 años.

ABSTRACT

Introduction. Epilepsy is a frequent neurological disease which affects about 50 million people worldwide. Surgical intervention is considered when the seizures are refractory to pharmacological treatment during more than two years. The three most common clinic-pathological diseases observed in surgical cerebral specimens from patients with therapy-refractory epilepsies are hippocampal sclerosis (HS), long-term epilepsy-associated tumors and malformations of cortical development. Focal cortical dysplasia (FCD) belongs to the last group. There is a histopathological classification of both HS and FCD published by the International League against Epilepsy. When HS is associated to FCD type II is defined as Dual Pathology (DP). Both in some of these pathologies and in not well defined histopathological entities associated with therapy-refractory epilepsies have been described an increase of oligo-like cells in white matter and in deep cortical gray matter. Few of those publications have identified that some of the cells were oligodendroglial precursor cells (OPCs). **Objectives.** Evaluating the OPCs in FCD, HS and DP with the aim of determining their implication in these entities. **Material and Methods.** OPCs have been evaluated using both dual immunohistochemical with PDGF α R and Olig2 antibodies and Real time PCR to study relative expression of PDGF α R and NG2 mRNA transcripts (putative markers of OPCs). The study was performed in the neocortex grey matter of 8 cases with FCD, 5 cases of HS and 3 cases with DP. Average age of patients was 33 years old; ten were females and six were males. **Results.** There were not significant differences in the relative expression of both transcripts between the three analyzed pathologies. Neither has it been observed significant differences in the median of double positive cells. We detected a statistical significant increase of total number of OPCs in the group of patients older than 16 years old compared to those patients younger than 5 years old at seizure onset ($p=0.022$, Kruskal Wallis test). We also observed a positive significant correlation between age of seizure onset and total number of OPCs ($r=0.706$, $p=0.0020$; Spearman correlation) and perineuronal OPCs ($r=0.695$, $p=0.003$). There were no significant differences in the number of OPCs or in the expression levels of transcripts based on epilepsy duration. We found an increase in the number of perineuronal OPCs in the group of patients older than thirty-six years old at the surgical time in relation to patients younger than twenty years old ($p=0.049$). We also detected positive significant correlation between the number of perineuronal OPCs and age of patients at surgical time ($r=0.694$, $p=0.003$). Then we noticed that patients older than thirty-six years old at the surgical time were in part those with the later onset. **Conclusions.** Focal cortical dysplasia, hippocampal sclerosis and dual pathology did not show significant differences in oligodendroglial precursor cell population, deducing that these cells would not be affected in a different way between these entities. In association with previous publications we speculate that OPCs are not a significant component of the oligo-like cell increase described in these kinds of pathologies. Moreover, we have also identified that suffering seizures since early life ages would produce a reduction of the number of OPCs in comparison with an onset at higher ages than sixteen years old. We consider that this find might be a consequence of a greater susceptibility of these cells in front of damages generated by seizures in pediatric patients younger than five years old.

INTRODUCCION

1. Epilepsia, crisis epiléptica, epilepsia farmacorresistente: definiciones

La **epilepsia** es una enfermedad cerebral caracterizada predominantemente por la presencia de trastornos paroxísticos recurrentes denominados **crisis epilépticas**. Las mismas son de breve duración, generalmente convulsivas, con pérdida o no de conciencia y recuperación posterior y se deben a una actividad neuronal excesiva o sincrónica en el cerebro (1, 2, 3). La epilepsia no es una entidad única sino que representa diversos desórdenes que reflejan una disfunción cerebral subyacente (3), siendo una de las enfermedades neurológicas más frecuentes, ya que afecta a 1-2% de la población (4).

La **definición clínica (práctica) de la epilepsia** para la **Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE)** determina que la misma es una enfermedad cerebral caracterizada por alguna de las siguientes condiciones: 1- al menos dos crisis epilépticas no provocadas (o reflejas) que ocurran separadas por más de 24 horas; 2- una crisis epiléptica no provocada (o refleja) y una probabilidad de crisis futuras similar al riesgo de recurrencia general (al menos 60%) después de dos convulsiones no provocadas, que se producen en los 10 años subsiguientes; 3- diagnóstico de un síndrome de epilepsia (5).

La **epilepsia** no es necesariamente una enfermedad de toda la vida y **se considera “resuelta”** si una persona no ha tenido convulsiones en los últimos 10 años, no habiendo recibido medicamentos anticonvulsivantes en los últimos 5 años; o cuando una persona ha pasado la edad de un síndrome dependiente de la edad (5). Una epilepsia “resuelta” significa que la persona no tiene más epilepsia pero no garantiza que no retornará.

Se considera a la **epilepsia farmacorresistente** cuando ante un adecuado esquema de dos drogas antiepilépticas toleradas y apropiadamente elegidas (como monoterapia o en combinación) no se logra la ausencia de crisis sostenidas (6).

2. Epilepsia: clasificación de convulsiones

La ILAE sugiere la siguiente clasificación de convulsiones epilépticas (7): **1-Convulsiones generalizadas: Tónico-clónicas, Ausencias, Mioclónicas, Clónicas, Tónicas y Atónicas; 2- Convulsiones Focales y 3- Desconocidas.**

Las **convulsiones epilépticas generalizadas** conceptualmente se originan en un punto y de allí se distribuyen rápidamente en forma bilateral a la red. No necesariamente involucran toda la corteza cerebral y pueden ser asimétricas.

Las **convulsiones epilépticas focales** conceptualmente se originan en un foco de la red limitada a un hemisferio. Pueden originarse en una estructura subcortical. Por cada tipo de convulsión el inicio de esta se halla confinado a la misma localización de una convulsión a la otra, con un patrón de propagación que puede involucrar el hemisferio contralateral. En la clasificación actual de la ILAE la distinción entre el subtipo simple y complejo fue eliminada y sugieren describirlas de acuerdo a sus manifestaciones, por ejemplo, crisis focales motoras (7).

3. *Epilepsia: etiologías*

En lugar de los términos idiopático, criptogénico y sintomático, que se utilizaban anteriormente, la ILAE en el reporte publicado en el 2010, recomienda dividir las epilepsias en causas genéticas, estructurales/metabólicas y causas desconocidas (7).

1-Síndromes (Sme.) electro-clínicos organizados por edad de inicio: **1a- Periodo neonatal:** Epilepsia (Ep.) neonatal familiar benigna, Encefalopatía mioclónica (MC) temprana, Sme. de Ohtahara; **1b- Lactancia:** Ep. de la infancia con crisis focales migratorias, Sme. de West, Ep. MC de la infancia, Ep. benigna de la infancia, Ep. benigna de la infancia familiar, Sme. de Dravet, Encefalopatía MC en trastornos no progresivos; **1c- Infancia:** Crisis febriles plus (FS+), Sme. de Panayiotopoulos, Ep. con crisis MC atónicas (previamente astáticas), Ep. benigna con puntas centro-temporales, Ep. frontal nocturna AD, Ep. occipital de la infancia de inicio tardío (tipo Gastaut), Ep. con ausencias MC, Sme. de Lennox-Gastaut, Encefalopatía epiléptica con punta onda continua durante el sueño, Sme. de Landau-Kleffner, Ep. ausencia infantil; **1d- Adolescencia - Edad adulta:** Ep. ausencia juvenil, Ep. MC juvenil, Ep. con CGTC únicamente, Ep. MC progresivas, Ep. AD con características auditivas, Otras Ep. familiares del lóbulo temporal, Relación menos específica con la edad, Ep. familiar focal con focos variables, Ep. Reflejas. **2- Constelaciones distintivas:** *Ep. temporal mesial con esclerosis del hipocampo*, Sme. de Rasmussen, Crisis gelásticas con hamartoma hipotalámico, Ep. hemiconvulsión-hemiplejía, Aquellas Ep. que no puedan agruparse dentro de estas entidades pueden distinguirse primero por una condición conocida estructural o metabólica que pueda ser la causa y en segundo lugar por la forma de inicio de las crisis (generalizadas versus focales). **3-Epilepsias atribuidas a y organizadas según causas estructurales-metabólicas:** *Malformaciones del desarrollo cortical (displasia cortical focal, hemimegalencefalia, heterotopías, etc)*, Tumores, Síndromes neurocutáneos (complejo esclerosis tuberosa, Sturge-Weber, etc), Infección, Trauma, Angioma, Lesiones perinatales, Accidentes cerebrovasculares. **4- Epilepsias de causa desconocida.** **5- Condiciones con crisis epilépticas que no se diagnostican tradicionalmente como una forma de epilepsia per se:** Crisis neonatales benignas, Crisis febriles.

Las **epilepsias de causa genética** son el resultado de una alteración genética conocida o presumida en la cual las convulsiones son el principal síntoma del desorden.

Los **síndromes electro-clínicos** son un complejo de características clínicas, síntomas y signos que en conjunto definen un desorden clínico reconocible y distinguible. Estas características incluyen la edad de inicio de los síntomas, antecedentes y consecuencias cognitivas y del desarrollo; examen motor y sensitivo, características del Electroencefalograma (EEG), factores desencadenantes de las crisis y patrones de ocurrencia de crisis con respecto al sueño.

Las **constelaciones** son distinguibles por sus características clínicas, no habiendo sido posible llegar a un acuerdo si las mismas deben ser consideradas o no como síndromes.

Las **epilepsias metabólicas/estructurales** son secundarias a lesiones o condiciones metabólicas o estructurales específicas, sin un patrón electro-clínico específico comprendido en la actualidad.

A continuación se detallarán aquellas entidades estudiadas en el presente trabajo:

3.1- Displasias corticales focales (DCF): son malformaciones localizadas de la corteza cerebral (para detalle de la **Citoarquitectura normal de la corteza cerebral** ver ítem A del Apéndice 1) que frecuentemente están asociadas a epilepsia en niños y adultos y suelen ser farmacorresistentes. En el Electroencefalograma (EEG) se observan característicamente descargas focales, rítmicas epileptiformes. Por neuroimágenes se evidencia engrosamiento de la corteza cerebral, borramiento de la unión sustancia blanca (SB)- sustancia gris (SG), hiperintensidad en T2, pudiendo observarse además atrofia cerebral localizada (8). La ILAE publicó en el 2011 una clasificación de las DCF dividiéndolas en tres tipos: las DCF tipo I y tipo II son malformaciones aisladas mientras que las DCF III se asocian a otras patologías potencialmente epileptogénicas (8).

La **DCF tipo I** es una malformación que presenta alteración de la laminación cortical radial (**DCF tipo Ia**), tangencial (**DCF tipo Ib**) o combinada (**DCF tipo Ic**). La **DCF tipo Ia** (Ver Figura 1B) se caracteriza por la presencia de abundante organización microcolumnar, la misma se define como más de 8 neuronas alineadas en

una dirección vertical bajo condiciones técnicas específicas. La principal característica de la **DCF tipo Ib** (Ver Figura 1C) es la falta de organización en 6 capas tangenciales características de la isocorteza. Puede no reconocerse ninguna de las capas a excepción de la capa 1. En ambos subtipos puede observarse además, pérdida de la demarcación neta entre SB y SG, neuronas pequeñas inmaduras, neuronas piramidales hipertróficas fuera de la capa 5 o neuronas normales con dendritas sin orientación.

La **DCF II** presenta alteración de la laminación cortical junto con anomalías citológicas específicas. La **DCF tipo IIa** está caracterizada por la presencia de neuronas dismórficas (Ver Figuras 2A y 2B): neuronas con agrandamiento significativo del tamaño del citoplasma y del núcleo con alteración de la orientación, sustancia intracelular de Nissl agregada y desplazada hacia la membrana celular, y acumulación de neurofilamento (NF, marcador neuronal) en el citoplasma. La **DCF tipo IIb** presenta neuronas dismórficas y células balonzadas (Ver Figuras 2C y 2D): células de amplio citoplasma eosinófilo con ausencia de sustancia de Nissl, pudiendo presentar múltiples núcleos. Las células balonzadas muestran variable inmunotinción para Proteína gliofibrilar ácida (GFAP, marcador astrocitario) y NF, e incluso son positivas con Vimentina, proteína de filamentos intermedios. La SB subcortical suele presentar disminución de la tinción de mielina con técnica de Luxol-Fast-Blue. En ambos subtipos puede observarse además, pérdida de la laminación a excepción de la capa 1 y borramiento de la unión SB-SG por presencia de neuronas heterotópicas. Clínicamente, los pacientes con DCF tipo II suelen tener un inicio de las convulsiones a edades más tempranas, con una duración más corta de la epilepsia y mayor frecuencia de crisis comparados con los casos de DCF tipo I.

La **DCF tipo III** presenta pérdida de la laminación, hipoplasia sin 6 capas corticales, y/o neuronas hipertróficas asociadas con una lesión principal adyacente o afectando el mismo lóbulo o región de la corteza. La **DCF tipo IIIa** está asociada a HS, existiendo 5 variantes de acuerdo a la alteración de la laminación observada. La **DCF tipo IIIb** se asocia a tumores relacionados con epilepsia de larga data (LEAT). La **DCF tipo IIIc** presenta asociación con malformaciones vasculares (cavernomas, malformaciones arteriovenosas, malformaciones vasculares leptomeníngeas, telangiectasias, meningoangiomatosis). La **DCF tipo IIId** se asocia a injuria cerebral traumática, cicatriz glial posterior a isquemia o sangrado peri o prenatal, enfermedades infecciosas o inflamatorias como encefalitis de Rasmussen, encefalitis límbica o infecciones bacterianas o virales. La **DCF tipo III, sin otra especificación** cuando hay una sospecha clínica de una lesión principal que no se evidencia microscópicamente.

Cabe aclarar que los raros casos de DCF tipo II asociados a una lesión principal como cavernomas o tumores no debe clasificarse como DCF tipo III sino como **Doble Patología**. La **Doble Patología** se refiere a dos lesiones con patogénesis independientes que afectan uno o múltiples lóbulos cerebrales. Por otro lado, la **Patología Dual**, por definición incluye los casos de HS asociada a otra lesión principal en el lóbulo temporal distinta a DCF tipo III, como puede ser la DCF tipo II, tumores, malformaciones vasculares y cicatrices gliales.

En la clasificación de Malformaciones del desarrollo cortical, las DCF tipo II corresponden al grupo IC, relacionado a alteraciones en la proliferación celular. Las DCF tipo I y III resultan de injuria de la corteza durante los estadios tardíos del desarrollo cortical, ocasionando que el proceso de organización comience antes de la terminación de la migración neuronal y corresponden al grupo IIIC de la clasificación antedicha (9).

3.2- Esclerosis del hipocampo (HS): se define histopatológicamente como un patrón selectivo de pérdida neuronal asociado a astrogliosis a nivel del hipocampo e incluye la afectación del giro dentado (10) (para detalle de la **Citoarquitectura normal del hipocampo** ver ítem B del Apéndice 1). La etiología es

controversial, probablemente multifactorial y se la considera adquirida. La principal hipótesis esbozada plantea que una injuria o insulto inicial que afecta el hipocampo inmaduro, en presencia de factores genéticos predisponentes, produce HS. Se considera en consecuencia, una lesión reactiva/degenerativa más que una malformación (10, 11, 12)

Según la clasificación de la ILAE existen tres subtipos de **HS** (Ver Figura 3): **HS tipo 1:** es la variante más común representa el 60-80% de las HS. Se ve afectado principalmente el sector CA1 pero afecta en forma significativa también al resto de los sectores e incluso al giro dentado, el cual puede presentar una pérdida del 50-60% de las células granulares, así como dispersión de células granulares (DCG) (ampliación de la capa de células granulares en más de diez capas (12), pérdida de los bordes netos con respecto a la capa molecular y células granulares ectópicas separadas de la capa principal por neuropilo) (10). La **HS tipo 2** es una variante poco usual, siendo el 5-10% de los casos quirúrgicos de epilepsia del lóbulo temporal (ELT). Se observa pérdida predominante de neuronas piramidales en CA1 con astrogliosis y el resto de las capas CA muestra leve pérdida neuronal. Usualmente la capa de células granulares no se ve afectada. La **HS tipo 3** muestra pérdida neuronal predominante en CA4 y giro dentado. El resto de las capas CA se ve moderadamente afectada. Se observa en 4-7,4% de los casos quirúrgicos de ELT. Por último, existe en la clasificación de ILAE una variante **no-HS, sólo gliosis** en la cual pese a haber evidencia electrofisiológica de generación de convulsiones en el lóbulo mesial temporal, no se detectan alteraciones histopatológicas de pérdida neuronal en el asta de Ammon, observándose sólo gliosis reactiva. Estos casos representan un 20% de las ELT (10).

4. Epilepsia: Tratamiento quirúrgico

Se sugiere potencial tratamiento quirúrgico cuando las crisis epilépticas permanecen refractarias luego de dos años de tratamiento médico, el cual debe haber estado constituido por al menos 3 o 4 drogas a dosis efectivas y concentraciones séricas óptimas (1). Las tres entidades clínico-patológicas más frecuentemente observadas en los especímenes quirúrgicos por epilepsia farmacorresistente son la esclerosis del hipocampo (40%), los tumores asociados a epilepsia de larga data (LEAT) (27%) y las malformaciones del desarrollo cortical (13%) (13). Dentro de éstas últimas se encuentran las DCF.

Para considerar intervalos confiables de cero eventos se considera un buen indicador de una **respuesta positiva al tratamiento** a un intervalo tres veces mayor al intervalo más largo previamente observado entre convulsiones (determinado por convulsiones ocurridas dentro de 12 meses) o a un intervalo de 12 meses, cualquiera sea el intervalo más largo. Por otro lado, se considera **falla del tratamiento**, farmacológico o quirúrgico, cuando hay recurrencia de las convulsiones después que la intervención ha sido adecuadamente aplicada. Si el paciente estuvo libre de convulsiones por un período mayor a tres veces el período inter-crisis previo a la intervención, pero este intervalo es menor a 12 meses, entonces el **control de crisis** debe ser categorizado como “**indeterminado**” (6).

5. Células precursoras de oligodendrocitos (OPCs)

5.1- Características, funciones y marcadores: Las OPCs fueron identificadas por Ffrench-Constant, C. y Raff, M. C. en 1986 (14, 15, 16) y si bien es controvertido si tienen capacidad de células multipotente (16), ha sido bien demostrado que en el cerebro maduro generan oligodendrocitos mielinizantes y contribuyen a la mielinización y remodelación de la mielina (16, 17, 18).

No se han identificado grandes variaciones de la densidad de estas células entre distintos sectores de la SG, describiéndose una relación OPCs/oligodendrocitos de 1:1 en cerebro y de 1:4 en médula espinal (15). Por otro lado, se ha detectado una mayor densidad de OPCs en SB que en SG cerebral consecuencia de una mayor tasa de proliferación de las OPCs en esta última localización. Así mismo, no se ha identificado variación perceptible de la densidad de estas células durante la edad adulta (17).

Las OPCs expresan característicamente los siguientes marcadores: **NG2**, proteoglicano condroitin sulfato de membrana que es también detectado en microglia activada de tipo ameboide y en pericitos (19). Estos tipos celulares pueden ser diferenciados por presentar las OPCs otros marcadores como **PDGF α R** (platelet derived growth factor receptor α) y **Olig2** (factor de transcripción de oligodendrocitos). Este último marcador es expresado en todo el linaje oligodendroglial desde las OPCs hasta los oligodendrocitos maduros (18), observándose por inmunohistoquímica una marcación más intensa de este anticuerpo en las OPCs y más débil en los oligodendrocitos maduros (18, 20, 21, 22). Las OPCs son también positivas con el anticuerpo A2B5 que detecta gangliósidos específicos (19, 23). **PDGF α R** (platelet-derived growth factor receptor α) es un receptor tirosina quinasa dependiente, que se une a las tres isoformas de PDGF (19) y controla la proliferación y supervivencia de las células precursoras de oligodendrocitos (24) requiriendo la interacción con NG2 para una respuesta efectiva al estímulo mitogénico de PDGF (25). Además de ser expresado por las OPCs ha sido publicado un trabajo donde describe expresión de PDGF α R en algunas neuronas del sistema nervioso central adulto (26). A su vez, NG2 interviene en la migración celular y reorganización de la actina del citoesqueleto en las OPCs (27). Por su parte, Olig2 interviene en forma temprana en la diferenciación del linaje oligodendroglial y se mantiene su expresión en los oligodendrocitos maduros a diferencia de PDGF α R y NG2 (28).

Las OPCs son un grupo heterogéneo de células, habiéndose reportado que en el cerebro adulto, la mitad de dichas células se encuentran en ciclo en estado fisiológico, mientras que el resto permanece en estado quiescente o con baja tasa de proliferación. En consecuencia se especula que existirían OPCs con distintas funciones más allá de su capacidad descripta para generar oligodendrocitos mielinizantes (18, 29). En relación a esto, las **OPCs adultas en SB** difieren de las **OPCs en SG** en su capacidad para diferenciarse en oligodendrocitos maduros y por ser células proliferativas que intervienen en la oligodendrogénesis adulta (17). Dentro de la SB se han evidenciado distintos subtipos de OPCs adultas; aquellas sin canales de sodio y otras con canales de sodio voltaje dependiente, que generan potenciales de acción, siendo capaces de detectar la actividad neuronal y que muestran mayor sensibilidad ante la isquemia (30). Así mismo, las **OPCs adultas de SG** son quiescentes o con baja tasa de proliferación y la mayoría permanece en estado inmaduro (17). Por otro lado, se ha descrito diversidad de OPCs hermanas generada inmediatamente posterior al proceso de mitosis, debido a inhibición de marcadores de progenie (NG2) e inducción de moléculas asociadas con progresión de linaje. A su vez, se han reportado diferencias entre las **OPCs del desarrollo y las adultas**, ya que éstas últimas presentan menor capacidad de migrar y progresión más lenta del ciclo celular, presentando en común su apariencia morfológica y los marcadores que expresan (16, 17, 31-33). En general las OPCs en SG se encuentran en adyacencia a las neuronas y presentan finos procesos ramificados, mientras que en SB se ubican entre axones mielinizados y muestran citoplasmas elongados (23).

5.2- Relación con patología de la epilepsia: Se ha reportado que 2-26% de las cirugías por epilepsia de larga data son histológicamente clasificadas como no lesionales en base a los conocimientos actuales (34). En muchos de estos casos sólo se ha observado un aspecto incrementado de células oligo-like, principalmente a

nivel de SB y capas profundas de SG, con diferentes patrones y en algunas publicaciones se ha planteado que podrían corresponder a una microdisgenesia (malformación leve del desarrollo cortical) (35-36). En algunos casos esta hiperplasia se ha visto asociada a “oligodendroglia satélite” (células oligo-like presentes al lado de cada neurona) e incluso mostraron un aspecto de satelitosis perineuronal (patrón de crecimiento de los gliomas difusos descrito por Scherer (37-38) denominado “estructura secundaria”, interpretado como constituido por células gliales tumorales de disposición perineuronal). Cabe aclarar que en muchos trabajos al incremento de la oligodendroglia satélite se lo refiere como satelitosis perineuronal pese a no estar compuesta por células tumorales (Ver Figura 4C). Este incremento en células oligo-like también ha sido descrito como acompañante en la adyacencia de HS, DCF y malformaciones vasculares, pudiendo simular incluso un oligodendroglioma de bajo grado o angiogliomas, en el último caso. En estos casos, se ha especulado que este aspecto incrementado de células oligo-like podría ser consecuencia de atrofia del parénquima cerebral o un aspecto morfológico generado por colapso del mismo (39-41).

Faber- Zuschratter et al. han descrito la presencia de satelitosis perineuronal a nivel de la amígdala lateral, en casos de esclerosis mesial temporal en número estadísticamente significativo en comparación con patología de la epilepsia del lóbulo temporal distintas a la HS y con respecto a controles de autopsias. Este incremento se correlacionaba con la duración de la epilepsia pero no con la frecuencia de las crisis (42). En ese mismo trabajo identificaron, por inmunohistoquímica la positividad con NG2 de un porcentaje de estas células en posición perineuronal interpretando a las mismas como OPCs. Así mismo, Geha et al. identificaron a las células NG2+/Olig2+ (OPCs) como la principal población en ciclo en el parénquima cerebral del adulto, a menudo con disposición de satelitosis perineuronal, cuyo número se detectó incrementado en el SNC de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal refractaria al tratamiento farmacológico (43).

Mühlebner et al. describieron ausencia de mielinización en 17 DCF tipo II con disminución de células Olig2+ en los sectores de SB que presentaban aumento de células balonizadas (44). Posteriormente, Sheperd et al. estudiaron DCF tipo II, observando reducción de axones mielinizados en la SB del área displásica con menor densidad (no estadísticamente significativa) de células OPCs en dicho sector comparado con la SB adyacente preservada. Sin embargo no detectaron ausencia de mielinización como fue descrito por Mühlebner et al. (45). En consecuencia, interpretaron que no existiría una falla primaria de reclutamiento y diferenciación de las OPCs en las DCF tipo II.

En un modelo animal de HS se observó alteración de la mielina a nivel de hipocampo, detectándose un incremento de células NG2+ en fase aguda de la epileptogénesis, disminuyendo en la fase crónica. Se interpretaron dichas células como OPCs activadas o reactivas, observando que dicha activación era un proceso transitorio (46). Cabe aclarar que la activación de las OPCs implicaría el paso del estado quiescente al proliferativo y la migración a la zona de la lesión (18). Por otro lado, se ha descrito que la activación de estas células no ocurre sólo ante lesiones desmielinizantes primarias sino además ante la desmielinización secundaria a traumas u otras injurias como ha sido por ejemplo descrito consecuencia de los depósitos de placas de amiloide en la enfermedad de Alzheimer (18).

En el transcurso del desarrollo del presente proyecto, a principio de este año, se publicó una serie de 52 casos de pacientes con epilepsia del lóbulo frontal y RMN compatible con una DCF pero histológicamente no clasificables. Veintidós de los casos mostraron incremento estadísticamente significativo de células oligo-like Olig2+ y PDGFRA+ (Inmunohistoquímicas realizadas por separado) en SB y capas corticales profundas (Ver

Figuras 4A y 4B), sin hipomielinización ni desmielinización. En dicho trabajo, sugieren clasificar estas lesiones como una “Malformación del desarrollo cortical leve con hiperplasia oligodendroglial” (MOGHE) aunque plantean que son conscientes de lo controvertido que es sugerir una hiperplasia glial en SB como una displasia cortical y que el mecanismo patológico subyacente de este tipo de lesiones está aún por ser determinado (34).

En base a los diferentes trabajos mencionados, el objetivo principal del presente proyecto es evaluar la población de células progenitoras oligodendrogliales a nivel de SG de neocorteza de especímenes cerebrales quirúrgicos con diagnóstico de displasia cortical focal, esclerosis del hipocampo y patología dual con el fin de ampliar el conocimiento de estas patologías, intentando definir si dichas células intervienen en la regeneración del parénquima por el posible daño producido ante el padecimiento de crisis convulsivas o son componente de la alteración de la maduración cortical observada en este tipo de lesiones.

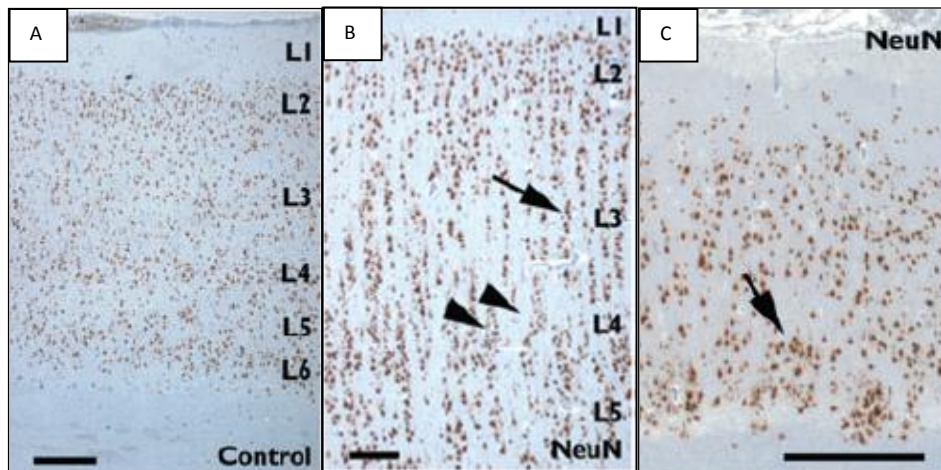


Figura 1. A- Control normal; B- DCF tipo Ia, alteración de la laminación donde la flecha muestra disposición en “microcolumnas” y las cabezas de flecha la pérdida de una capa 4 neta; **C- DCF tipo Ib**, no se detectan las capas de la corteza. Técnica de IHQ con NeuN. (Figuras tomadas de *Epilepsia*, 52(1):158–174, 2011)

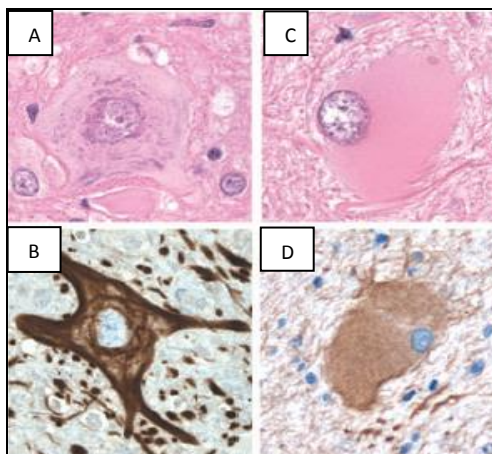


Figura 2. A y B- Neuronas dismórficas, HE e IQH con Neurofilamento respectivamente. **C y D-** Células balonzadas, HE e IQH con Vimentina, respectivamente. (Figuras tomadas de *Epilepsia*, 52(1):158–174, 2011)

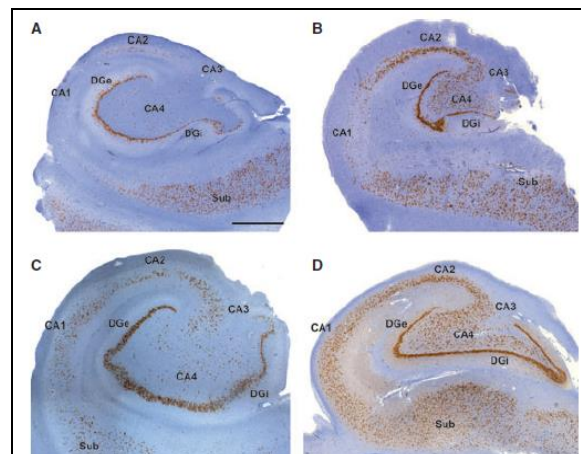


Figura 3. Subtipos histológicos de HS. **A-** HS tipo 1; **B-** HS tipo 2; **C-** HS tipo 3; **D-** No-HS, sólo gliosis. Técnica de IHQ con NeuN. CA1-4: sectores del Asta de Ammon, DG: Giro dentado, Sub: Subiculum. (Figuras tomadas de *Epilepsia*, 54(7):1315–1329, 2013)

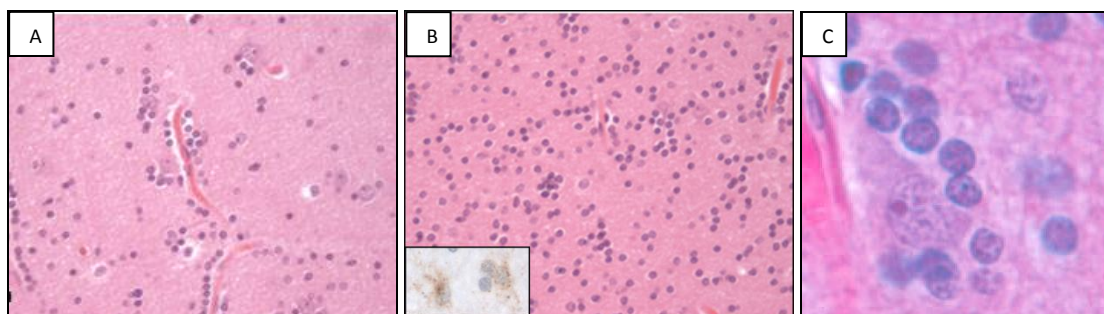


Figura 4. A y B- Incremento de células oligo-like en sustancia blanca y en sustancia gris profunda, respectivamente, en lesión descrita como MOGHE (Ver texto). Recuadro en Figura B: IHQ con PDGF α R; **C-** Microdysgenesis con satelitosis glial perineuronal. Técnica de HE. (Figuras tomadas de *Brain Pathol* 2016 Jan 7. doi: 10.1111 y *Pathology International* 2003; 53: 345–352)

OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivo general: evaluar cuanti y cualitativamente la población de células progenitoras de tipo OPCs (Oligodendroglial precursor cells) a nivel de sustancia gris de especímenes cerebrales quirúrgicos en entidades no tumorales asociadas a epilepsia farmacorresistente (displasia cortical focal, esclerosis del hipocampo y patología dual), por medio de técnicas moleculares e inmunohistoquímicas.

Objetivo específico I: valorar molecularmente la población de células precursoras oligodendrogliales en sustancia gris de especímenes cerebrales quirúrgicos de pacientes con lesiones no tumorales asociadas a epilepsia farmacorresistente (displasia cortical focal, esclerosis del hipocampo y patología dual), utilizando la técnica de PCR en tiempo real para detectar la expresión del ARNm de los genes marcadores putativos de OPCs: NG2 y PDGF α R.

Objetivo específico II: evaluar cuali y cuantitativamente por medio de doble inmunohistoquímica la presencia y distribución de células precursoras oligodendrogliales en sustancia gris de especímenes cerebrales quirúrgicos de pacientes con lesiones no tumorales asociadas a epilepsia farmacorresistente (displasia cortical focal, esclerosis del hipocampo y patología dual), utilizando los anticuerpos primarios PDGF α R y Olig2.

Objetivo específico III: valorar la población de células precursoras oligodendrogliales en relación a la edad al inicio de las crisis convulsivas, el tiempo de evolución de las mismas y a la edad del paciente al momento de la cirugía, en especímenes cerebrales quirúrgicos de pacientes con lesiones no tumorales asociadas a epilepsia farmacorresistente (displasia cortical focal, esclerosis del hipocampo y patología dual).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se revisaron los preparados histológicos de biopsias incluidas en parafina pertenecientes a pacientes con epilepsia farmacorresistente diagnosticados en el Departamento de Neuropatología de FLENI en los últimos 5 años con patología no tumoral, en particular, con diagnóstico de displasia cortical focal (DCF), esclerosis del hipocampo (HS) y Patología dual (PD). Los casos fueron reclasificados según las nuevas clasificaciones publicadas por la ILAE (ver ítem 3.1 y 3.2 de la Introducción). Se incluyeron sólo los casos que contaban con material congelado para realizar las técnicas de biología molecular. Aquellos casos que al realizar la extracción del ARN no contaban con una concentración de ARN suficiente para efectuar la reacción de transcripción reversa fueron excluidos del estudio. En la revisión de los preparados no se detectaron casos que presentaran como única lesión histopatológica incremento de células oligo-like. Cabe aclarar que no pudo contarse con muestras de sustancia gris cortical sin patología neurológica de pacientes con el mismo rango etario que el grupo en estudio para tener un control con el cual contrastar los resultados.

En consecuencia, finalmente se evaluaron en el presente proyecto 16 pacientes con los siguientes diagnósticos patológicos: 8 displasias corticales focales (2 casos subtipo IA, 1 caso subtipo IIA, 3 casos subtipo IIB, 2 casos subtipo IIIA), 5 casos de esclerosis del hipocampo (todas ellos subtipo 1) y 3 casos de patología dual. La edad media de los pacientes fue de 33 años \pm 15. Diez pacientes correspondían al sexo femenino y seis al sexo masculino. Ver tabla 1 con información detallada de los pacientes incluidos en el trabajo y el Apéndice 2 acerca la información ética de investigación del proyecto.

1. Estudios moleculares

1.1- Extracción del ARN

Se realizó la extracción de ARN utilizando el reactivo TRIzol según protocolo provisto por el fabricante. Se agregó 1 ml de trizol a un fragmento congelado de tejido de aproximadamente 50-100 mg. Se *homogeneizó* con homogeneizador de tejidos. Posteriormente, se realizó la *Fase de separación*: la muestra homogenizada se incubó 5 minutos a temperatura ambiente para que se complete la disociación de las nucleoproteínas. Luego se agregó 0,2 ml de cloroformo. Se agitó vigorosamente 15 segundos. Se incubó 2-3 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. La mezcla quedó separada en una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una intermedia y una fase superior acuosa donde se encontraba el ARN. Se removió la fase acuosa. En el proceso de *aislamiento del ARN*, se realizó primero la *precipitación del ARN*, agregando, a la fase acuosa extraída previamente, 0,5 ml de isopropanol 100%. Se incubó a temperatura ambiente 10 minutos. Luego se centrifugó a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente se realizó el *lavado del ARN*, removiendo el sobrenadante del tubo y luego agregando 1 ml de etanol 75%. Se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos. Se desechó el pellet y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego se re-suspendió el ARN en agua libre de ARNasas y se incubó en estufa 10 minutos. Se conservaron las muestras a -70°C.

1.2- Cuantificación del ARN

Se efectuó una dilución 1/10 con agua libre de nucleasas y por medio de un espectrofotómetro Nanodrop se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm y se registró la concentración de ARN presente en cada muestra,

teniendo en cuenta la pureza del ARN (ARN de pureza óptima A260/280= 2-2.2; ARN de pureza aceptable >1.7; ARN con presencia de compuestos aromáticos (disuelto parcialmente) <1.6).

1.3- Técnica de transcripción reversa

Con el ARN resultante se realizó la técnica de transcriptasa reversa para la obtención de cDNA, utilizando 1 µl de enzima transcriptasa reversa, 1 µl de random primers (hexómeros), 2 µl de buffer MML URT 5x, 4 µl de dNTP (desoxirribonucleótidos-trifosfato) 5mM y 1 µg de ARN derivado de la muestra en estudio. Se utilizó un termociclador programado a 37°C durante 1 hora. Terminado el proceso se agregó a cada muestra 40 µl de agua libre de ARNasas y se almacenaron a -70°C.

1.4- Técnica de Reacción de Cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

El cDNA resultante se utilizó como templado para la amplificación por medio de PCR en tiempo real, usando por muestra 10 µl de Master mix 2x SYBR Green como fluoróforo, 1 µl primer forward específico por gen y 1 µl de primer reverse específico por gen, 7 µl de agua libre de ARNasas, 1 µl de cDNA de la muestra en estudio. Se amplificaron los siguientes genes PDGFαR, NG2 y SDHA.

PDGFαR

Primer forward: 5' TTCCCTTGGTGGCACCC 3'

Primer reverse: 5'GGTACCCACTCTTGATCTTATTGTAGAA 3'

Temperatura de melting o fusión (Tm): 76,5°C

NG2

Primer forward: 5' GAG AGG CAG CTG AGA TCA GAA 3'

Primer reverse: 5' TGA GAA TAC GAT GTC TGC AGG T 3'

Temperatura de melting o fusión (Tm): 83°C

SDHA (Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A, Flavoprotein)

Primer forward: 5' TGG GGA CAA GAG GGC ATC TG 3'

Primer reverse: 5' CCA CCA CTG CAT CAA ATT CAT G 3'

Temperatura de melting o fusión (Tm): 75°C

Cada muestra se amplificó por duplicado por gen en estudio. Así mismo, en las muestras blancos para cada gen, el cDNA fue reemplazo por agua libre de nucleasas y también fueron realizados por duplicado. Se repitió tres veces el mismo ensayo de PCR para cada gen con la inclusión total de los casos.

Se normalizó el nivel de expresión respecto a un gen control, gen SDHA. Luego de la realización de varias pruebas con los genes de referencias GUSB, TBP, GAPDH, HPRT y SDHA; se observó que el gen SDHA era el que presentaba más similitud entre los duplicados y mostraba amplificaciones más homogéneas entre las distintas muestras.

Condiciones de trabajo de la PCR en tiempo real:

<u>Stage 1</u>	<u>Stage 2</u>		<u>Stage 3</u>		
x1	x40				
95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C
10:00	0:15	1:00	0:15	1:00	0:15

1.5- Método de análisis de PCR en tiempo real

En el análisis de cada PCR en tiempo real se evaluó en primera instancia que la curva de amplificación observada correspondiera a la amplificación del gen específico estudiado, corroborando que la Temperatura de melting o fusión (T_m) correspondiera a la del gen en estudio y presentara una única curva (determinado en stage 3). En ítem anterior se especifica el T_m de cada gen. Luego se situó el umbral manualmente para que el mismo cruzara la curva de amplificación aproximadamente a la mitad de la pendiente, utilizando el mismo umbral para cada gen en las distintas PCR. Se considera que un C_t (threshold cycle, ciclo umbral: indica el número de ciclos fraccional en el cual la cantidad de target alcanza un umbral fijado) (47) menor a 29 determina la presencia de abundante ácido nucleico del gen amplificado en la muestra estudiada. Un C_t entre 30-37 indica moderada cantidad mientras que un C_t de 38-40 revela mínimas cantidades del gen en estudio.

Se registraron por cada muestra los valores promedios de C_t de cada uno de los genes estudiados. Se tomaron en cuenta los casos que mostraran duplicados similares.

Para normalizar los resultados de las muestras, a la media de los C_t de los duplicados de cada muestra por gen en estudio (C_t de NG2 y C_t de PDGF α R) se le restó la media de los C_t de SDHA de los duplicados realizados en la misma PCR, obteniendo el ΔC_t .

- $\Delta C_t \text{ NG2} = C_t \text{ NG2} - C_t \text{ SDHA}$
- $\Delta C_t \text{ PDGF}\alpha\text{R} = C_t \text{ PDGF}\alpha\text{R} - C_t \text{ SDHA}$

Luego por cada PCR se utilizó el método comparativo **Método 2 $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)** (47) que permite calcular cambios relativos de la expresión de un gen blanco. Esta fórmula determina el número de veces en las que se ve incrementada o disminuida la expresión de un gen blanco entre la muestra en estudio y una muestra o grupo que se toma como referencia (calibrador). En este trabajo utilizamos para tal fin la muestra con ΔC_t más elevado de PDGF α R en las tres PCR. Utilización de la fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(\Delta C_t \text{ caso en estudio}) - (\Delta C_t \text{ caso con mayor valor})}$

Para comparar los grupos en estudio con test estadísticos se utilizó la mediana de los tres ensayos de PCR en tiempo real de cada caso.

2. Técnica de doble tinción de inmunohistoquímica

Las piezas quirúrgicas cerebrales fueron fijadas en formol tamponado al 10% durante 24 horas. Las muestras fijadas en formol se procesaron en parafina y luego se realizaron cortes de 8-10 μm , los cuales se colorearon con hematoxilina y eosina (H&E) para realizar el diagnóstico patológico.

Al realizar la revisión de los casos se seleccionaron las zonas de sustancia gris (SG) de neocorteza donde se constató visualmente un aspecto incrementado de células oligo-like con satelitos perineuronal más prominente para realizar la doble inmunomarcación con los anticuerpos primarios Olig2 (1/300 Millipore, policlonal de conejo) y PDGF α R (1/50, de conejo, gentilmente suministrado por Prof. Dr. Bill Stallcup). La doble tinción de inmunohistoquímica (IHQ) fue efectuada con el Sistema automatizado de BOND. Se utilizó como sistema de detección para el anticuerpo Olig2 el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa y se reveló con DAB. Para el anticuerpo PDGF α R se utilizó "Bond Polymer Refine Red Detection" de Leica, el cual utiliza un sistema de conjugado de anticuerpo y fosfatasa alcalina polimérica (AP) de enlace, libre de biotina. Cabe aclarar que en los casos de Esclerosis del hipocampo y Patología dual sólo se analizó la neocorteza adyacente y no el Hipocampo para poder realizar una comparación de las OPCs con las DCF.

Se realizó el conteo de las células con doble positividad, PDGF α R+/Olig2+, en un aumento de 40x en

20 campos distintos dentro de la zona de SG, discriminando si presentaban posición o no de satelitosis perineuronal. Se expresaron los resultados por campo de 40x con un diámetro de campo de 0.65, que corresponde a un área aproximada de 0.312 mm² (48). Para comparar los grupos en estudio con test estadísticos se utilizó para cada grupo la mediana de células positivas por campo de 40x.

3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se calcularon las medianas y rangos intercuartiles (25% y 75%) del nivel de expresión relativa del ARNm de los genes blancos por grupo en estudio, así como del número de células doble positivas por IHQ, en base a las variables analizadas: patología, edad al inicio de crisis convulsivas, edad al momento de la cirugía y tiempo de evolución de las crisis. En los casos que al agrupar los resultados no se constató homogeneidad de las varianzas por medio del test de Levene, se calculó el logaritmo natural (LN) de cada caso y se reevaluó la homogeneidad de las varianzas, expresando en esos casos los resultados como medianas y rangos intercuartiles del LN. Se utilizó el Test de Kruskal Wallis para determinar si la distribución de los valores de expresión relativa del ARNm o del número de células positivas por IHQ difería entre los grupos, usando como prueba pos hoc el test de comparación múltiple de Dunn. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para el análisis de correlación entre variables. Las diferencias fueron consideradas significativas con $p < 0,05$.

N° paciente	Diagnóstico patológico	Edad cirugía (años)	Edad inicio síntomas (años)	Tiempo evolución (años)	Sexo	Lóbulo afectado	Tipo de crisis	Escala de Engel
1	DCF Ia	21	9	12	F	T	TCG	IV
2	DCF Ia	15	7	8	F	T	Parciales	I
3	DCF IIa	40	22	18	M	T	Parciales tónicas	I
4	DCF IIb	11	6	5	F	PT	Sin datos	I
5	DCF IIb	1	0,08	0,92	M	T	Parciales	Sin datos
6	DCF IIb	13	0,58	12,42	F	F	Parciales MC	I
7	DCF IIIa	36	1,5	34,5	M	T	TCG	I
8	DCF IIIa	6	0,75	5,25	F	T	TCG	Sin datos
9	HS I	38	4	34	M	T	TCG	IV
10	HS I	31	4	27	F	T	TG	I
11	HS I	43	6	37	F	T	TCG	I
12	HS I	22	0,58	21,42	M	T	TCG	I
13	HS I	68	30	38	F	T	Parciales CG	I
14	PD	35	30	5	F	T	TCG	I
15	PD	39	27	12	F	T	TCG	I
16	PD	27	12	15	M	T	Parciales	I

Tabla 1. Pacientes incluidos en el estudio. (TCG: Tónico-clónicas generalizadas, TG: tónicas generalizadas, MC: mioclónicas, T: temporal, PT: parieto-temporal, F: frontal. Escala de Engel del resultado de cirugía de la epilepsia: I: libre de crisis incapacitantes, II: rara vez crisis incapacitantes, III: mejoría significativa, IV: sin mejorías significativas (Arch Neurocién Méx 2004; 9(1):18-24))

RESULTADOS

Se realizaron los siguientes análisis a partir de los resultados de expresión del ARNm de los genes NG2 y PDGF α R y de las técnicas de doble tinción de inmunohistoquímica realizadas con los anticuerpos Olig2 y PDGF α R.

1. Comparación entre Patologías no tumorales asociadas a epilepsia farmacorresistente

Se compararon los resultados entre el grupo de pacientes con Displasia cortical focal (DCF) (n=8), aquellos con Esclerosis del hipocampo (HS) (n=5) y los que presentaban Patología dual (PD) (n=3) para evaluar si existían diferencias en la población de OPCs entre las distintas patologías no tumorales asociadas a epilepsia farmacorresistente, las cuales presentan distintas etiologías.

1.1-Expresión de ARNm de genes marcadores de OPCs: PDGF α R y NG2

Se compararon los resultados de expresión relativa del ARNm de los genes PDGF α R y NG2 entre los tres grupos de patologías, se tomó como grupo de referencia el grupo de PD, que era el de menor expresión de PDGF α R.

Con respecto al gen PDGF α R se observaron niveles de expresión relativa similares entre los tres grupos de patologías con las siguientes medianas y rangos intercuartiles: 2,14 (0,92-13,26) en el grupo de DCF, 1,02 (0,47-1,64) en el de HS y 1(0,61-5,65) en el grupo de PD. No se detectaron diferencias en las medianas de expresión relativa entre los grupos, $p=0,257$, Test de Kruskal Wallis. El grupo de HS fue el que presentó casos con niveles de expresión más homogéneos entre sí. Por el contrario, en el grupo de DCF se evidenciaron niveles de expresión más variables, que podría deberse a haber agrupado en conjunto a los distintos subtipos de DCF. Ver Gráfico 1.1a.

En lo que concierne a la expresión del ARNm del gen NG2 se observaron las siguientes medianas y rangos intercuartiles: 1,22 (0,3-3,368) para DCF, 2,24 (0,7-5,37) en los casos de HS y 1 (0,79-3,58) en la PD, no presentando la distribución de los valores diferencias estadísticamente significativas, $p=0,852$, Test de Kruskal Wallis. Nuevamente el grupo de DCF fue el que mostró más variabilidad de expresión entre los casos, mientras que a diferencia del comportamiento con el gen PDGF α R, el grupo de HS mostró mayor dispersión en la expresión. Sin embargo, la variabilidad de expresión relativa entre los grupos con este gen era menor que aquella observada con el gen PDGF α R. Ver gráfico 1.1b

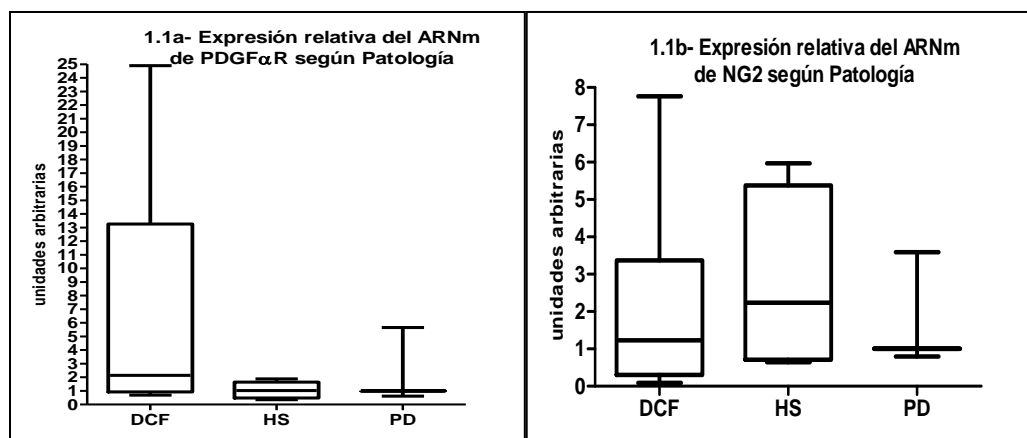


Gráfico 1.1a y 1.1b. Niveles de expresión relativa de ARNm del gen PDGF α R y NG2, respectivamente. Se expresan los valores como medianas y rangos intercuantiles de unidades arbitrarias tomando como referencia al grupo de PD.

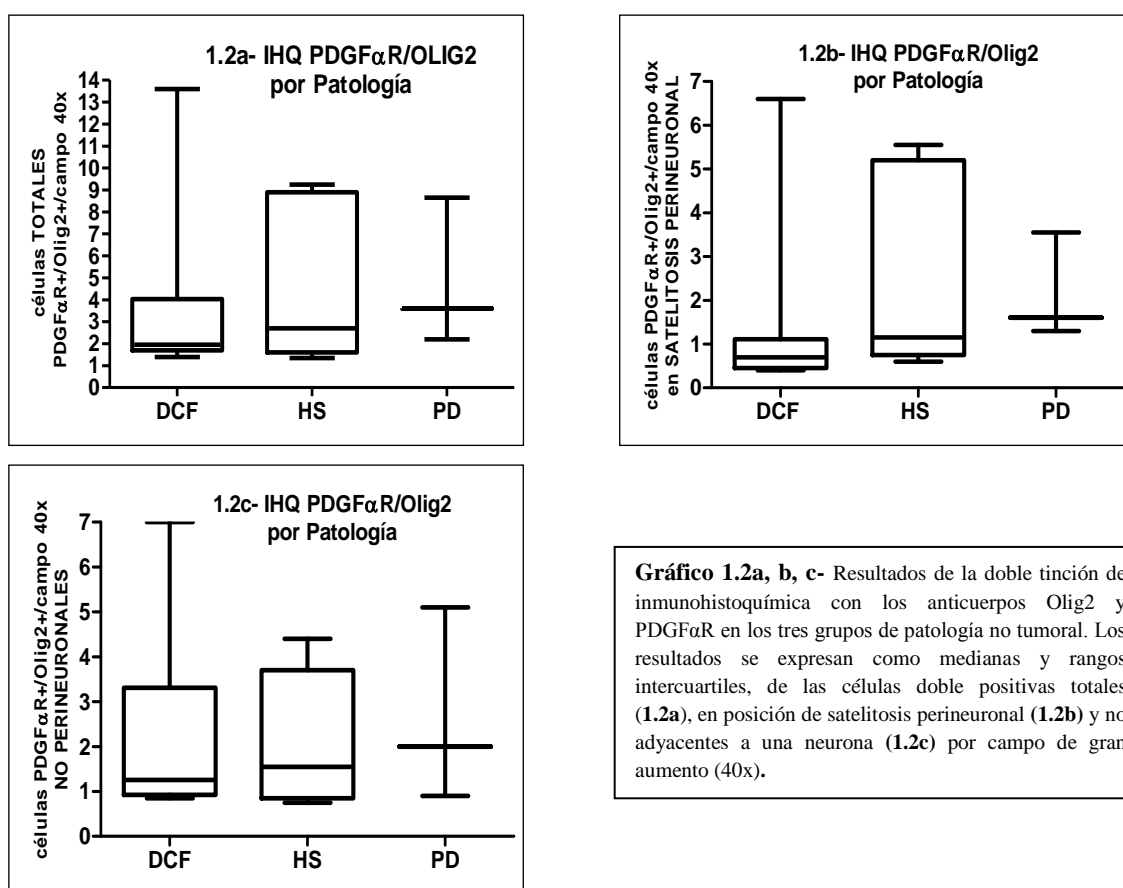
1.2- Tinción doble de inmunohistoquímica con anticuerpos marcadores de OPCs: PDGF α R y Olig2

Con técnica doble de inmunohistoquímica (IHQ) con los anticuerpos Olig2 y PDGF α R se observó variable presencia de células simultáneamente positivas con ambos anticuerpos entre los distintos campos de SG analizados, en los tres grupos de patologías. El patrón de inmunotinción era similar en los tres grupos patológicos analizados, mostrando una marcación nuclear con Olig2 de variable intensidad y una marcación citoplasmática, en algunos casos granular o en “dots”, con el anticuerpo PDGF α R. Ver Figura 5.

La mediana y rangos intercuantiles de células positivas por campo de 40x en el grupo de DCF fue de 1,95 (1,69-4,02), en el grupo de HS fue de 2,7 (1,6-8,9) y en el grupo de PD fue de 3,6 (2,2-8,6), no evidenciándose diferencias estadísticamente significativas en la distribución del número de OPCs entre los tres grupos ($p=0,624$, Test de Kruskal Wallis). Ver Gráfico 1.2a. Tampoco se observaron diferencias significativas si se agrupaban en conjunto las DCF y PD versus el grupo de HS, ya que las DCF y la PD comparten el mismo tipo de lesión a nivel de neocorteza, sector evaluado con las técnicas de IHQ (resultados no graficados).

Por otro lado, al analizar por separado las OPCs en posición de satelitis perineuronal y aquellas no adyacentes a las neuronas no se detectaron diferencias estadísticamente significativas del número de células entre las tres patologías ($p=0,141$ y $p=0,90$, respectivamente, Test de Kruskal Wallis), siendo las medianas de las células en satelitis perineuronal para DCF de 0,7 (0,45-1,1), en el grupo de HS de 1,15 (0,75-5,2) y en el grupo de PD de 1,6 (1,3-3,5) y en aquellas no adyacentes a las neuronas de 1,25 (0,92-3,31) para DCF, de 1,5 (0,85-3,7) para HS y de 2 (0,9-5,1) para PD. Ver Gráficos 1.2b y 1.2c.

Por último, se compararon las patologías dividiendo el grupo de DCF en las de tipo II según la ILAE por un lado y las de tipo I y III juntas por otro, basándonos en la clasificación de malformaciones del desarrollo cortical. Al realizar el análisis dividiendo los casos en estos cuatro grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas ni por inmunohistoquímica ni tampoco en la expresión de los genes por RT-PCR (resultados no graficados).



2. Comparación entre pacientes con distintos tiempos de evolución

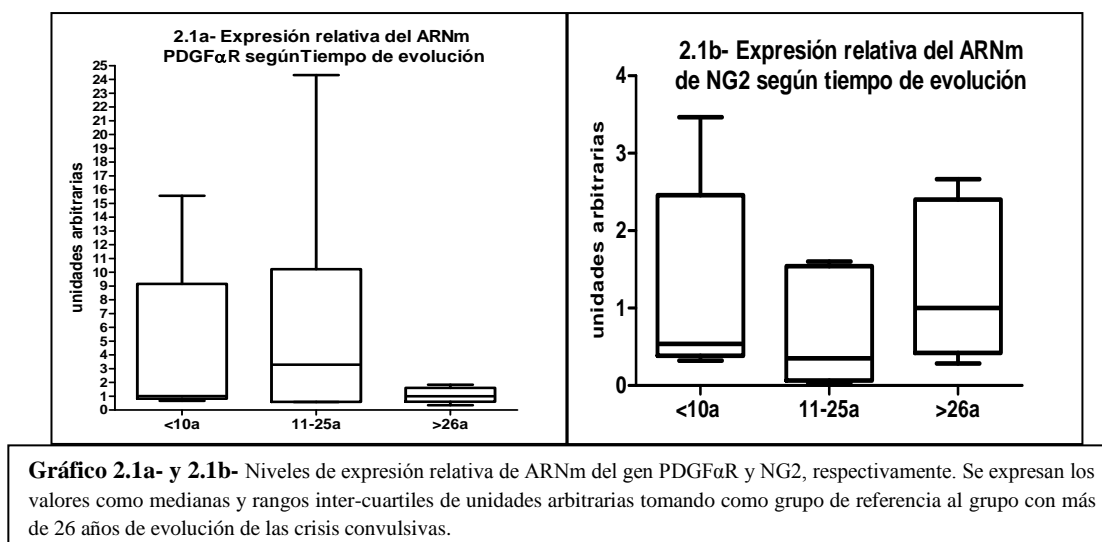
Debido a que no se observaron diferencias cuantitativamente significativas en las medianas de expresión de los ARNm ni en el número de células por IHQ en base a la patología, se evaluaron los resultados agrupando a los pacientes según el tiempo de evolución de las crisis, independientemente de la patología que presentarán, con el objeto de determinar si existían variaciones en la población de OPCs en relación al período de padecimiento de las crisis convulsivas. De esta forma se evaluó la posibilidad de un intento de regeneración del tejido dañado o malformado que dependiera del tiempo de padecimiento de las convulsiones en los pacientes estudiados. Se consideró el tiempo de evolución desde la edad al inicio de las crisis hasta la edad en el momento de la cirugía, dividiendo los casos en tres períodos, el primer grupo correspondía a pacientes con menos de 10 años de evolución de las crisis (n=5), el segundo grupo pertenecía a pacientes con una evolución de 11-25 años (n=6) y un tercer grupo que concentraba a los casos con más de 26 años de evolución (n=5).

2.1- Expresión de ARNm de genes marcadores de OPCs: NG2 y PDGF α R

Al agrupar a los pacientes en tres grupos en base al tiempo de evolución de las crisis se identificaron las siguientes medianas y rangos intercuartiles de expresión relativa de PDGF α R tomando como grupo de referencia al grupo de pacientes con más de 26 años de evolución que correspondía al grupo de menor expresión de PDGF α R: 1,01 (0,82-9,15) en el grupo de menos de 10 años de evolución, 3,291 (0,59-10,22) en los pacientes con 11-25 años de evolución y 1 (0,6-1,6) en los de más de 26 años de evolución. Si bien el grupo con 11-25 años de evolución mostró una mediana de expresión dos veces mayor que los otros dos grupos, las medianas de expresión no mostraron diferencias estadísticamente significativa, p=0,545, Test de Kruskal Wallis.

Ver Gráfico 2.1a.

Al analizar la expresión de ARNm de NG2 se detectó al grupo con más de 26 años de evolución como el que exhibió la mediana de mayor expresión aunque con escasa diferencia con respecto a los otros dos grupos, no observándose diferencias significativas, $p=0,405$, Test de Kruskal Wallis. Las medianas y rangos intercuartiles de expresión relativa de NG2 fueron las siguientes: 0,53 (0,38-2,4) en el grupo de menos de 10 años de evolución, 0,35 (0,06-1,54) en los pacientes con 11-25 años de evolución y en los de más de 26 años de evolución fue de 1 (0,42-2,4). Ver Gráfico 2.1b.



2.2- Tinción doble de inmunohistoquímica con anticuerpos marcadores de OPCs: PDGFαR y Olig2

Por cada grupo de diferente tiempo de evolución se determinaron las medianas y rangos intercuartiles de las células simultáneamente positivas con el anticuerpo PDGFαR y con Olig2 por campo 40x a nivel de SG de neocorteza, con los siguientes resultados: 2 (1,8-2,9) en el grupo con menos de 10 años de evolución; 3,8 (1,8-9,8) en el grupo de pacientes con 11-25 años de evolución y 2,7 (1,5-8,9) en el grupo con más de 26 años de evolución.

Si bien, en correlación con lo observado en los resultados de expresión de ARNm de PDGFαR, se evidenció una mediana mayor de número de células doble positivas en el grupo con 11-25 años de evolución, las medianas de células no mostraron diferencias significativas entre los grupos ($p=0,611$, Test de Kruskal Wallis). Ver Gráfico 2.2a.

Tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución del número de OPCs si se evaluaban por separado aquellas de ubicación en satelitis perineuronal o las que no se encontraban adyacentes a las neuronas, ($p=0,589$ y $p=0,288$, respectivamente, Test de Kruskal Wallis), siendo las medianas de 1 (0,45-1,22) y 0,9 (0,87-2,28) en el grupo con menos de 10 años de evolución; 1,25 (0,77-4,3) y 2,67 (0,98-5,57) en el grupo de pacientes con 11-25 años de evolución y 1,15 (0,55-5,2) y 1,55 (0,95-3,7) en el grupo con más de 26 años de evolución, respectivamente. Ver Gráficos 2.2b y 2.2c. Así mismo, no se observó correlación entre el tiempo de evolución de las crisis y el número de células doble positivas totales, en satelitis perineuronal ni no adyacentes a las neuronas ($r=0,219$, $p=0,410$; $r=0,342$, $p=0,1919$ y $r=0,263$, $p=0,32$, respectivamente, correlación de Spearman).

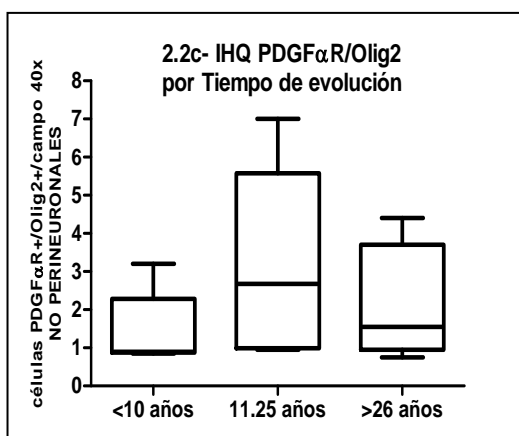
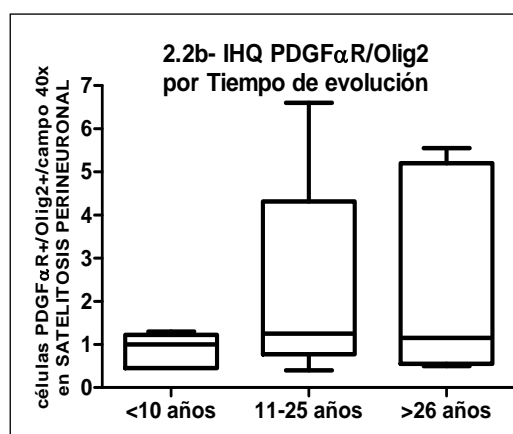
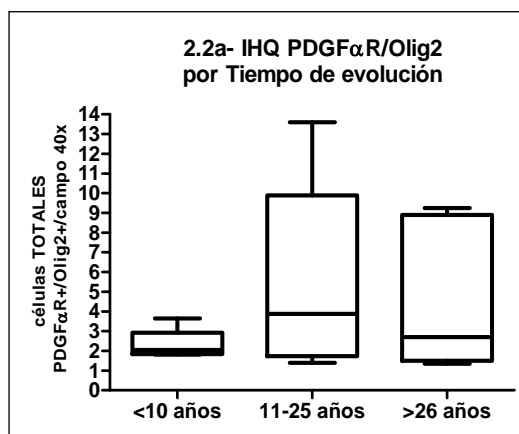


Gráfico 2.2a, b, c- Resultados de la doble tinción de inmunohistoquímica con los anticuerpos Olig2 y PDGFαR en los tres grupos con distinto tiempo de evolución de las crisis, independientemente del diagnóstico patológico. Los resultados se expresan como medianas y rangos intercuartiles, de las células doble positivas totales (2.2a), en satelitis perineuronales (2.2b) y no adyacentes a una neurona (2.2c) por campo de gran aumento (40x).

3. Comparación entre pacientes con distinta edad de inicio de los síntomas

Con el fin de evaluar si existía afectación de la población de células OPCs en la SG que pudiera ser secundaria al daño de la corteza provocado por el padecimiento de crisis desde edades tempranas de la vida, se compararon los casos agrupándolos según la edad que presentaba el paciente al momento de la primer crisis convulsiva, independientemente de la patología que padeciera. Se dividieron los casos en tres grupos, los que presentaron crisis a la edad de 5 años o menos (n=7), aquellos con su primer crisis entre los 6 y 15 años (n=5) y el tercer grupo estaba conformado por pacientes con una edad mayor a 16 años en el momento de su primer crisis convulsiva (n=4).

3.1- Expresión de ARNm de genes marcadores de OPCs: NG2 y PDGFαR

Se compararon los resultados de expresión relativa de ARNm de PDGFαR entre los tres grupos con diferentes edades al inicio de los síntomas, tomando como grupo de referencia al de menor expresión de PDGFαR, en este caso el grupo de 6-15 años. Las medianas y rangos intercuartiles fueron los siguientes: 1,35 (0,66-1,81) en el grupo de menos de 5 años al inicio de los síntomas, 1 (0,79-10,24) en el grupo de 6-15 años y 3,21 (0,49-19,4) en el grupo de más de 16 años. Si bien se observó una mediana mayor de expresión relativa en los pacientes mayores de 16 años al momento del inicio de los síntomas, las medianas no mostraron diferencias estadísticamente significativas, $p=0,78$, Test de Kruskal Wallis. Ver Gráfico 3.1a.

Se determinaron las medianas y rangos intercuartiles de la expresión relativa del ARNm del gen NG2, obteniéndose los siguientes resultados: 2,8 (1,51-4,27) en el grupo de menos de 5 años, 1 (0,5-8,6) en el grupo

de 6-15 años y 1,02 (0,35-3,68) en el grupo de mayores de 16 años al inicio de los síntomas. A diferencia de los niveles de expresión evidenciados con PDGF α R se detectaron mayores valores de mediana en los menores de 5 años con respecto a los otros dos grupos. La distribución de los valores entre los tres grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas, $p=0,48$, Test de Kruskal Wallis. Ver Gráfico 3.1b.

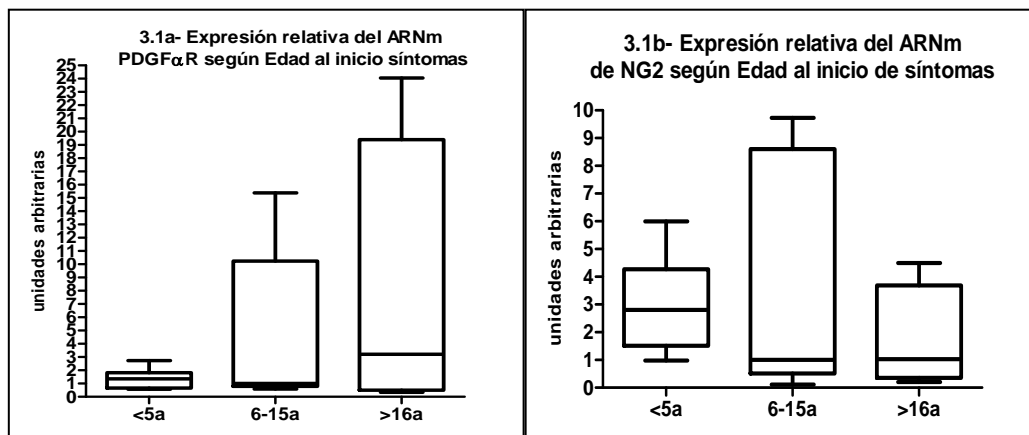


Gráfico 3.1a- y 3.1b- Niveles de expresión relativa de ARNm del gen PDGF α R y NG2, respectivamente. Se expresan los valores como medianas y rangos inter-cuartiles de unidades arbitrarias tomando como grupo de referencia al grupo de 6-15 años a la edad de inicio de los síntomas.

3.2- Tinción doble de inmunohistoquímica con anticuerpos marcadores de OPCs: PDGF α R y Olig2

Se calcularon las medianas e intervalos intercuartiles de las células positivas simultáneamente para los dos anticuerpos estudiados por campo de 40x, con los siguientes resultados: el grupo con menos de 5 años al inicio de las crisis presento una mediana de 1,81 (1,4-1,85), en el grupo con edades de 6-15 años fue de 3,65 (2,23-6,4) y de 6,42 (2,55-12,5; $n=4$) en el grupo de pacientes mayores de 16 años al momento de su primer convulsión. Las medianas del número de células entre los tres grupos mostraron diferencias significativas ($p=0,022$, Test de Kruskal Wallis). Al realizar el post test de comparación de grupos se diferenciaron significativamente entre sí la mediana del grupo de menores de 5 años al momento del inicio de las crisis y la del grupo de mayores de 16 años (ver Gráfico 3.2a), constatándose correlación positiva significativa entre el número total de células doble positivas y la edad al inicio de las crisis ($r=0,706$, $p=0,0029$, correlación de Spearman).

Así mismo, al comparar las medianas del número de OPCs en posición de satelitos perineuronal se observó que la distribución de los valores no llegaban a presentar diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$, Test de Kruskal Wallis) pero evidenciaban un valor al límite de la significancia y en el Test pos hoc la principal diferencia era entre las medianas del grupo de menos de 5 años al inicio de las crisis y el de más de 16 años, siendo las mismas de 0,6 (0,45-1) y de 3,2 (1,3-6,1), respectivamente. Ver Gráfico 3.2b. Se constató, a su vez, correlación positiva significativa entre el número de células doble positivas en posición de satelitos perineuronal y la edad al inicio de los síntomas ($r=0,695$, $p=0,003$, correlación de Spearman).

Por el contrario, al comparar las medianas del número de OPCs que no se encontraran adyacentes a una neurona, no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos ($p=0,117$, Test de Kruskal Wallis). Las medianas de células doble positivas no adyacentes a neuronas/campo 40x fueron las siguientes: 1

(0,85-1,36) en el grupo de pacientes menores a 5 años, 3,2 (1,2-4,2) en los pacientes de 6-15 años y 3,2 (1,1-6,3) en el grupo con pacientes mayores a 16 años al inicio de los síntomas. Ver Gráfico 3.2c. Tampoco se observó correlación significativa entre estas células y la edad al inicio de las crisis ($r=0,461$, $p=0,071$, correlación de Spearman).

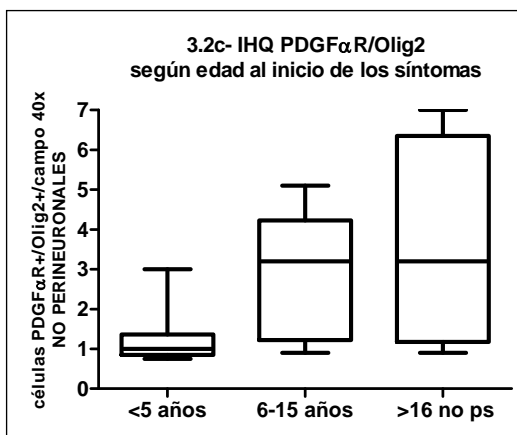
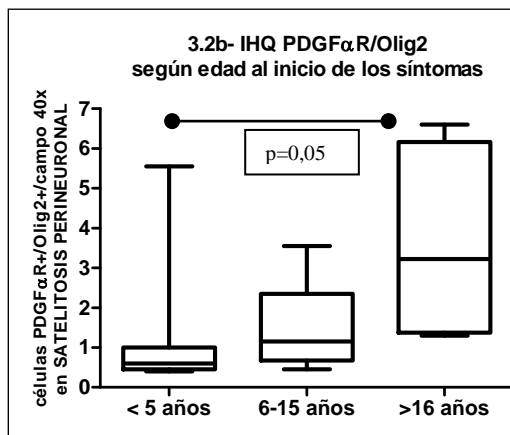
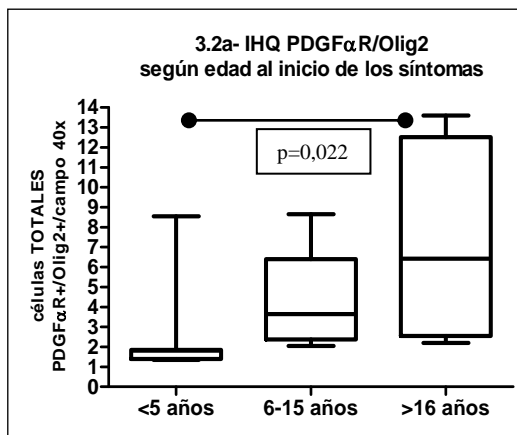


Gráfico 3.2a, b, c- Resultados de la doble tinción de inmunohistoquímica con los anticuerpos Olig2 y PDGFαR en los tres grupos según edad al inicio de los síntomas, independientemente del diagnóstico patológico. Los resultados se expresan como medianas y rangos intercuartiles de las células doble positivas totales (3.2a), en posición de satelitis perineuronales (3.2b) y no adyacentes a una neurona (3.2c) por campo de gran aumento (40x). Las medianas de **células totales** entre los grupos mostraron diferencias significativas, $p=0,022$ y correlación positiva con respecto a la edad al inicio de las crisis ($r=0,706$, $p=0,0029$). En el test pos hoc de comparación de grupos se diferenciaron significativamente el grupo de menores de 5 años y el de mayores de 16 años al inicio de las crisis. El número de **células doble positivas en posición de satelitis perineuronales** correlacionó significativamente con la edad al inicio de las crisis ($r=0,695$, $p=0,003$).

4. Comparación entre pacientes con distinta edad en el momento de la cirugía

Con el objeto de evaluar si existían variaciones en la población de OPCs dependientes de la edad del paciente, se compararon los casos según la edad del paciente en el momento de la cirugía, independientemente de la patología que padeciera. Los mismos se dividieron en tres grupos, aquellos con edades menores a 20 años al momento de la cirugía (n=5), otro grupo de pacientes con edades de 21 a 35 años (n=5) y un tercer grupo con pacientes mayores a 36 años al momento de la cirugía (n=6).

4.1- Expresión de ARNm de genes marcadores de OPCs: NG2 y PDGFαR

Se determinaron las medianas y rangos intercuartiles de los niveles de expresión relativa del ARNm del gen PDGFαR, utilizando como grupo de referencia al de menor expresión, que en este caso fue el grupo de 21 a 35 años, con los siguientes resultados: 1,45 (0,85-9,37) en el grupo de menores de 20 años, 1 (0,6-3,33) en el grupo de 21-35 años y 1,45 (0,75-10,46) en el grupo de mayores de 36 años en el momento de la cirugía. La distribución de los valores de expresión no mostraron diferencias estadísticamente significativas, $p=0,539$, Test de Kruskal Wallis. Ver Gráfico 4.1a.

Al analizar los resultados de expresión relativa del ARNm de NG2 se observaron los siguientes medianas:

4,07 (1,21-6,99) en el grupo de menores de 20 años, 1 (0,54-3,62) en el grupo de 21-35 años y 2,18 (0,65-5,24) en el grupo de mayores de 36 años al momento de la cirugía, no detectándose diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los valores entre los tres grupos, $p=0,48$, Test de Kruskal Wallis. Ver Gráfico 4.1b.

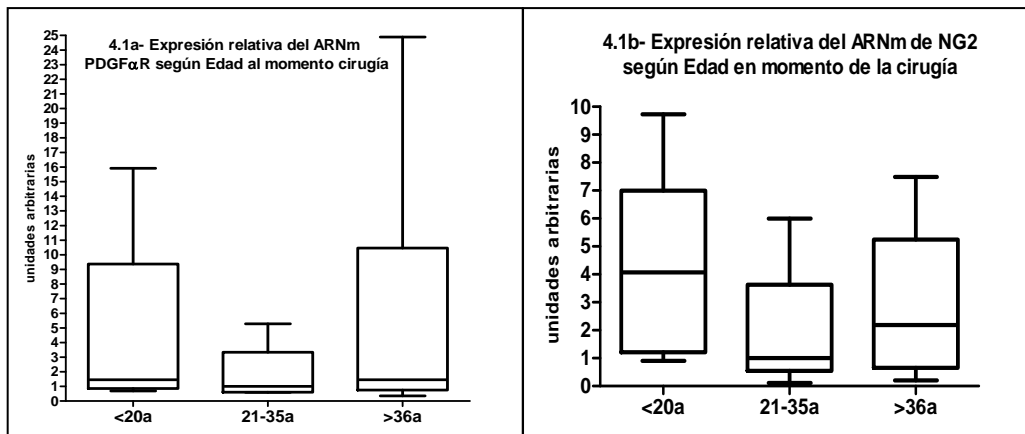


Gráfico 4.1a- 4.1b- Niveles de expresión relativa de ARNm del gen PDGFaR y NG2, respectivamente. Se expresan los valores como medianas y rangos inter-cuartiles de unidades arbitrarias tomando como grupo de referencia al grupo con 21-35 años de edad al momento de la cirugía.

4.2- Tinción doble de inmunohistoquímica con anticuerpos marcadores de OPCs: PDGFaR y Olig2

Se determinaron las medianas y rangos intercuartiles de cada grupo con los siguientes resultados: el grupo de pacientes con menos de 20 años al momento de la cirugía presentó una mediana de 1,85 (1,6-2,8) células doble positivas/campo 40x, el grupo de pacientes con edades de 21-35 años mostró una mediana de 2,2 (1,6-6,4) y el grupo de pacientes con edades mayores a 36 años al momento de la cirugía presentó una mediana de 6 (2,4-10,3). Debido a que no se detectó homogeneidad de las varianzas con el Test de Levene, se calcularon los Logaritmos naturales (LN) de los datos y se repitió el test logrando homogeneidad de las varianzas entre los grupos. Entonces se realizó la comparación estadística entre los grupos no detectándose diferencias significativas ($p=0,203$, test de Kruskal-Wallis). Ver Gráfico 4.2a. Tampoco se observó correlación significativa entre la edad en el momento de la cirugía y el número total de células dobles positivas ($r=0,484$, $p=0,058$, correlación de Spearman).

Al analizar por separado las células doble positivas en posición de satelitosis perineuronal se observaron las siguientes medianas: 0,45 (0,42-1,07) en los pacientes menores de 20 años, de 0,9 (0,75-2,42) en el grupo de 21-35 años y de 3,22 (0,98-5,8) en el grupo de pacientes con edades mayores a 36 años al momento de la cirugía. Luego se calcularon los LN, logrando la homogeneidad de las varianzas y se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p=0,049$, Test de Kruskal Wallis), detectándose en el test pos hoc que la principal diferencia era entre el grupo de menos de 20 años y el grupo de mayores a 36 años en el momento de la cirugía (ver Gráfico 4.2b). A su vez, se constató correlación positiva significativa entre las células en posición de satelitosis perineuronal y la edad en el momento de la cirugía ($r=0,694$, $p=0,003$, correlación de Spearman).

No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos al analizar sólo las OPCs no ubicadas adyacentes a las neuronas, $p=0,199$, Test de Kruskal Wallis. Ver Gráfico 4.2c. Tampoco se detectó correlación

significativa entre estas células y la edad en el momento de la cirugía ($r=0,39$, $p=0,135$, correlación de Spearman)

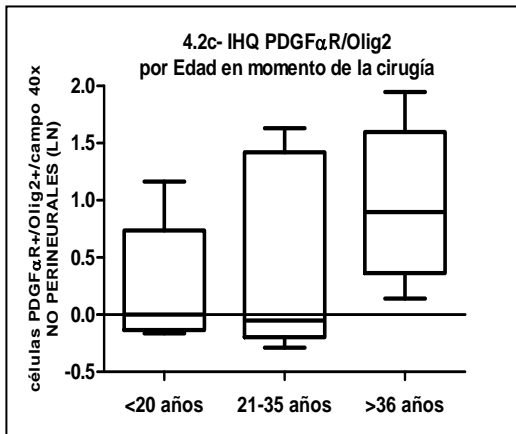
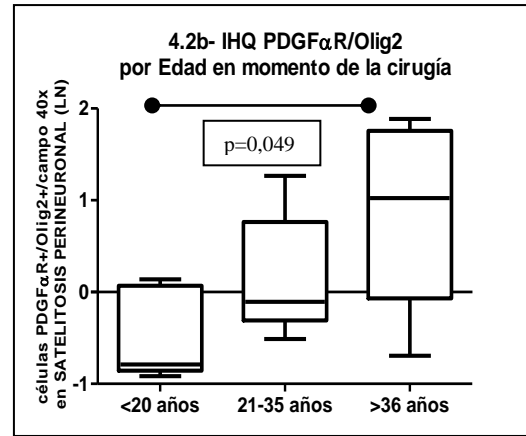
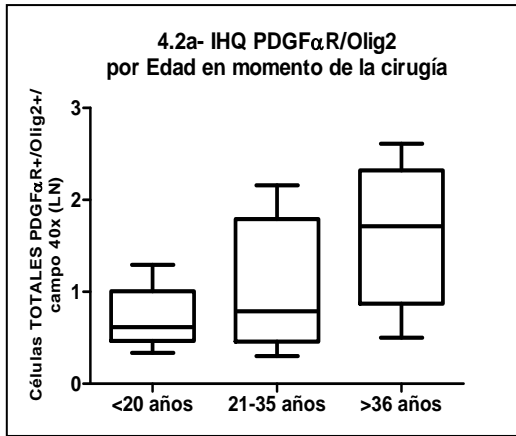


Gráfico 4.2a, b, c- Resultados de la doble tinción de inmunohistoquímica con los anticuerpos Olig2 y PDGFαR en base a la edad al momento de la cirugía, independientemente del diagnóstico patológico. Los resultados se expresan como mediana del Logaritmo natural (LN) y rangos intercuartiles, de las células doble positivas totales (4.2a), en posición de satelitosis perineuronal (4.2b) y no adyacentes a una neurona (4.2c) por campo de gran aumento (40x). Se detectaron diferencias significativas en la distribución de las **células en posición de satelitosis perineuronal, $p=0,049$** . En el test post hoc se detectó que la diferencia era entre el grupo de menores de 20 años y el de mayores de 36 años. Las células en satelitosis perineuronal mostraron correlación positiva con respecto a la edad al momento de la cirugía ($r=0,694$, $p=0,003$).

Como se constató correlación entre el número de células doble positivas y la edad de inicio de los síntomas, así como con la edad en el momento de la cirugía, evaluamos el promedio de edades en cada uno de esos grupos para determinar si había un agrupamiento similar de los pacientes en base a esas dos variables, observando que los pacientes menores al momento de la cirugía coincidían en parte con aquellos que tenían menor edad al inicio de las crisis, en base a los grupos determinados en el trabajo.

Grupo edad al inicio crisis	Media edad al momento Cirugía
<5 años	21 años
6-15 años	23 años
>16 años	45 años
Grupo edad al momento cirugía	Media edad al inicio de las crisis
<20 años	3 años
21-35 años	11 años
>36 años	15 años

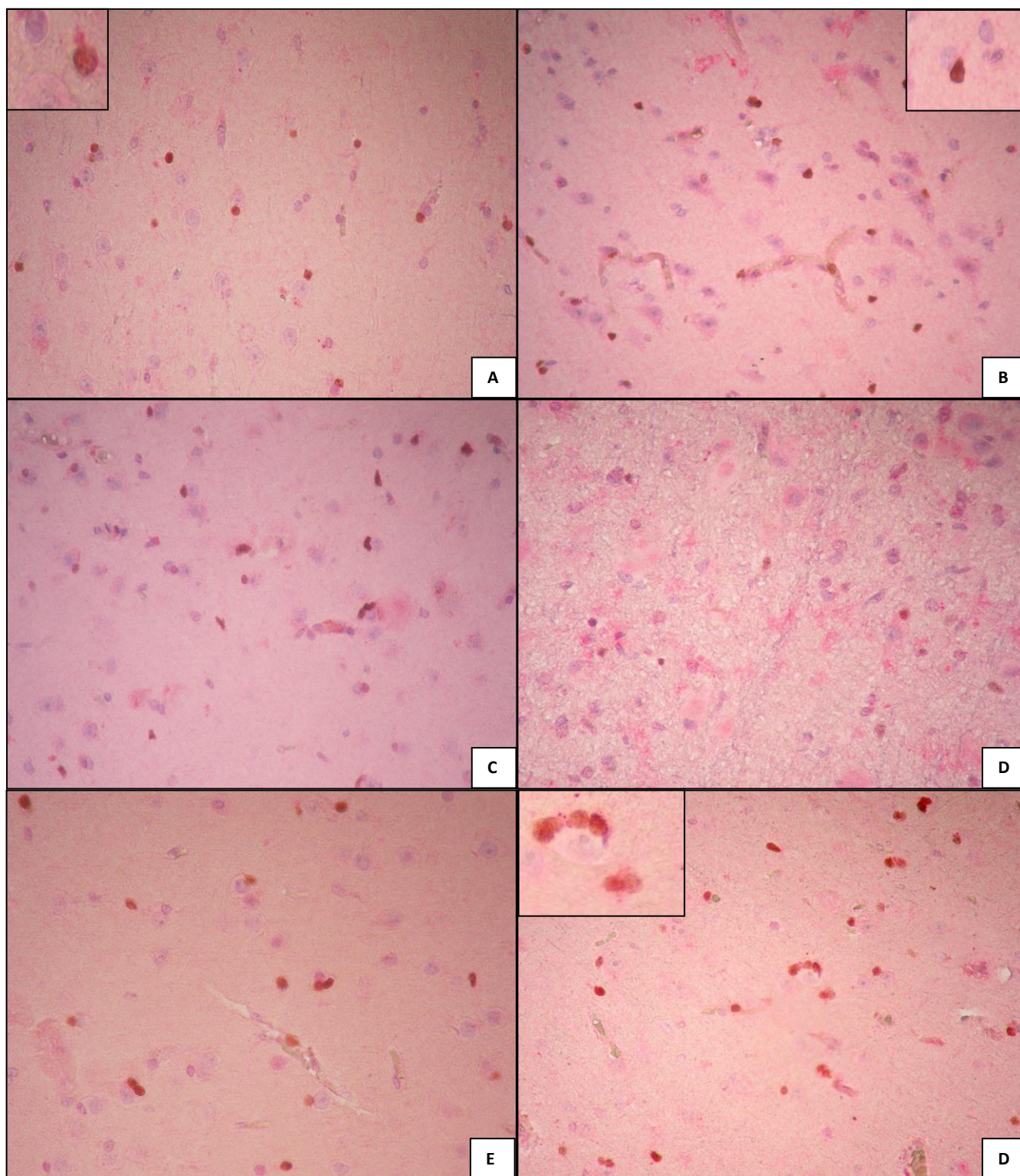


Figura 5- A- DCF IA, B- DCF IIIA, C- DCF IIA, D- DCF IIB, E- HS, F- PD. Técnica de doble inmunotinción con anticuerpos Olig2, marcación nuclear marrón y PDGF α R, marcación rojiza citoplasmática, demarcando los procesos (como se observa en el recuadro amplificado en foto B) o con patrón granular o en “dots” (como se visualiza en el recuadro amplificado en la foto A). En la Figura F se amplificó en el recuadro el patrón de satelitosis perineuronal. Los patrones de inmunotinción fueron similares en los distintos tipos de patologías

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La epilepsia es una enfermedad neurológica frecuente, que representa un importante problema de salud pública ya que afecta a más de 50 millones de personas en todo el mundo. Se produce como consecuencia de diversas patologías (49). En un estudio europeo se constató que en un 22,5% de los pacientes existía farmacoresistencia (50), habiéndose observado, a su vez, que aproximadamente en un 30 a 40% de los pacientes fallaba la respuesta al tratamiento farmacológico o a otros tratamientos. Así mismo, se ha reportado que las personas con epilepsia presentan 1,6 a 11,4 veces mayor tasa de mortalidad que la esperada, siendo más frecuente de observar en los casos de epilepsia refractaria. Dentro de las causas de muerte descritas en los pacientes con epilepsia se encuentran la muerte súbita inesperada en epilepsia, accidentes, suicidios, enfermedad vascular y aquellas relacionadas con la enfermedad subyacente (50).

Cuando las crisis epilépticas permanecen por dos años refractarias al tratamiento farmacológico se plantea la intervención quirúrgica (1). Las entidades clínico-patológicas más frecuentemente observadas en los especímenes quirúrgicos por farmacoresistencia son la Esclerosis del hipocampo (HS), los Tumores asociados a epilepsia de larga data y las Malformaciones del desarrollo cortical (13) dentro de las cuales se encuentran las Displasias corticales focales (DCF).

La clasificación histopatológica de las DCF publicada por la Liga internacional contra la epilepsia (ILAE) las clasifica en tres tipos, cada uno con características histopatológicas distintivas (8). A su vez, estos subtipos histopatológicos presentan distintos mecanismos según la clasificación de Malformaciones corticales del desarrollo localizadas (9, 51), correspondiendo las DCF tipo II de la ILAE al grupo IC, que representan disgenesias corticales con proliferación celular anormal. En particular las DCF tipo II estarían relacionadas a la vía molecular de control de proliferación mTOR (mammalian target of rapamycin). Así mismo, se ha observado que existen diferencias en la expresión de proteínas en las distintas capas corticales entre la DCF II y la I según la ILAE (51,52). Las DCF tipo II presentan proteínas tempranas del desarrollo a nivel de las capas corticales profundas, mientras que las DCF tipo I expresan pocas de estas proteínas, ubicándose en capas corticales más superficiales. A su vez, las DCF tipo I y III corresponden al grupo IIIC de la clasificación de Malformaciones corticales del desarrollo localizadas y serían secundarias a un anormal desarrollo post-migracional, proponiéndose que son consecuencia de una injuria (prematurez severa, asfixia, sangrado, hidrocefalia, accidentes cerebrovasculares, entre otras) de la corteza durante estadios tardíos del desarrollo cortical (51,52).

Por otro lado, la ILAE divide la Esclerosis del hipocampo (HS) en tres tipos de acuerdo a los sectores más afectados del Asta de Ammon (10), siendo el tipo I el más frecuente de observar con mayor tasa de pacientes libres de crisis posterior a la cirugía (11). Se considera que la HS es una patología adquirida, de causa multifactorial, habiéndose propuesto que una injuria a edades tempranas de la vida predispondría al hipocampo inmaduro a desarrollar HS (11).

Histopatológicamente, en los especímenes quirúrgicos por patología no tumoral de epilepsia farmacoresistente se han descrito en diversos estudios la presencia de un incremento de células oligo-like, principalmente en sustancia blanca (SB), pero también a nivel de sustancia gris (SG), en especial en las capas corticales profundas, en posición de satelitosis perineuronal o no, asociadas a patologías conocidas (HS, DCF, malformaciones vasculares) o como único hallazgo histopatológico (34-36, 42-43). En algunos de estos estudios

se identificó que parte de esas células correspondían a células precursoras de oligodendrocitos (OPCs).

En el presente trabajo hemos evaluado la población de OPCs a nivel de neocorteza en 8 casos con DCF, 5 con HS y 3 con Patología dual con dos técnicas diferentes. Por un lado, por medio de la técnica de PCR en tiempo real para determinar la expresión relativa de los transcritos de NG2 y PDGF α R, marcadores putativos de OPCs, y por otro lado, por medio de técnicas de doble tinción de inmunohistoquímica con los anticuerpos PDGF α R y Olig2 para evaluar cuantitativamente las OPCs de SG, pudiendo tener en cuenta su distribución.

En primera instancia, se realizó un análisis en base al tipo de patología. Si bien los resultados de expresión relativa del ARNm de PDGF α R y NG2 no fueron del todo comparables ya que se observó con el primer gen más expresión relativa del grupo de DCF en relación a los otros dos grupos de patología y con NG2 se detectó más expresión en el grupo de HS, las diferencias de expresión relativas observadas no fueron significativas entre los grupos de patologías con ninguno de los dos genes. Por su parte, los resultados con las técnicas de tinción doble de inmunohistoquímica, no mostraron tampoco diferencias significativas entre las medianas de células doble positivas entre las patologías, tanto al analizar las células doble positivas totales como cuando se evaluaron por separado sólo aquellas en posición de satelitos perineuronal y las que no se encontraban adyacentes a las neuronas. En los resultados por medio de técnicas moleculares y con la inmunohistoquímica se observó que el grupo de DCF era el que mostraba mayor heterogeneidad de los resultados entre los casos. Consideramos que podría deberse a que en ese grupo se encontraban distintos tipos de DCF según la ILAE. Por lo tanto, realizamos los mismos análisis pero separando las DCF por un lado en el tipo II y por otro en los tipos I y III en conjunto (ya que pertenecen al mismo grupo en la clasificación de malformaciones corticales del desarrollo) y si bien no se detectaron tampoco diferencias significativas del número de células inmunoreactivas ni de la expresión relativa del ARNm, sí pudo observarse que al dividir de esa forma las DCF los resultados por grupo fueron más homogéneos. En conclusión, no detectamos diferencias en el número de OPCs ni en la expresión de los transcritos de los genes marcadores a nivel de la SG entre los tres grupos de patologías estudiadas. Al comparar nuestros resultados con trabajos previos, hallamos cinco trabajos donde se evaluaron de distintas maneras las OPCs en especímenes cerebrales de pacientes con epilepsia farmacorresistente (34,42-45). En uno de ellos sólo se evaluaron estas células a nivel de SB utilizando inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-Olig2 (44). En otros dos trabajos se evaluaron las OPCs por medio del anticuerpo NG2 y el conteo realizado no es comparable al que utilizamos en el presente proyecto (42,43). Por último, en los dos estudios restantes se utilizó inmunomarcación con el anticuerpo anti-PDGF α R y el modo de conteo de las células fue similar al nuestro (34,45). En el trabajo de Schurr J et al. se contabilizaron las células PDGF α R positivas a nivel de las capas profundas de la SG y en la SB subcortical como complemento de la descripción de una posible nueva entidad que denominaron “Malformación del desarrollo cortical leve con hiperplasia oligodendroglial (MOGHE)”. El grupo control de autopsias sin patología neurológica que evaluaron presentó aproximadamente una media de 100 células PDGF α R positivas por mm², es decir $1 \times 10^{-4} / \mu\text{m}^2$ y en los casos con MOGHE fue de aproximadamente $3,2 \times 10^{-4} / \mu\text{m}^2$ (dato obtenido a partir de la figura S3 del artículo) (34). En dicho trabajo citan que se detectó un incremento significativo en el número de células PDGF α R inmunoreactivas entre los casos con MOGHE comparado con el grupo control, con las DCF tipo I y con casos de epilepsia del lóbulo temporal (ELT), sin embargo no especifican los valores obtenidos en las dos últimas patologías para poder compararlas con nuestros resultados. Por otro lado, Sheperd C et al. realizaron un estudio de casos con DCF tipo II donde observaron reducción de los axones mielinizados en SB subyacente a la corteza

con displasia. A su vez, evaluaron por medio de inmunohistoquímica el número de células OPCs utilizando por separado los anticuerpos PDGF α R y NG2 y usaron como control la SB y SG de la corteza preservada adyacente al área displásica. En la SG control la media de densidad de células PDGF α R positivas fue $8,305 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$ y en la SB $12,75 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$ (45). Estos valores serían similares a los observados en el grupo control obtenidos en el trabajo de Schurr J et al. A su vez, en el artículo de Sheperd C et al. detectaron en la SG del área con DCF tipo II una media de células PDGF α R positivas de $6,31 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$ y de $8,971 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$ en la SB subyacente al área displásica. Si bien evidenciaron una disminución del número de células positivas con respecto al área sin displasia tanto en SG como en SB, las diferencias no fueron significativas. Al expresar nuestros resultados como promedio del número de OPCs por μm^2 obtuvimos los siguientes valores por grupo de patología, en la DCF de $1,208 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$, en la HS de $1,52 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$ y de $1,54 \times 10^{-5}/\mu\text{m}^2$ en la PD, siendo estos valores menores que los observados tanto en los controles de los trabajos citados así como en los casos de DCF tipo II del paper de Sheperd C et al. Esto podría deberse a que realizamos un conteo a partir de células que no sólo presentaban positividad con PDGF α R, como en los artículos mencionados, sino que contabilizamos aquellas simultáneamente positivas con Olig2, determinando una detección más específica de las OPCs. Esto plantearía la posibilidad que exista otro tipo de células que expresen PDGF α R que no sean OPCs, ni neuronas (26,53) (la positividad en algunas neuronas pudimos observarla en los casos que analizamos). En este aspecto, hemos observado algunas células PDGF α R positivas Olig2 negativas. Por lo tanto, existe la posibilidad que en esos trabajos se estén contabilizando también otro tipo celular además de las OPCs. Por otro lado, en la publicación de Schurr J et. contabilizaron en conjunto SG y SB, ésta última aumentaría el número de OPCs cuantificadas ya que ha sido descrito una mayor densidad de estas células a nivel de SB (17). Además, existen otros artículos donde se estudiaron las OPCs en patologías relacionadas con las analizadas en nuestro proyecto (54-56). En uno de estos trabajos analizaron las células NG2 positivas por medio de inmunofluorescencia en casos de esclerosis tuberosa humana (patología con similitudes histopatológicas con las DCF tipo II), donde no observaron alteración de dichas células ni de los oligodendrocitos con respecto a controles humanos y donde describen que se observa visualmente una disminución de los oligodendrocitos pero no cuantifican las células. Por otro lado no vieron activación de la vía mTOR en estos dos tipos celulares ni co-expresión de vimentina ni nestina (que refieren como marcadores de activación de las células OPCs) en las células NG2 positivas. Evaluaron además, por medio de doble inmunofluorescencia con NG2 y PDGF α R, la morfología de las células OPC sin observar alteraciones (54). A su vez, en un modelo animal de ectopia de la capa molecular, que tendría relación con los hallazgos de las DCF, observaron que las células NG2 positivas por medio de inmunofluorescencia mostraban distribución uniforme en la zona ectópica similar al área adyacente a la ectopia. Sin embargo no realizaron un conteo de esas células con respecto a controles para evaluar si existían variaciones en el número de las células NG2 en la zona ectópica (55). Por último, en un modelo animal de epilepsia del lóbulo temporal, se observó una disminución, con respecto al control, de las células recién nacidas que se diferenciaban a neuronas y un incremento de diferenciación a células NG2 positivas o β 100 positivas de células recién nacidas (evaluadas con inmunofluorescencia con BdrU) en epilepsia crónica, con respecto al hipocampo intacto. (56). En este trabajo, a diferencia de nuestro estudio, evaluaron el hipocampo y el porcentaje de células nuevas que se diferencian a NG2, no discriminando si presentaban otros marcadores de OPCs para diferenciar si en realidad parte de esas células NG2 positivas no correspondían a otros tipos celulares que pueden expresar dicho anticuerpo como por ejemplo los pericitos y la microglia ameboides. Por lo tanto, lamentablemente no sería posible comparar en

forma certera nuestros resultados con los artículos citados. Pero interpretando en conjunto nuestros hallazgos con los trabajos previos, en especial los dos que cuantificaron las células en forma similar a nuestro estudio (34,45) donde no observaron diferencias significativas entre los controles y las DCF I, DCF II y la ELT, consideramos válido nuestro resultado de falta de variaciones significativas en la población de OPCs entre las tres entidades patológicas estudiadas, pese al número limitado de casos evaluados por grupo, y especulamos que posiblemente estos valores sean similares a casos control sin epilepsia, ya que pensamos que es poco probable que los tres tipos de patologías que hemos analizado varíen en forma similar con respecto a valores normales. Sin embargo, sería necesario contar con un grupo control comparable para confirmarlo.

Posteriormente evaluamos otras variables que pudieran afectar la población de OPCs independientemente de la patología que padeciera el paciente. Analizamos los casos dividiéndolos en grupos de pacientes con distinto tiempo de evolución de las crisis convulsivas con el fin de determinar si existían variaciones de la población de OPCs dependientes del tiempo de padecimiento de las crisis. Si bien se observó un incremento en el grupo de 11-25 años de tiempo de evolución, tanto con técnicas moleculares como por medio de inmunohistoquímica, de la expresión del ARNm de PDGF α R como de las células doble positivas, respectivamente, el mismo no fue significativo. Tampoco se observó correlación lineal entre el número de OPCs y el tiempo de evolución. Por lo tanto, no pudo constatarse que existiera con el tiempo de evolución un intento de reparación por parte de estas células del posible daño causado por sufrir crisis epilépticas de larga data o por el contrario una disminución del número de dichas células consecuencia del daño sufrido por padecer de crisis por largos períodos. En relación a esto, a nivel de amígdala lateral humana en casos de esclerosis del hipocampo se ha descrito un incremento significativo de las células en posición de satelitosis perineuronal que correlacionaba con la duración de la epilepsia pero sólo en el 40% de esas células se detectó positividad con NG2 (42). Por otro lado en un modelo animal de esclerosis del hipocampo se constató una pérdida de mielina y oligodendrocitos durante la epileptogénesis inducida por litio-pilocarpina asociado a un incremento transitorio de las OPCs durante la fase aguda y la crónica, evaluadas por medio de inmunomarcación con NG2 y de Western blot para detectar la proteína PDGF α R. Dicho incremento no se detectó en la fase crónica tardía de la epileptogénesis (46). En el artículo mencionado en comparación con nuestro estudio evalúan los hallazgos a nivel del hipocampo y no de neocorteza y así mismo, consideramos que sería difícil poder determinar con certeza la correspondencia temporal de la fase crónica y crónica tardía del modelo animal con el tiempo de evolución de las crisis en nuestros pacientes.

Luego evaluamos la posibilidad de afectación de la población de OPCs consecuencia del daño generado por presentar crisis desde edades tempranas de la vida, por lo cual dividimos los casos en base a la edad al momento de la primera crisis convulsiva independientemente de la patología que padeciera el paciente. La expresión relativa de los transcritos de los dos genes estudiados presentaban variaciones opuestas ya que se observó mayor expresión relativa del ARNm de PDGF α R en el grupo de pacientes con edades mayores a 16 años en el momento de la primera crisis convulsiva y en el caso de NG2 se detectó una mayor expresión relativa en los pacientes con edades menores a 5 años. Sin embargo, con ninguno de los dos genes se observaron diferencias significativas entre los grupos con distintas edades al inicio de las crisis. Al contrastar estos resultados con lo observado en la inmunotinción, se detectó, principalmente al comparar las células totales doble positivas (PDGF α R+/Olig2+), un incremento significativo del número de células entre el grupo de menores de 5 años y los mayores de 16 años al inicio de las crisis. Así mismo se observó una correlación positiva significativa

entre la edad al inicio de las crisis y el número de OPCs totales y en posición de satelitis perineuronal. Podría interpretarse ante estos resultados que la presencia de convulsiones tempranas produciría un daño que afectaría el número de OPCs comparado con pacientes con un inicio de crisis más tardío. A favor de este planteo se ha descrito que existe relación entre la edad de inicio de la epilepsia y la severidad de la reducción de la mielina detectada con CNPasa en DCF especulando que las crisis tempranas interferirían en la maduración de la mielina (45). Por otro lado, se ha descrito una marcada susceptibilidad al stress oxidativo tanto de los oligodendrocitos como de los precursores oligodendrogiales por ser células con alta tasa metabólica y escasos mecanismos celulares antioxidantes (18,57) y se ha evidenciado relación de la epilepsia con el stress oxidativo (58) y con la activación de vías pro-inflamatorias que generarían un ambiente citotóxico (18,59).

Por último evaluamos los resultados en base a la edad en el momento de la cirugía con el objeto de determinar variaciones de las OPCs dependientes de la edad. No se detectaron diferencias significativas en el nivel de expresión relativa de ambos genes. Al analizar las células doble positivas por inmunohistoquímica se detectó un incremento significativo del número de células en posición de satelitis perineuronal en los casos de mayores de 36 años al momento de la cirugía con respecto a los menores de 20 años, mostrando así mismo correlación positiva significativa entre ambos grupos. Evaluamos entonces si estas diferencias correlacionaban de alguna manera con lo observado en base a la edad de inicio de los síntomas detectando que los casos de pacientes mayores al momento de la cirugía y que presentaban mayor número de OPCs, se correspondían en parte con aquellos que presentaban edades tardías de inicio de las crisis y que por lo tanto en base a nuestra interpretación anterior tendrían preservación de dichas células por no haber sufrido daño del parénquima a edades tempranas de la vida.

En el presente proyecto evaluamos la expresión relativa de los transcritos de dos genes marcadores putativos de OPCs. Al no ser cuantitativa la expresión consideramos que no era válido intentar correlacionar los resultados de expresión de ambos genes, ni tampoco con respecto al número de células detectadas por la técnica de doble inmunotinción. Pese a que se ha descrito que en general la correlación entre la expresión del ARNm y de la proteína suele ser baja, esperábamos detectar al menos variaciones similares de ambos genes y sobre todo entre la expresión del ARNm de PDGF α R y del número de células detectadas por inmunohistoquímica entre los distintos grupos estudiados en cada variable analizada. Con el gen NG2, al ser expresado por otros tipos celulares, era en parte esperable que presentara resultados más variables, además observamos que en general era un gen con valores de expresión bajos del transcritos ya que presentaba Ct altos en comparación con el Ct del gen de referencia SDHA en cada caso y por lo tanto consideramos que por tal motivo podría ser que fuera más difícil detectar diferencias entre los casos en sí y entre los grupos ya que de por sí era un gen de baja expresión. Sin embargo con PDGF α R esperábamos variaciones entre grupos más similares a las diferencias observadas con la técnica de inmunohistoquímica. La falta de similitud puede deberse a varios factores, primero que evaluamos un homogeneizado tisular y por lo tanto no puede precisarse la cantidad de cada tipo celular que se estaba valorando. Por otro lado, las vidas medias del ARNm y de las proteínas no son similares, así mismo existen diversos y complejos mecanismos post- transcripcionales y ha sido descrito en algunos tipos celulares que la cantidad de proteína está controlada principalmente a nivel de la traducción proteica mientras que en otros casos la tasa de transcripción determina variaciones en los niveles de los transcritos (60-62). Por otro lado, la técnica de inmunohistoquímica no es tan sensible cuantitativamente como la técnica de Western blot para detectar niveles de proteína, además de poder presentar problemas técnicos como las variables pre-analíticas

debidas al medio de fijación, duración de la misma, entre otras causas. Sin embargo, en el presente trabajo decidimos utilizar esta técnica porque nos permitía evaluar distribución y localización específica de estas células en el tejido. Por otro lado, las diferencias observadas entre las variaciones con el transcrito de PDGF α R y con respecto al número de células inmunoreactivas, pueden deberse también a que el conteo que realizamos en la inmunohistoquímica no era sólo de las células positivas con PDGF α R sino de aquellas que lo eran simultáneamente con Olig2. Finalmente, se debe tener en cuenta que se han descrito variaciones en los niveles de los mensajeros en las OPCs en base al estado quiescente o activado de estas células (17).

Pese a estas limitaciones y al hecho de no haber podido contar con un grupo control, consideramos que el presente estudio es un aporte útil al conocimiento de la patología no tumoral de la epilepsia ya que es el primer trabajo que compara los niveles de OPCs cuantitativamente por doble inmunohistoquímica PDGF α R/Olig2 y por medio de la determinación de la expresión de los transcritos de genes marcadores putativos de dichas células entre las displasias corticales focales, la esclerosis del hipocampo y la patología dual a nivel sustancia gris en especímenes quirúrgicos humanos, demostrando que no habría diferencias en la población de OPCs entre estas tres patologías. Y si bien, al no contar con controles, no pudimos descartar con certeza si eran parte del componente de células oligo-like incrementadas descritas en estas patologías, consideramos que la falta de diferencias de estas células entre las entidades analizadas, en correlación a lo observado en los escasos trabajos previos que las comparan, estaría a favor de que las OPCs no intervendrían en forma significativa en el incremento descrito de las células oligo-like en estas entidades.

Así mismo, el hallazgo que obtuvimos en relación a una disminución de las OPCs en pacientes que presentaban inicio de las crisis a edades menores a 5 años con respecto a aquellos con más de 16 años al inicio es un hallazgo interesante que genera nuevos interrogantes sobre la implicancia del posible daño que pueden generar las crisis convulsivas sobre estas células en pacientes pediátricos menores de 5 años al comienzo de las crisis.

CONCLUSIONES

La presente tesis tuvo como objetivo principal evaluar las células precursoras oligodendrogliales (OPCs) a nivel de sustancia gris de neocorteza en pacientes con displasia cortical focal, esclerosis del hipocampo y patología dual con el fin de determinar variaciones de estas células en dichas entidades patológicas asociadas a epilepsia farmacorresistente. Con tal fin hemos analizado el nivel de expresión relativa de los transcritos de PDGF α R y NG2 (marcadores putativos de las OPCs) y el número y patrón de distribución de las OPCs por medio de doble inmunomarcación con los anticuerpos PDGF α R y Olig2, arribando a las siguientes conclusiones:

1. No se detectaron diferencias significativas en la población de células precursoras oligodendrogliales a nivel de sustancia gris de neocorteza en especímenes quirúrgicos de pacientes con displasia cortical focal, esclerosis del hipocampo y patología dual.
2. Los niveles de expresión relativa de los transcritos de PDGF α R y NG2, marcadores putativos de OPCs, no presentaron diferencias significativas en sustancia gris de neocorteza entre las tres patologías estudiadas.
3. No se identificaron variaciones significativas en el número, morfología, ni distribución de las células precursoras oligodendrogliales por medio de doble inmunotinción con los anticuerpos PDGF α R y Olig2 a nivel de sustancia gris de neocorteza entre las tres patologías evaluadas.
4. Se identificó una disminución significativa del número de células precursoras oligodendrogliales en pacientes con edad menor a 5 años al inicio de las crisis comparado con aquellos mayores de 16 años, habiendo una correlación significativa entre el número de células totales y en posición de satelitosis perineuronal con respecto a la edad de inicio de las convulsiones. Especulamos que podría deberse a que la afectación de crisis convulsivas desde edades tempranas de la vida determinaría una reducción del número de células precursoras oligodendrogliales con respecto a pacientes con edades más tardías de inicio de las mismas pudiendo esto ser consecuencia de una mayor susceptibilidad de estas células en el parénquima cerebral de pacientes pediátricos menores a 5 años, secundario al daño generado por las convulsiones. Los resultados obtenidos en base a la edad en el momento de la cirugía de los pacientes mostraron correlación con lo observado en estos hallazgos.
5. No se detectaron diferencias significativas en la población de células precursoras oligodendrogliales en relación al tiempo de evolución de las crisis convulsivas por lo que se podría suponer que estas células no intervendrían en un intento de reparación del daño del parénquima generado por las crisis convulsivas de larga data.

En conclusión, en el presente estudio hemos constatado que la población de células precursoras oligodendrogliales no varía en forma significativa entre las displasias corticales focales, la esclerosis del hipocampo y la patología dual, a nivel de sustancia gris de neocorteza. Sin embargo, se detectó que estas células se ven afectadas por un inicio de crisis convulsivas a edades tempranas de la vida.

Sería necesario poder contrastar estos hallazgos con controles sin patología neurológica del mismo grupo etario para poder determinar si los resultados difieren de casos control y de esa forma poder confirmar con certeza que las OPCs no son parte de las células oligo-like que pueden observarse incrementadas en este tipo de patologías, como interpretamos en base a los resultados observados en conjunto con los trabajos descriptos previamente. A su vez sería conveniente poder ampliar el número de casos por patología, incluso aumentando el número por cada tipo de DCF, para poder evaluar las variables analizadas en el presente trabajo (tiempo de evolución, edad inicio síntomas y edad al momento de la cirugía) por cada una de estas entidades patológicas por separado con el fin de determinar si mantienen el mismo patrón de resultados observados en este estudio. Así mismo, consideramos que la implementación de otras técnicas, como podría ser la microdissección de las células doble positivas por inmunohistoquímica, podrían contribuir a determinar si existen variaciones diferentes en el nivel de los transcritos estudiados con respecto a lo observado en este estudio. La implementación de esta técnica permitiría además discernir si existen distintos tipos de OPCs o si dichas células se encuentran en distintos estadios en las diferentes patologías evaluadas.

Bibliografía

1. Fustinioni O. *Semiología del SNC* 1997, Ed 13, El Ateneo.
2. Micheli F. *Neurología* 2000, Ed médica panamericana.
3. Fisher R et al. *Epilepsia* 2005; 46 (4): 470-2.
4. López J et al. *Rev Neurol* 2010; 50 (10): 616-622.
5. Fisher R et al. *Epilepsia* 2014; 55(4):475-482.
6. Kwan P et al. *Epilepsia* 2010; 51(6):1069-1077.
7. Berg A et al. *Epilepsia* 2010; 51(4):676-685.
8. Blumcke I et al. *Epilepsia* 2011; 52(1): 158-174.
9. Aronica E and Crino P. *Neurotherapeutics* 2014; 11:251-268.
10. Blumcke I et al. *Epilepsia* 2013; 54(7):1315-1329.
11. Thom M. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2014; 40:520-543.
12. Wieser HG. *Epilepsia* 2004; 45:695-714.
13. Blumcke I. *Epilepsy & Behavior* 2009; 15:34-39.
14. Ffrench-Constant C and Raff M. *Nature* 1986; 319:499-502.
15. Dawson M et al. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2003; 24:476-488.
16. Franklin R and Ffrench-Constant C. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9:839-855.
17. Dimou L et al. *The Journal of Neuroscience* 2008; 28(41):10434 -10442.
18. El Waly B et al. *Front Neurosci.* 2014; 12: 8:145.
19. Nishiyama A et al. *J. Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58:1113-1124.
20. Butt A et al. *J. Anat* 2005; 207:695-706.
21. Kuhlmann T et al. *Brain* 2008; 131: 1749-58.
22. Fancy S et al. *Mol Cell Neurosci* 2004; 27:247-254.
23. Dawson M et al. *Journal of Neuroscience Research* 2000; 61:471-479.
24. Richardson W et al. *Cell.* Vol 1988; 53: 309-319.
25. Nishiyama A et al. *Journal of Neuroscience Research* 1996; 43:315-330.
26. Vignais L et al. *Neuroreport* 1995; 6(15):1993-6.
27. Karram K et al. *J. Anat.* 2005:207:735-744.
28. Ligon KL et al. *Glia.* 2006;54(1):1-10 .
29. Rivers L et al. *Nat Neurosci.*2008; 11:1392-1401.
30. Karadottir R et al. *Nat Neurosci* 2008; 11:450-456.
31. Wolswijk G and Noble M. *Development* 1989; 105:387-400.
32. Wren D et al. *J Cell Biol* 1992 ; 116:167-176.
33. Psachoulia, K et al. *Neuron Glia Biol* 2009; 5:57-67.
34. Schurr J et al. *Brain Pathol* 2016; Jan 7. doi: 10.1111.
35. Kasper B and Werner P. *Acta Neuropathol* 2004; 108:471-475.
36. Komori T et al. *Acta Neuropathol* 2002; 104:149-154.
37. Scherer HJ. *The American journal of cancer* 1938; vol XXXIV (3):333-351.
38. Scherer HJ. *Brain part 1* 1940; 63:1-35.
39. Chee Pin Chee et al. *J Neurosurg* 1985; 62:145-147.
40. Nazeq M et al. *Neurosurgery* 1988; 23(6):78.
41. Lombardi D et al. *J Neurosurg* 1991; 75 (4):589-596.
42. Faber-Zuschratter H et al. *Acta Neuropathol* 2009; 117:545-555.
43. Geha S et al. *Brain Pathology* 2010; 20:399-411.
44. Mühlebner A et al. *Acta Neuropathol* 2012; 123:259-272.
45. Sheperd C et al, *Epilepsia* 2013; 54 (5):898-908.
46. Lou Y et al. *Brain research* 2015; 1627:154-164.
47. Livak K and Schmittgen T. *Methods* 2001; 25:402-408.
48. Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology* 2011, Ed 10, vol 2, cap 20, pág 1720.
49. World Health Organization (WHO). "Epilepsy". WHO Factsheet, October 2012: number 999. Actualizado: Feb 2016. (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html)
50. Laxer K et al. *Epilepsy & Behavior* 2014; 37:59-70.
51. Barkovich A et al. *Brain* 2012; 135:1348-1369.
52. Hadjivassiliou G et al. *Acta Neuropathol* 2010; 120:517-28
53. Nishiyama A et al. *Journal of Neurocytology* 2002; 31:437-455
54. Sosunov A et al. *Epilepsia* 2008; 49(Suppl. 2):53-62
55. Gabel L. *Brain Res.* 2011;1381: 148-158
56. Hattiangady B and Shetty A. *Hippocampus.* 2010; 20(1):97-112
57. Husain J, Juurlink B. *Brain Research* 1995; 698:86-94.
58. Eun-Joo Shina et al. *Neurochem Int.* 2011; 59(2):122-137.
59. Zurolo E et al. *Brain* 2011; 134:1015-32.
60. Schwanhäusser B et al. *Nature* 2011;473(7347):337-42.
61. Rabani N et al. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(5): 436-442.
62. Greenbaum D et al. *Genome Biology* 2003, 4:117.
63. Wheeler PR, Burkitt HG, Daniels VG, Ed JIMS, 2° edición, 1987, cap 20, pág 314-315.
64. Pery A and Brat D, Churchill Livingstone Elsevier Ed, 2010, cap 2, pág 24.
65. Greenfields *Neuropathology*, Love S, Louis D and Ellison D, 8° ed, 2008, Vol 1, cap 1, Hodder Arnold Editorial.
66. Protección de los participantes humanos de la investigación. Oficina de NIH para Investigaciones Extra-institucionales 2011.

Apéndice 1

A. Citoarquitectura normal de la Corteza cerebral

La corteza cerebral humana (neocortex) está constituida por seis capas que comprenden el área sensitiva, motora y la corteza de asociación. A nivel de corteza olfatoria y límbica del lóbulo temporal se mantiene el patrón primitivo de tres capas (63). Los cinco tipos de neuronas corticales son: **1- células piramidales**: con el vértice dirigido hacia la superficie cortical, donde nace una gruesa dendrita ramificada; a nivel de la corteza motora presentan un gran tamaño y se las denomina *células de Betz*; **2- células estrelladas o granulares**: células pequeñas de forma estrellada; **3- células de Martinotti**: son células pequeñas de forma poligonal; **4- células fusiformes**: células ahusadas orientadas en ángulo recto con la superficie; **5- células horizontales de Cajal**: pequeñas células ahusadas orientadas paralelamente a la superficie cortical encontrándose sólo en la capa superficial. Además la corteza está constituida por células gliales: **Macroglia**: **1- astrocitos**: células que intervienen en el desarrollo cerebral y mantienen la homeostasis del cerebro, además de participar en la regeneración- reparación del cerebro y médula espinal posterior a una injuria produciendo un tejido cicatrizal denominado **gliosis o astrogliosis**; **2- oligodendrocitos**: células gliales con procesos celulares cortos y pequeños que con técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE) presentan núcleos redondos con citoplasma poco visible y generalmente muestran una zona clara alrededor del núcleo, halo perinuclear, por artificios de retracción debido a la fijación en formol. Son las células que producen la mielina en el SNC siendo más numerosas en SB que en la SG. En la SB se disponen a lo largo de los axones mientras que en la SG están esparcidos en el neuropilo, y tienden a situarse alrededor de una neurona, oligodendroglia satélite, pudiendo ser fuente de células progenitoras en esta última localización (64). **Microglia**: son células elongadas pequeñas, con función fagocítica. Se distribuyen en SB y SG y representan en reposo el 20% de la población celular. Se subclasifican en microglia en reposo, activada o ameboide (63, 65).

Las seis capas de la neocorteza (Ver Figura A) desde la superficie cortical hacia la profundidad son: **1- capa plexiforme (molecular)**: constituida fundamentalmente por dendritas y axones además de escasas células gliales y células de Cajal; **2- capa granular externa**: formada por neuronas piramidales pequeñas y células estrelladas; **3- capa celular piramidal**: principalmente constituida por neuronas piramidales de moderado tamaño con incremento del tamaño hacia la profundidad; **4- capa granular interna**: principalmente formada por células estrelladas estrechamente agrupadas; **5- capa ganglionar**: fundamentalmente constituida por neuronas grandes piramidales y menor cantidad de células estrelladas y de Martinotti; **6- capa celular multiforme**: presenta distintos tipos celulares como numerosas neuronas piramidales pequeñas, células de Martinotti, células estrelladas hacia superficie y células fusiformes hacia profundidad (63).

B. Citoarquitectura normal del Hipocampo

La formación del hipocampo se encuentra ubicada en el lóbulo temporal mesial, ocupando el piso del asta inferior del ventrículo lateral. Está constituido por tres porciones principales: 1- giro dentado, 2- asta de Ammon, 3- subiculum. El giro dentado consiste en tres capas, de externa a interna: molecular, granular, polimórfica. El asta de Ammon es una capa de neuronas piramidales que según la clasificación de Lorente de Nó se divide en cuatro sectores: CA1 a CA4. Ver Figura B (10).

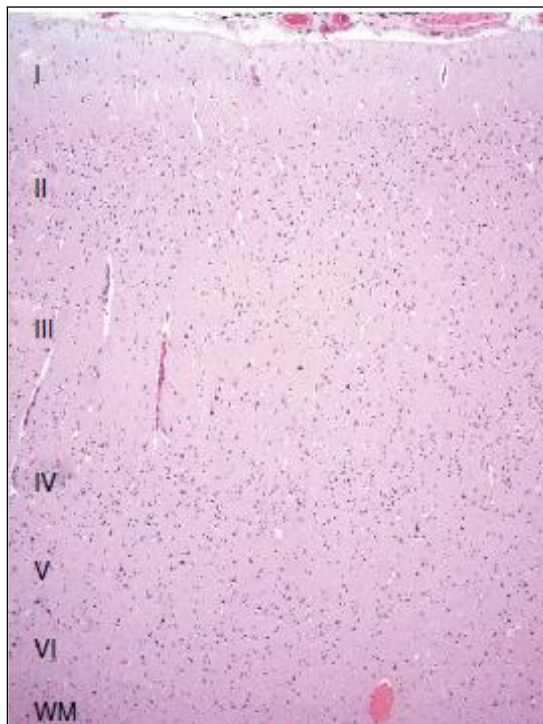


Figura A. Neocorteza donde se evidencian las VI capas de SG. Tinción de HE.
(Figura tomada de “Practical surgical neuropathology”, Perry A and Brat D, Churchill Livingstone Elsevier Ed, 2010, cap 2, pág 24)

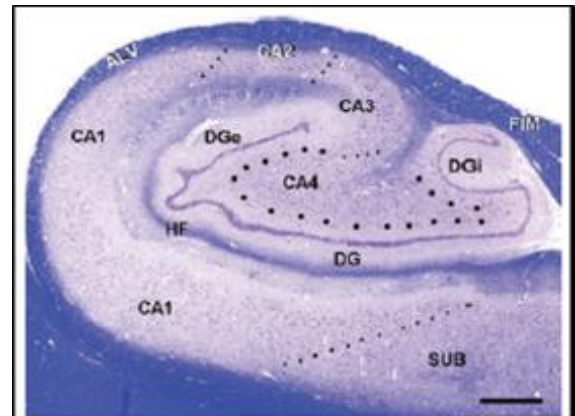


Figura B: Hipocampo humano donde se observan los 4 sectores del Asta de Ammon (CA1-CA4), el Subiculum (SUB) y el Giro Dentado (DG). Tinción de cristal violeta y Luxol Fast Blue.
(Figura tomada de Epilepsia, 54(7):1315–1329, 2013)

Apéndice 2

Información ética de investigación del proyecto

De acuerdo al documento elaborado por la Oficina NIH (66) acerca de la protección de los participantes humanos en la investigación: “Las investigaciones con especímenes o información privada codificada no involucran a sujetos humanos si: 1- la información privada o los especímenes no se recopilaron específicamente para la investigación propuesta actualmente mediante una interacción o intervención con personas vivas y 2- los investigadores no pueden constatar fácilmente la identidad de los individuos a los cuales perteneces los especímenes o la información privada codificada”.

Dado que en el presente estudio no se trabajó con sujetos, sino con material biológico que ha sido extraído previamente con fines absolutamente diagnósticos y/o terapéuticos y que los datos de la historia clínica, al igual que los hallazgos de las muestras histopatológicas y los resultados de los estudios moleculares, fueron ingresados a una base de datos en forma codificada por caso para mantener la confidencialidad de la información y el anonimato del paciente, no ha sido necesaria la firma de un nuevo consentimiento informado para la realización de este protocolo. Así mismo debido a que los hallazgos que obtenidos en el presente proyecto no implicarían variación en el pronóstico del paciente ni en su futuro tratamiento no se requiere realizar una devolución de los resultados del mismo a los pacientes cuyos casos fueron incluidos en el estudio.