



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio de la Actividad Neuronal de la Corteza
Auditiva en un Modelo Animal de Enfermedad
Mental con Displasia Cortical**

D. Ricardo Robles Martínez

2017



**UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NEURONAL DE LA CORTEZA
AUDITIVA EN UN MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD
MENTAL CON DISPLASIA CORTICAL**

Director:

Prof. Dr. D. Salvador Martínez Pérez

Ricardo Robles Martínez

2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Salvador Martínez Pérez, Catedrático de Universidad del Área de Anatomía y Embriología humana en el Departamento de Histología y Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández de Elche, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio de la actividad neuronal de la corteza auditiva en un modelo animal de enfermedad mental con displasia cortical", realizada por D. Ricardo Robles Martínez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En San Juan de Alicante, a 23 de Junio de 2017.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "S. Martínez Pérez".

Mod:T-20



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Paloma Moral de Calatrava, Profesor Titular de Universidad del Área de Enfermería en el Departamento de Enfermería, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio de la actividad neuronal de la corteza auditiva en un modelo animal de enfermedad mental con displasia cortical", realizada por D. Ricardo Robles Martínez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 23 de junio de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Robles", enclosed within a circular scribble.

Mod:T-20

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no habría sido posible sin el apoyo fundamental de una serie de personas a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

En primer lugar al Profesor Salvador Martínez, motor fundamental de esta tesis doctoral, por haberme dado la oportunidad de trabajar junto a él y conocerle personalmente. Su entusiasmo, dedicación y experiencia internacional en esta área son admirables.

Al equipo de laboratorio, por aceptarme como uno más de su grupo con amabilidad los días trabajé con ellos y por la ayuda prestada en todo momento. Formáis un equipo envidiable, con una experiencia internacional contrastada.

Al Doctor Parrilla, que como Profesor durante la carrera fue un ejemplo para mí y porque cada vez que me entrevisté con él supuso un estímulo de trabajo e investigación.

Al Profesor Toledo, que durante la rotación por el Servicio de Psiquiatría del HCUVA despertó en mí la vocación por esta profesión.

A todos mis compañeros en estos años de trabajo, desde mis inicios en Zaragoza, mis rotaciones por Murcia y Buenos Aires y mi actual lugar de trabajo, Cartagena. De todos y cada uno de vosotros guardo un grato recuerdo.

A los pacientes, que día a día despiertan en mí el deseo de mejorar y ampliar conocimientos con el fin de servirles de la mejor forma posible.

A mis padres, porque siempre han estado a mi lado, y lo han dado todo por sus hijos. A mi madre, por todo su apoyo y dedicación hacia su familia, eres única. A mi padre, por despertar en mí el deseo de ayudar a los pacientes, sabes que sin tí este trabajo no sería posible.

A mis hermanos, por todo lo compartido hasta ahora y lo que vendrá. Estoy muy orgulloso de vosotros.

A mis sobrinos.

A María, mi pareja. Gracias por todo tu apoyo y comprensión en los momentos difíciles. Siempre tienes las palabras exactas para ayudarme a avanzar. Es imposible que encuentre mejor compañera de vida. Este trabajo también es tuyo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	13
ÍNDICE DE FIGURAS.....	14
I. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS	16
II. INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	18
II.1. ESQUIZOFRENIA.	19
II.1.1. CONCEPTO.	19
II.1.2. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA.....	20
II.1.3. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE ESQUIZOFRENIA.....	29
II.1.4. EPIDEMIOLOGÍA.	31
II.1.5. ETIOPATOGENIA.	32
II.2. CORTEZA CEREBRAL.	57
II.2.1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).....	57
II.2.2. CORTEZA CEREBRAL DE MAMÍFEROS.....	57
II.2.3. MALFORMACIONES DEL DESARROLLO CORTICAL.....	68
II.3. MODELO DE RATÓN CON MUTACIÓN EN <i>Lis1</i>.....	81
II.4. ALUCINACIONES AUDITIVAS COMO FENOTIPO ALTERNATIVO DE LA ESQUIZOFRENIA.....	83
III.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	85
III.1. HIPÓTESIS	86
III.2. OBJETIVOS DE LA TESIS.....	86
IV.- MATERIAL Y MÉTODO.....	87
IV.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN (RATONES MUTANTES <i>Lis1/sLis1</i>).....	88
IV.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.	89
IV.2.1. Estudio morfológico del encéfalo de mutantes heterocigóticos mediante técnicas de inmunohistoquímica y tinciones citoarquitectónicas tradicionales.	89
IV.2.2. Determinación de la expresión de c-fos como marcador de la actividad neuronal en la corteza auditiva, en condiciones normales. En ratones normales y ratones <i>Lis1/sLis1</i> en las mismas condiciones de ruido ambiental.....	96

IV.2.3. Estudio morfológico de la corteza auditiva de un cerebro humano diagnosticado de lisencefalia mediante genética molecular y con alteraciones estructurales características de la lisencefalia.	96
V.- RESULTADOS.	98
V.1. CORTEZA AUDITIVA DEL RATÓN MUTANTE Lis1/sLis1.	99
V.1.1. Localización de la corteza auditiva en el cerebro del ratón.	99
V.1.2. Descripción de la citoarquitectura de la corteza cerebral del ratón mutante Lis1/sLis1.	100
V.1.3. Inmunohistoquímica para demostrar las alteraciones de la distribución de las interneuronas en la corteza del ratón mutante Lis1/sLis1.	102
V.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA CORTEZA AUDITIVA DE RATONES MUTANTES Lis1/sLis1 EN CONDICIONES AMBIENTALES BASALES.	107
V.2.1. Determinación de la expresión c-fos en la corteza auditiva comparada con otras regiones corticales.	107
V.3. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES DE LA CORTEZA TEMPORAL EN UN CEREBRO HUMANO CON LISENCEFALIA TIPO I.	108
V.3.1. Descripción de la estructura en la corteza cerebral en el humano.	108
V.3.2. Correlación anatomo-funcional entre las alteraciones observadas en la corteza cerebral temporal entre el ratón mutante Lis1/sLis1 y el cerebro humano con lisencefalia tipo I.	118
VI.- DISCUSIÓN.	121
VI.1. LA CORTEZA AUDITIVA EN EL RATÓN Lis1/sLis1.	122
VI.1.1. Actividad basal de la corteza auditiva primaria del ratón mutante Lis1/sLis1.	125
VI.2. LA CORTEZA AUDITIVA HUMANA.	128
VI.3. ALUCINACIONES AUDITIVAS.	130
VII.- CONCLUSIONES.	132
VIII.- BIBLIOGRAFÍA.	134

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ABC.- Complejo avidina-biotina.
- BDNF.- Factor neutrófilo derivado del cerebro (Brain derived neutrophilic factor).
- BSA.- Suero fetal bovino.
- C-fos.- anticuerpo policlonal contra la proteína c-fos.
- CAD 67.- Carbamoxyl phosphate Synthetase.
- CB.- Calbindina.
- CDG.- Congenital Disorders of Glycosilación.
- COMT.- Catecol-O-metiltransferasa.
- CP.- Cortical Plate.
- CR.- Calretinina.
- DAB.- 3-3' diaminobencidina.
- DISC-1.- Disrupted in Schizophrenia 1.
- DISC-2.- Disrupted in Schizophrenia 2.
- DSM-5.- Manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales 5ª edición.
- FLNA.- Filamina A.
- GABA.- Ácido gammaaminobutírico.
- GAM.- Goat anti Mouse.
- GAR.- Goat anti Rabbit.
- GFP.- Green Fluorescent Protein.
- GRM3.- Glutamate Metabotropic Receptor 3.
- GSK-3.- Glucogen Synthase Kinase-3.
- GWAS.- Genome Wide-Association Studies
- HRP.- Peroxidasa biotinilada.
- IZ.- Intermediate zone.
- LIS1.- Lisencefalia 1.
- LSD.- Dietil amina del ácido lisérgico.
- MZ.- Marginal zone.
- NMDA.- N-metil-D-Aspartato.

NR61.- Neuroregulina 1.
P30.- ratón mutante de un mes de vida.
PAF.- Factor Activador de Plaquetas.
PAFR.- Receptor del Factor Activador de Plaquetas.
PBS.- Tampón Fosfato Salino.
PET.- Tomografía axial de positrones
PFA.- Paraformaldehído.
PNH.- Heterotopia Nodular Periventricular.
Pv.- Parvalbúmina.
RM.- Resonancia Magnética.
RMf.- Resonancia Magnética funcional.
RGS4.- Proteína G señalización 4.
SBH.- Heterotopia subcortical en banda.
sEPSCs.- spontaneous excitatory postsynaptics currents.
SNC.- Sistema nervioso central.
SPECT.- Tomografía computarizada de emisión monofotónica.
SVZ.- Subventricular Zone.
TAC.- Tomografía Axial Computerizada.
VZ.- Ventricular Zone.
WT.- Wild Type.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formas clínicas de la <i>dementia praecox</i> de Kraepelin	26
Tabla 2. Criterios de Schneider para el diagnóstico de esquizofrenia	28
Tabla 3. Estimaciones del riesgo relativo de esquizofrenia debido factores de riesgo genéticos.....	33
Tabla 4. Meta-análisis de ligamiento	45
Tabla 5. Resumen de los hallazgos más relevantes en los estudios GWAS en la esquizofrenia.	48
Tabla 6. Malformaciones de la migración neuronal.....	73
Tabla 7. Tipos de lisencefalia y genes involucrados	76
Tabla 8. Técnica inmunohistoquímica.....	93
Tabla 9. Tipo de fijador utilizado para cada anticuerpo.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías clave de la dopamina	38
Figura 2. Múltiples factores interactúan para dar lugar a una desregulación de la dopamina estriatal que altera la evaluación de los estímulos.....	40
Figura 3. Tubo neural: se observa la distribución radial de los progenitores neurales en la zona ventricular (neuroepitelio).....	59
Figura 4. Subregiones principales del neocórtex en desarrollo	60
Figura 5. Vías de migración de las neuronas.....	61
Figura 6. Reconstrucción tridimensional de neuronas	63
Figura 7. Capas transitorias de la corteza cerebral en formación.....	64
Figura 8. Efecto de la glicoproteína Reelina sobre las células migratorias.	66
Figura 9. Distribución de las distintas capas que forman el isocórtex y las células que componen cada una de las capas.....	67
Figura 10. Organización de la corteza cerebral en columnas cilíndricas interconectadas entre sí.....	68
Figura 11. Disposición en cuatro capas en la corteza agríca.....	69
Figura 12. Vías de señalización LIS1 y Reln para la migración neuronal.....	77
Figura 13. Mecanismo de acción de la PAF acetilhidrolasa.	79
Figura 14. Técnica inmunohistoquímica.	92
Figura 15. Localización de los marcadores de ADN genómico del gen Lis1.....	97
Figura 16. Áreas corticales del ratón.....	99
Figura 17. Citoarquitectura de la corteza auditiva del ratón WT y Lis1/sLis1, con tinción de Cresil violeta	101
Figura 18. Estudio microscópico de la corteza de ratón WT y la corteza del ratón Lis1/sLis1.....	104
Figura 19. Distribución de células GABAérgicas en la corteza auditiva.	105
Figura 20. Expresión de mGluR2 en la corteza de animales WT y Lis1/sLis1 de treinta días	

postnatales (P30).....	106
Figura 21. Distribución de neuronas activas de A1 en condiciones basales de ruido.	108
Figura 22. Encéfalo humano de paciente con síndrome de Miller-Dieker.	109
Figura 23. Estudio macroscópico de secciones transversales de encéfalo.	112
Figura 24. Estudio microscópico de la corteza en cerebro con síndrome de Miller-Dieker.	115
Figura 25. Distribución de interneuronas en las capas superficiales de corteza cerebral humana con síndrome de Miller-Dieker.....	117
Figura 26. Estudio cuantitativo y cualitativo de la distribución de neuronas en las capas superficiales de la corteza auditiva en el síndrome de Miller-Dieker.	119
Figura 27. Esquema explicativo de la alteración migratoria y la distribución de la glía radial en el ratón mutante Lis1/sLis1 (lado izquierdo) y el ratón WT (lado derecho).	123

I. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

Las alteraciones que tienen lugar durante la formación de la corteza cerebral, fundamentalmente en los procesos de neurogénesis, migración y maduración neuronal, son las responsables de muchas malformaciones cerebrales que se presentan en el ser humano⁽¹⁾. Estas alteraciones están causadas muchas veces por mutaciones en los genes que intervienen en el neurodesarrollo y que regulan estos procesos. En otras ocasiones, la dotación genética del individuo afectado presenta uno o varios polimorfismos (cambios de una o varias bases, que están presentes en más del 1% de la población) y que predisponen a padecer una enfermedad concreta, que se manifestará o no dependiendo de determinados factores ambientales.

Las alteraciones genéticas de las enfermedades mentales pueden ser debidas a mutaciones de los genes que intervienen en el neurodesarrollo, que provocan malformaciones cerebrales y la consiguiente enfermedad⁽²⁾. Pero también pueden ser polimorfismos que predisponen a padecer una determinada enfermedad cuya manifestación depende de ciertos factores ambientales⁽³⁻⁷⁾, una vez que estos sobrepasen los mecanismos adaptativos que mantienen una función dentro de los límites de la normalidad. Aunque desconocemos exactamente la patogenia de la esquizofrenia, varios estudios neuropatológicos y de neuroimagen han demostrado alteraciones morfológicas en la corteza frontal y temporal de los pacientes, compatibles con anomalías en los procesos de migración y crecimiento neuronal⁽⁸⁻¹⁰⁾. Por tanto, podemos suponer que en ambos procesos estén implicados genes relacionados con el desarrollo embrionario cuya alteración provoque fallos en los procesos de maduración del cerebro, aumentando el riesgo de desarrollar esquizofrenia⁽¹¹⁻¹³⁾. Algunos de los genes que intervienen en el desarrollo y que se han relacionado con estas patologías son Reelin⁽¹⁴⁻¹⁷⁾, DISC-1^(18, 19), y otros genes como Fyn, BDNF, dihidropirimidina-2, semaforina 3A, fibronectina, neurotrofina-3, GSK-3, etc⁽²⁰⁻²³⁾.

La proteína LIS1 desempeña una función importante en la migración neuronal durante la formación de la corteza cerebral, así como el fosfolípido PAF, por lo que es posible que LIS1, y el gen que codifica el receptor de PAF (PAFR), estén alterados de alguna manera en pacientes psicóticos⁽²⁴⁾.

II. INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

II.1. ESQUIZOFRENIA.

II.1.1. CONCEPTO.

El término esquizofrenia hace referencia a un trastorno del cerebro de etiología desconocida caracterizado por la presencia de síntomas positivos, síntomas negativos o de déficit, síntomas cognitivos y síntomas afectivos.

Afecta a más de 21 millones de personas en todo el mundo, suele comenzar antes de los 25 años, persiste durante toda la vida (curso crónico) y afecta a personas de todas las clases sociales, pudiendo causar una gran pérdida de calidad de vida tanto de los pacientes como de sus familiares. Constituye una de las diez primeras causas de discapacidad por enfermedad según la Organización Mundial de la Salud. Es un trastorno mental grave que ocasiona un elevado gasto económico, no solo en el tratamiento de la enfermedad (incluyendo medicamentos, servicios de rehabilitación, hospitales de día, centros de hospitalización, etc.), sino también lo que supone para el paciente (con gran padecimiento, pérdida de productividad e incluso mortalidad precoz), y sus familias (dependencia, el sufrimiento y la pérdida de productividad).

Si bien la esquizofrenia se analiza como si fuera una sola enfermedad, es probable que abarque un grupo de trastornos de etiologías heterogéneas y comprendan a pacientes con presentaciones clínicas, respuestas terapéuticas y evolución de la enfermedad variables. Es por ello que en ocasiones se define como un síndrome, como un grupo de esquizofrenias o, como se define en el actual Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales, quinta edición (DSM-5), como espectro de la esquizofrenia.

Otro hecho destacable es que el diagnóstico de esquizofrenia se basa exclusivamente en los antecedentes psiquiátricos y el examen del estado mental. En la actualidad no existe ningún test de laboratorio, de imagen, genético, etc., para diagnosticar la esquizofrenia.

II.1.2. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA.

La historia de la esquizofrenia es la historia de la 'locura' y de la psiquiatría, una historia que surge con la pretensión de reunir bajo una misma entidad clínica historias particulares. Desde las civilizaciones primitivas, durante muchos siglos, los trastornos mentales en general y los síntomas de la esquizofrenia en particular, fueron considerados como posesiones demoníacas, lo que conllevó a la marginación de los pacientes en la sociedad, siendo sometidos a torturas, abandono y aislamiento social. En ocasiones sufrieron incluso linchamientos.

Las primeras conjeturas que se tienen sobre enfermedad mental provienen de la prehistoria, con el descubrimiento de cráneos trepanados. Se ignoran los motivos exactos de estas trepanaciones, pero se piensa que podrían obedecer a comportamientos ritualistas mágico-religiosos⁽²⁵⁾, como la expulsión del 'demonio' del interior del sujeto. También podría haberse empleado como un procedimiento terapéutico⁽²⁶⁾.

Sin embargo, los primeros textos de los que se tiene constancia de la enfermedad mental provienen del antiguo Egipto. El Papiro de Ebers (alrededor del 1550 a. C.) contiene un 'tratado del corazón', donde hay un capítulo sobre los desórdenes mentales, proporcionando una descripción de síntomas que recuerdan a la depresión, a la demencia y a la esquizofrenia⁽²⁷⁾, siempre con un trasfondo mágico en el origen de estos.

El desconocimiento del origen de la 'locura' llevó durante mucho tiempo a buscar consuelo y respuestas en lo sobrenatural, como puede ser la ira de Dios, o de los Dioses, la influencia de las estrellas mal alineadas o en la bendición divina. Ya en muchos pasajes del Antiguo y del Nuevo Testamento de la Biblia se observan referencias a la locura. También Sócrates (470 - 399 a. C.), en el Fedro de Platón, decía: "*nuestras mayores bendiciones nos llegan por la vía de la locura, en los casos en los que la locura se nos otorga por regalo divino*"⁽²⁸⁾.

En la época *grecorromana* (período comprendido entre el s. V a. C. hasta el s. V d. C.), Hipócrates (460-370 a. C.) en la teoría de los humores daba una visión de la 'locura'

distinta, atribuyendo sus raíces naturales a los trastornos del cuerpo⁽²⁸⁾, concepto que se mantuvo hasta finales del siglo XVIII. Galeno de Pérgamo (131-201 d. C.), médico griego, contribuyó al mantenimiento de esta teoría de los humores con leves aportaciones. Consideraba que el cuerpo era un sistema de elementos relacionados entre sí (sangre, flema, bilis amarilla y bilis negra) y que la pérdida del equilibrio entre los humores daba lugar a las enfermedades, siendo la tarea del médico la de localizar el desequilibrio para reajustar el estado interno del paciente⁽²⁸⁾. Mientras que Aristóteles (384-322 a. C.) situaba la sede de las emociones y de la actividad mental en el corazón, los textos hipocráticos establecieron el origen de éstos en el cerebro. Por ejemplo, la bilis amarilla estaría en exceso en la manía, mientras que la bilis negra se encontraría en cantidades excesivas en la melancolía⁽²⁸⁾.

Durante la *Edad Media* (entre el s. V y s. XV), el modelo imperante en occidente residía en el origen sobrenatural de la enfermedad mental, variando la actitud hacia los enfermos entre el rechazo y la tolerancia (más bien el primero que el segundo). La brujería constituyó un fenómeno típico de la Edad Media perseguida por la inquisición. Era la religión cristiana, por lo tanto, quien asumió la necesidad de explicar la enfermedad mental⁽²⁸⁾. Aparecen en el s. XIII conventos y monasterios para enfermos mentales, especialmente destinados a su acogida, que estaban regidos por la Iglesia y donde se aplicaban exorcismos como base del conocimiento. Se oraba por el paciente, tratando de determinar si sus conductas estaban al servicio de Cristo o de Satán⁽²⁹⁾ y se le daba al paciente un trato respetuoso y adecuado. La idea era recluir al 'loco furioso' para evitar el daño físico que pudiera producirle a los sanos en sociedad. En el siglo XIV, existían, más que verdaderos manicomios, grandes centros de reclusión de enfermos mentales que seguían a cargo de las organizaciones religiosas⁽²⁸⁾. En Valencia, en 1409, se crea el primer hospital psiquiátrico de Europa por el sacerdote Fray Juan Gilbert Jofré (1350-1417), quien consideraba que se internaba al enfermo para que no se le infringiera daño⁽³⁰⁾.

El *Renacimiento* (s. XV – s. XVI) se convierte en una de las peores épocas de la historia de la psiquiatría, debido al endurecimiento del trato a estos enfermos por las consideraciones que se tenían de la 'locura' por parte de la religión, especialmente tras

la bula papal de Inocencio VIII '*Summis desiderantes affectibus*' (*deseando con la más profunda ansiedad*, en su traducción al español), en 1484, y debido a los dominicos Heinrich Kramer y Jacob Sprenger, tras la publicación de su libro '*Malleus maleficarum*' (*el martillo de las brujas*) en 1487, donde se orientaba hacia la detección, examen y condena de brujas, las cuales solían acabar quemadas en la hoguera tras aplicarles un severo castigo⁽³¹⁾. Se empieza a tratar al enfermo como culpable de estar endemoniado o de brujería, torturándolos y ajusticiándolos como forma de restaurar el 'pacto' con Dios⁽³²⁾.

Aún así, aparecen figuras contrarias a la época como la de Juan Luis Vives (1492-1540), que ha sido considerado como uno de los precursores de la psiquiatría, quien plantea en su libro '*El alivio de los pobres*' (1526), el encierro de los 'locos' como aplicación de un proceso terapéutico⁽³²⁾.

También hay que considerar a Johann Weyer (1516-1588) por el ataque que realiza hacia la demonización del paciente que se producía en la época. En su libro '*De Praestigiis Daemonum*' (*La superchería de los demonios*, 1563), Weyer realiza una condena hacia la concepción mágica del enfermo mental, defendiendo la intervención de la medicina en los casos de acusación de brujería⁽³²⁾.

En el *Barroco* (finales del s. XVI a principios del s. XVIII), el método científico se iba afianzando en la mayoría de las ciencias, sin embargo, la psiquiatría no presentó grandes cambios. Aún así cabe destacar en esta época las figuras de Thomas Willis (1621-1675) y de Thomas Sydenham (1624-1689), quienes consideraban que el trastorno de la histeria no estaba en el útero sino en la cabeza, o William Cullen (1710-1790), el cuál desarrolló el término de neurosis⁽³³⁾.

En el siglo XVIII y siglo XIX, periodos que incluyen la *Ilustración*, el *Romanticismo* y el *Positivismo Naturalista*, se empieza a mantener una actitud científica frente a la 'locura', a diferencia de lo que había ocurrido en estos más de mil años previos, aceptándose el predominio de la razón sobre la tradición y la fe. A través de la aplicación de la razón como instrumento para intentar mejorar en todos los ámbitos de la vida, se inicia a finales del siglo XVIII la reforma de la asistencia psiquiátrica, mejorando las

condiciones de los enfermos ingresados y la instauración del *`tratamiento moral`*⁽³⁴⁾, considerando a Vincenzo Chiarugi, William Tuke y a Philippe Pinel como los pioneros más importantes de este movimiento⁽³⁴⁾.

Se establece así el nacimiento de la psiquiatría científica, alrededor del año 1800, con el considerado *`fundador de la psiquiatría`*, Philippe Pinel (1745- 1826), que se dedicó al estudio y tratamiento de las enfermedades mentales, señalando la necesidad de alejarse de toda especulación y la importancia de atender a los datos de la observación de hechos y fenómenos perceptibles de la enfermedad⁽³³⁾, como instrumento de la clínica médica. En 1793 es nombrado director del Hospital de la Bicêtre, y poco después se ocupó de la Salpêtrière, en Francia, donde liberó a los pacientes de los grilletes de hierro y del castigo corporal, mostrando así su rechazo a la dureza y crueldad del pasado⁽²⁸⁾, permitiéndoles moverse libremente. Este autor cobra importancia ya que dio la primera descripción integral de la esquizofrenia, en 1801, utilizando el término *`Demence`* para caracterizar el deterioro de las capacidades mentales de pacientes hospitalizados con enfermedades crónicas⁽³⁵⁾, aunque no lo realizó con la intención de categorizar ni definir una nueva enfermedad, ni definió los rasgos característicos de ésta.

Es a partir del siglo XIX cuando se producen verdaderos avances psicopatológicos y fenomenológicos que van aproximando poco a poco hacia la concepción de la esquizofrenia como entidad clínica propia. Bénédict A. Morel (1809-1873) establece el término *"démence précoce"* en sus dos obras fundamentales, como son *`Etudes Cliniques I y II`* (1853)⁽³⁶⁾ y *`Traité des Maladies Mentales`* (1860)⁽³⁷⁾. Aunque reconoció algunos de los rasgos característicos de la enfermedad, este autor no dio una entidad clínica a esta definición, sino que utilizó el término de demencia precoz para describir cuadros de alteraciones del estado mental y del comportamiento en pacientes jóvenes que presentaban un estado de incompetencia social, siendo una característica necesaria para el autor la condición de transmisión hereditaria en cuatro generaciones consecutivas en la familia^(38, 39). En 1853 realizó una descripción sintomatológica en referencia a un paciente sin llegar a introducir el término como tal, documentando *"el caso de un joven que desarrolló preocupaciones religiosas, delirios y excitación"*

alucinatoria, y después contracciones musculares generalizadas. Se mantuvo en estado de estupor durante meses, permaneciendo en posturas corporales extrañas; no respondía preguntas y estaba doblemente incontinente. Siguió carente de iniciativa y mostró una conducta automática⁽⁴⁰⁾.

Otros autores, como Ewald Hecker (1843-1909), y Karl Kahlbaum (1828-1899), describieron diversos trastornos de naturaleza desconocida, que afectaban a pacientes jóvenes y que a menudo progresaban a un trastorno crónico. En 1871, Ewald Hecker había escrito sobre el comportamiento de los pacientes con lo que llamó *hebefrenia*, describiéndola como una enfermedad de comienzo en la pubertad, entrando en un conflicto de pensamientos y sensaciones que expresa con un cambio de actitud y comportamiento que marca a la persona, dejando una huella imborrable y arrastrando un importante deterioro⁽⁴¹⁾. Mientras, en 1874, Karl Kahlbaum (1828-1899) describió los síntomas de la *catatonía*, considerándola como una enfermedad cerebral con un curso cíclico alternante, en el que los síntomas mentales son melancolía, manía, estupor, confusión y eventualmente demencia⁽⁴²⁾. Este autor realizó, junto a Ewald Hecker, un gran esfuerzo en el intento de clasificación de las enfermedades mentales, intentando dar una entidad propia a estas, criticando a anteriores autores por la falta de rigor de sus investigaciones⁽⁴³⁾. Estos términos se han reconocido en la actualidad como subtipos de esquizofrenia.

Es a partir de finales del s. XIX y principios del s. XX, a través de las aportaciones realizadas por Emil Kraepelin, Eugen Bleuler y Kurt Schneider, cuando se comenzó a considerar el concepto de esquizofrenia y sus manifestaciones como entidad clínica.

Emil Kraepelin (1856-1926), integró diversos cuadros clínicos descritos previamente (recordemos a Morel, Kahlbaum, Hecker, etc) en una sola entidad nosológica bajo el nombre de "*demencia precoz*"⁽⁴⁴⁾, confiriéndole unidad y extensión por sí sola. Considerado como el 'padre de la psiquiatría moderna', Kraepelin, actualizó el término "*démence précoce*" de Morel a "*dementia praecox*" (1893), poniendo el acento en el proceso cognitivo definido (*demencia*) y comienzo temprano (*praecox*) del trastorno, describiendo a pacientes jóvenes con evolución deteriorante prolongada y con síntomas clínicos frecuentes de alucinaciones y delirios⁽⁴⁴⁾.

Kraepelin incluyó ciertas entidades clínicas en la construcción de la 'demencia precoz', y separó las principales enfermedades psicóticas en dos grandes categorías: la 'demencia precoz' y la 'psicosis maniaco-depresiva'⁽⁴⁴⁾ (caracterizada por episodios definidos de enfermedad que alternaban con periodos de funcionamiento normal). Recientemente, Assen Jablensky⁽⁴⁴⁾ resume las formas clínicas que incluyó Kraepelin en su definición de la Demencia Precoz (Tabla 1):

Clínica	Descripción
Demencia Precoz Simple	Empobrecimiento y devastación de toda la vida psíquica, que se realiza de manera bastante imperceptible.
Hebefrenia	Cambio insidioso de la personalidad con un afecto superficial caprichoso, comportamiento insensato e incoherente, pobreza de pensamiento, alucinaciones ocasionales y delirios fragmentarios, progresando a demencia profunda.
Demencia Precoz Depresiva (forma simple y delirante)	Estado inicial de depresión seguida de un deterioro cognitivo lentamente progresivo, y abulia, con o sin delirios de persecución o hipocondríacos.
Demencia Precoz Circular	Depresión prodrómica seguida por un inicio gradual de las alucinaciones auditivas, delirios, fluctuaciones marcadas del estado de ánimo e impulsividad sin objeto.
Demencia Precoz Aguda	La aparición aguda del cuadro, la perplejidad o exaltación de la conducta, alucinaciones multimodales, delirios fantásticos.
Demencia Precoz Periódica	Episodios agudos y breves recurrentes de excitación confusa con remisiones.
Catatonia	"La conjunción de la excitación con el estupor catatónico domina el cuadro clínico", pero los fenómenos catatónicos ocurren con frecuencia en presentaciones totalmente diferentes de demencia precoz.
Demencia paranoide (forma leve y grave)	Los síntomas esenciales son los delirios y las alucinaciones. La forma grave resulta en una "desintegración peculiar de la vida psíquica", que implica especialmente trastornos emocionales y de la voluntad. La forma leve tiene una lenta evolución con "debilidad mental paranoide o alucinatoria", que "hace que sea posible para el paciente, durante mucho tiempo, vivir como un individuo aparentemente sano"
Esquizofasia (discurso confusional, demencia precoz)	Casos que cumplen con la descripción general de la demencia precoz pero que resultan en un estado final de "trastorno de expresión inusualmente sorprendente en el habla, con relativamente poco deterioro de las actividades psíquicas restantes"

Tabla 1. Formas clínicas de la *dementia praecox* de Kraepelin. Tomada de Jablensky, 2010⁽⁴⁴⁾.

Finalmente, a principio del siglo XX, fue Eugen Bleuler (1857-1939) quien acuñó por primera vez el término de `esquizofrenia`, en su obra magna “*demencia precoz o el grupo de esquizofrenias*” (1911), donde ponía de relieve las escisiones entre el pensamiento, las emociones y el comportamiento que observó en estos pacientes. Destacó que, a diferencia del concepto de Kraepelin de `dementia praecox`, la esquizofrenia no necesariamente tiene una evolución deteriorante⁽⁴⁵⁾, además de no estar de acuerdo con este autor en dos aspectos: no siempre surgen casos de demencia precoz en la adolescencia (precoz); ni tampoco siempre progresan a embotamiento intelectual (demencia)⁽⁴⁶⁾, por lo que buscó un nuevo término que explicase mejor las características de este cuadro. Bleuler concedió así más importancia a la escisión de la personalidad en estos pacientes⁽⁴⁶⁾.

Con el término “*esquizofrenia*” intentó designar a un grupo de psicosis, cuyo curso definió como crónico en ocasiones y como ataques intermitentes en otras, pudiendo detenerse o retroceder en cualquier etapa, pero sin permitir una completa recuperación. Identificó los síntomas de la enfermedad, dividiéndolos en fundamentales (primarios) y accesorios (secundarios)⁽³⁵⁾. Consideró como *síntomas accesorios* las alucinaciones, los delirios, la catatonia, la somatización y cambios en el habla y en la escritura; y, como *síntomas fundamentales* estableció alteraciones en las siguientes esferas psíquicas, las llamadas cuatro “a”^(44, 46):

- Asociaciones: hay una pérdida de la capacidad de asociación de ideas, volviéndose el pensamiento ilógico, y en ocasiones extraño. Por lo general hay una marcada escasez de ideas, y con frecuencia una idea domina el hilo del pensamiento, llegando al bloqueo. Un alto grado de alteración asociativa podrá resultar en estados de confusión⁽⁴⁶⁾.

- Aplanamiento afectivo: pacientes esquizofrénicos, en etapas posteriores de la enfermedad, dejan de mostrar cualquier afecto. Permanecen con rostros inexpresivos, con indiferencia. Refería que en las formas crónicas de esquizofrenia, el deterioro emocional está en la vanguardia del cuadro clínico⁽⁴⁶⁾

- Autismo: refiere que los esquizofrénicos más severos, viven en un mundo

propio, sin contacto con el exterior. Llamó así a este desprendimiento de la realidad, junto con el predominio relativo y absoluto de la vida interior⁽⁴⁶⁾.

- **Ambivalencia**: la presenta como una consecuencia inmediata de la perturbación de la asociación de ideas, estando presente desde los casos más leves⁽⁴⁶⁾.

Posteriormente, Kurt Schneider (1887-1967) contribuyó a describir las manifestaciones clínicas para el diagnóstico de esquizofrenia, sin hacer ninguna referencia a su evolución y pronóstico. Describió los síntomas de primer rango, que aunque no eran específicos de esquizofrenia y no siempre se daban, sí que los consideraba útiles para su diagnóstico. También describió los síntomas de segundo grado⁽⁴⁵⁾, cambiando la jerarquía e importancia entre los síntomas fundamentales y accesorios que propuso Bleuler.

Criterios de Schneider para diagnosticar la esquizofrenia	
Síntomas de primer orden	Síntomas de segundo orden
<ul style="list-style-type: none"> - Pensamientos audibles. - Voces que debaten o discuten, o ambos. - Voces que comentan. - Experiencias somáticas de pasividad. - Robo del pensamiento y otras experiencias de pensamiento sometido a influencias. - Transmisión del pensamiento. - Percepciones delirantes. - Todas las experiencias que impliquen volición, afecto e impulsos mecánicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ocurrencia delirante. - Perplejidad. - Empobrecimiento efectivo. - Distimias. - Engaños sensoriales.

Tabla 2. Criterios de Schneider para el diagnóstico de esquizofrenia. Tomada del libro Kaplan & Sadock, Sinopsis de psiquiatría, 2008⁽⁴⁷⁾.

Otros autores importantes a destacar a finales del siglo XX, que propusieron una

distinción en la esquizofrenia entre síntomas positivos y negativos, fueron Timothy J. Crow (1980) y Andreasen y Olsen (1982)⁽⁴⁴⁾. En 1980, Crow^(44, 48) propuso una simple subclasificación de la esquizofrenia, sobre la base del predominio de la sintomatología positiva o negativa, como sustitución de los síntomas propuestos por Kraepelin y Bleuler:

- Esquizofrenia tipo I (positiva): caracterizada por delirios, alucinaciones y desorganización formal del pensamiento, haciendo alusión a un origen neurobiológico.

- Esquizofrenia tipo II (negativa): predominan el empobrecimiento, aislamiento social, abulia, embotamiento afectivo y pobreza en el pensamiento que atribuyó como secundaria a lesiones cerebrales durante el embarazo y lesiones perinatales con mayor tendencia a la evolución defectual.

Por otro lado, en 1982, Andreasen y Olsen⁽⁴⁹⁾ desarrollaron unos criterios para dividir el síndrome esquizofrénico en tres subtipos: la esquizofrenia con síntomas positivos, con síntomas negativos y, a diferencia del modelo anterior de Crow, la mezcla de estos síntomas positivos y negativos en un mismo sujeto.

En 1952, la Asociación Americana de Psiquiatría (*American Psychiatric Association, APA*) publicó la primera edición del *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales*, con el fin de aunar criterios y poseer un lenguaje común clasificatorio, sustituyendo los síntomas por unos criterios diagnósticos, tanto transversales como longitudinales de la patología que se describe⁽⁵⁰⁾. Desde entonces se han publicado cinco ediciones de este manual, la última DSM-5 publicado en 2013.

II.1.3. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE ESQUIZOFRENIA.

En la clasificación actual del DSM-5⁽⁵¹⁾, se proponen los siguientes criterios para el diagnóstico de esquizofrenia:

"A. Cuando existen dos o más de los síntomas siguientes, cada uno de ellos presente durante una parte significativa de tiempo durante un período de un mes (o menos, si se trató con éxito). Al menos uno de ellos ha de ser (1), (2) o (3):

1. *Delirios.*

2. *Alucinaciones.*

3. *Discurso desorganizado (p. ej., disgregación o incoherencia frecuente).*

4. *Comportamiento muy desorganizado o catatónico.*

5. *Síntomas negativos (es decir, expresión emotiva disminuida o abulia).*

B. Durante una parte significativa del tiempo desde el inicio del trastorno, el nivel de funcionamiento en uno o más ámbitos principales, como el trabajo, las relaciones interpersonales o el cuidado personal, está muy por debajo del nivel alcanzado antes del inicio (o cuando comienza en la infancia o adolescencia, fracasa la consecución del nivel esperado de funcionamiento interpersonal, académico o laboral).

C. Los signos continuos del trastorno persisten durante un mínimo de 6 meses. Este período de 6 meses ha de incluir al menos 1 mes de síntomas (o menos si se trató con éxito) que cumplan el Criterio A (es decir, síntomas de fase activa) y puede incluir períodos de síntomas prodrómicos o residuales. Durante estos períodos prodrómicos o residuales, los signos del trastorno se pueden manifestar únicamente por síntomas negativos o por dos o más síntomas enumerados del Criterio A, presentes de forma atenuada (p. ej., creencias extrañas, experiencias perceptivas inhabituales).

D. Se han descartado el trastorno esquizoafectivo y trastorno depresivo o bipolar con características psicóticas porque: 1) no se han producido episodios maníacos o depresivos mayores de forma concurrente con los síntomas de la fase activa; o 2) si se han producido episodios del estado de ánimo durante los síntomas de la fase activa, han estado presentes sólo durante una mínima parte de la duración total de los periodos activo y residual de la enfermedad.

E. El trastorno no se puede atribuir a los efectos fisiológicos de una sustancia (por ej., una droga o medicamento) o a otra afección médica.

F. Si existen antecedentes de un trastorno del espectro autista o de un

trastorno de la comunicación de inicio en la infancia, el diagnóstico adicional de esquizofrenia sólo se hace si los delirios o alucinaciones notables, además de los otros síntomas requeridos para la esquizofrenia, también están presentes un mínimo de un mes (o menos si se trató con éxito)."

Además de estos criterios, el DSM-5 incluye unos especificadores sobre curso, síntomas y gravedad, con el objetivo de detallar más el diagnóstico del paciente.

II.1.4. EPIDEMIOLOGÍA.

Incidencia y prevalencia. En diferentes estudios de revisión epidemiológica, la tasa de incidencia media se ha calculado alrededor de 15.2 personas por cada 100,000 habitantes/año⁽⁵²⁻⁵⁴⁾.

Saha et al., (2005)⁽⁵²⁾ realizó una revisión sistemática de 188 estudios de 46 países donde calculó la prevalencia de la esquizofrenia⁽⁵³⁾. Basándose en los 21 estudios sobre prevalencia punto, obtuvieron una estimación de la mediana de 0,46 por cada 100 personas con estimaciones del intervalo de confianza que oscilaban entre el 0,19% y el 1%.

En una revisión sistemática en la literatura de la prevalencia en esquizofrenia entre los años 1990 y 2013, Simeone et al., (2015)⁽⁵⁴⁾ concluyó que la estimación de la mediana de prevalencia vida era de 0,48 por 100 habitantes con un intervalo de confianza de 0,34%-0,85%.

Los distintos rangos descritos se atribuyen, en general, a diferencias en las técnicas de muestreo y de diseño en los distintos estudios, pero globalmente se consideran que presentan un grado razonable de convergencia⁽³³⁾.

Mortalidad y Morbilidad. La esquizofrenia se asocia con un aumento en las tasas de mortalidad, en una proporción que llega a ser entre dos o tres veces mayor que en la población general. El aumento de mortalidad se relaciona, por una parte, con el mayor riesgo de suicidio (en particular en pacientes jóvenes) y por otra con las muertes

violentas, mortalidad natural, principalmente las enfermedades cardiovasculares y el uso de antipsicóticos y polifarmacia⁽⁵⁵⁾. Según un estudio de Rössler et al., (2005) la esperanza de vida se reduciría en aproximadamente 10 años, sobre todo como consecuencia de suicidio⁽⁵⁶⁾. La incidencia de suicidio en los pacientes esquizofrénicos estaría incrementada en un 5% con respecto al resto de la población⁽⁵⁷⁾.

En cuanto a las muertes de origen natural, la principal causa son las muertes por enfermedad cardiovascular, pudiendo atribuirse a un aumento del riesgo de los factores de riesgo de enfermedad coronaria, como sería la obesidad, el tabaquismo, la diabetes, la hipertensión y la dislipidemia⁽⁵⁸⁾.

II.1.5. ETIOPATOGENIA.

II.1.5.1. FACTORES DE RIESGO.

En la esquizofrenia, son múltiples los factores que pueden influir en su origen. Por un lado, observamos una clara agregación familiar, que supone un importante porcentaje de la variabilidad en la aparición de la enfermedad, pero no es determinante por sí sola. Ello implica que otro porcentaje, también importante, estaría relacionado con factores no genéticos, como son los factores ambientales. Analizaremos los factores genéticos, la edad, sexo, embarazo, lactancia, puerperio y, finalmente, los factores ambientales.

a.) Factores genéticos.

Los factores genéticos son los factores de riesgo más claros en el desarrollo de esquizofrenia. En un meta-análisis realizado en el año 2003 sobre gemelos, se estimó en un 81%⁽⁵⁹⁾ el porcentaje de heredabilidad de la enfermedad. Como dijimos anteriormente, el riesgo de desarrollar la enfermedad se situaría entre el 0,34%-0,85%, mientras que en las familias de esquizofrénicos este porcentaje es mayor. Se ha visto, en estudios epidemiológicos genéticos, una asociación familiar que sugiere una mayor implicación genética en el origen de la enfermedad⁽⁶⁰⁾.

Factores genéticos	% de riesgo relativo de esquizofrenia
Familiares de tercer grado	2-3 %
Familiares de segundo grado	3-6 %
Familiares de primer grado o gemelos dicigóticos	9-18 %
Ambos padres esquizofrénicos	40-60 %
Gemelos monocigóticos	50-70 %

Tabla 3. Estimaciones del riesgo relativo de esquizofrenia debido factores de riesgo genéticos. Tomada de Tandon et al, 2008⁽⁵³⁾.

b.) Sexo y edad.

No se han observado diferencias significativas en cuanto a la prevalencia a lo largo de la vida entre sexos. Sin embargo, se ha observado una mayor tasa de incidencia de la esquizofrenia en hombres que en mujeres en edades jóvenes, siendo la proporción de 1,4⁽⁶¹⁾. En un metaanálisis realizado en 2003⁽⁶²⁾, se concluyó que el riesgo de incidencia de los hombres de desarrollar esquizofrenia en relación a las mujeres era de 1,39, considerando solo los 11 estudios de mayor calidad (los resultados de los demás estudios eran parecidos).

Hay que tener en cuenta para explicar estos resultados, las diferencias encontradas en cuanto al inicio de la enfermedad en hombres y mujeres. En un estudio realizado en 1989, se vio una diferencia significativa entre la edad del primer ingreso hospitalario entre hombres y mujeres, siendo la diferencia media de 5-6 años⁽⁶³⁾. En los hombres la edad de inicio de la enfermedad suele ser entre los 10 a los 25 años, mientras que en las mujeres suele ser entre los 25 a los 35 años⁽⁴⁵⁾. En las mujeres se ha visto que hay una distribución bimodal con un punto álgido durante la madurez.

Aproximadamente entre el 3-10% de las mujeres inician la enfermedad después de los 40 años⁽⁴⁵⁾. Estas diferencias llevaron a Häfner et al.⁽⁶⁴⁾, a realizar un estudio de investigación básica en ratones en el que sugerían, en base a sus resultados, que el estradiol podría actuar como un modulador de protección en la esquizofrenia mediante la mejora del umbral de vulnerabilidad para la psicosis a través de la regulación a la baja de la neurotransmisión dopaminérgica, influyendo en un inicio más tardío de la enfermedad en las mujeres, un curso clínico menos grave y pudiendo justificar el repunte en incidencia una vez desaparece tras la menopausia⁽³³⁾.

c.) Embarazo, parto y puerperio.

Edad de paternidad.- Una edad avanzada en la paternidad se asocia a un aumento de riesgo de padecer esquizofrenia en la descendencia⁽⁶⁵⁾. La edad del padre es un predictor de gran asociación y significativo de esquizofrenia, lo que podría estar en relación con la acumulación de errores de replicación en las líneas celulares de espermatogonias⁽⁶⁶⁾.

Infecciones y malnutrición.- En los estudios sobre exposiciones intrauterinas del feto a diferentes situaciones, como pueden ser las infecciones y las deficiencias nutricionales, se está viendo una importante asociación entre estos factores de riesgo y la aparición de esquizofrenia, en el que posiblemente las influencias del desarrollo neurológico en este periodo, estén jugando un papel determinante.

Las infecciones se consideran como factores de riesgo plausibles para la esquizofrenia, ya que son responsables de anomalías congénitas del cerebro, disfunción neurocognitiva y trastornos del comportamiento. En estudios de cohortes significativos sobre individuos nacidos en un periodo determinado de tiempo y en una región determinada se ha demostrado una correlación entre la exposición del feto y el aumento de riesgo de esquizofrenia en los recién nacidos, para patógenos como el virus de la Influenza, la rubeola, la toxoplasmosis, o el virus del herpes simple tipo 2⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾. Se sabe que en las infecciones maternas se produce un aumento del nivel de citoquinas por la estimulación de la respuesta que se produce en esta vía, por lo que podría estar en relación con el aumento de riesgo de desarrollar esquizofrenia⁽⁶⁷⁾.

En cuanto a la desnutrición, se visto que niveles bajos de ácido fólico puede provocar elevados niveles de homocisteína, que en el tercer trimestre puede ser un factor de riesgo para la esquizofrenia. Actuaría sobre el desarrollo de la función y estructura del cerebro, además de poder provocar un daño sutil en la vascularización de la placenta, comprometiendo la entrega de oxígeno al feto⁽⁷⁰⁾.

Los niveles bajos de vitamina D en la madre en gestación podría afectar al correcto desarrollo del cerebro del feto, aumentando el riesgo de desarrollo de esquizofrenia.

Se ha visto un aumento de riesgo de padecer esquizofrenia en inmigrantes de color de piel oscura en su migración a lugares con pocas horas de sol, lo que podría estar en relación con niveles bajos de vitamina D, siendo la luz solar la vía principal para mantener unos niveles adecuados⁽⁷¹⁾. La insuficiencia de vitamina D se relaciona con un aumento de riesgo de desarrollo de esquizofrenia en situaciones tales como vivir en un entorno urbano, el exceso de nacimientos de invierno, sobre todo en el hemisferio norte, y el exceso de nacimientos con esquizofrenia tras la hambruna materna⁽⁷²⁾. Los estudios con animales demuestran que en casos de una hipovitaminosis D transitoria en la etapa de embarazo del feto se asocia con la presencia de cambios persistentes en la función y estructura cerebral, incluyéndose una función dopaminérgica alterada⁽⁷³⁾.

Complicaciones obstétricas.- Se ha descrito que complicaciones obstétricas, como pueden ser las complicaciones durante el embarazo (diabetes, incompatibilidad del Rh, preeclampsia), las alteraciones en el desarrollo y crecimiento fetal (bajo peso al nacer, malformaciones congénitas) y las complicaciones del parto (hipoxia, cesárea de urgencia, atonía uterina), contribuyen a la susceptibilidad a la esquizofrenia⁽⁷⁴⁾.

d.) Factores ambientales.

Urbanidad.- En todos los estudios se ha visto una correlación entre vivir en zonas urbanas y aumento del riesgo de padecer esquizofrenia, en comparación con vivir en zonas rurales. Se ha visto que en la exposición desde la infancia puede existir una relación dosis-respuesta, además de la situación espacial dentro de la zona urbana, con un

aumento de riesgo en el centro de las ciudades, donde puede jugar un papel importante la densidad de población⁽⁷⁵⁾. Los factores sociales estresantes de las zonas urbanas podrían favorecer el desarrollo de la enfermedad en personas con riesgo.

Este aumento de riesgo se calcula en torno a dos o tres veces mayor que la población general. En un estudio en 2001, este riesgo era de 2,75 veces mayor de padecer esquizofrenia para individuos que vivieron los primeros 15 años de su vida en las zonas urbanas de máxima densidad poblacional⁽⁷⁶⁾.

Migración.- Para la esquizofrenia, se ha visto que una historia personal o familiar de la migración es un factor de riesgo importante. Este aumento de riesgo se ha visto que puede ser de hasta 2,9 veces mayor que la población general, siendo mayor para migrantes de segunda generación en comparación con los de primera generación⁽⁷⁷⁾. Esto podría estar influenciado por la experiencia negativa de ser excluidos del grupo mayoritario, lo que confirmaría las diferencias vistas entre la primera y la segunda generación de migrantes. Otros factores que podrían influir son, entre otros, el desempleo, el estado civil soltero o el analfabetismo⁽⁷⁸⁾.

Cannabis.- El mecanismo por el que el cannabis induce síntomas psicóticos es a través de su principal metabolito, el delta-9-tetrahidrocannabinol, que aumenta la liberación de dopamina en el núcleo accumbens y la corteza prefrontal, elevando las concentraciones de dopamina cerebral⁽⁴⁵⁾. El uso del cannabis se asocia a un inicio de esquizofrenia a una edad más temprana de lo que lo hace habitualmente⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾. Se ha visto que aumenta el riesgo de padecer la enfermedad en torno a 2 ó 3 veces más que el resto de la población^(53, 82), y que este factor de riesgo es independiente para el desarrollo de esquizofrenia, en relación directa con la cantidad y tiempo de consumo. Además, el uso de esta sustancia en pacientes ya diagnosticados de esquizofrenia, puede provocar una exacerbación de los síntomas que padece, provocar una recaída en el paciente estabilizado, hasta empeorar el curso de la enfermedad⁽⁸³⁾.

Todas estas situaciones son situaciones de riesgo muy inespecíficas y pueden

estar presentes en muchas otras enfermedades mentales y no mentales. La naturaleza de estos factores indica un proceso patológico en el desarrollo neurológico en la esquizofrenia pero se desconoce el mecanismo fisiopatológico asociado a estos factores de riesgo⁽⁴⁵⁾.

II.1.5.2. TEORÍAS ETIOPATOGÉNICAS.

La etiología de la esquizofrenia es desconocida y se piensa que tiene un origen multifactorial, como hemos visto hasta el momento, lo que nos hace difícil pensar en un único factor que sea capaz de desarrollarla⁽⁸⁴⁾.

Aunque no se conoce su etiología, en las últimas décadas se ha ampliado el conocimiento que se tiene sobre las bases biológicas, en base a los avances en neurociencias, la biología molecular y del estudio genético. A pesar de ello, en la actualidad, no se disponen de pruebas diagnósticos infalibles que permitan el diagnóstico seguro de la enfermedad, como tampoco se dispone de un tratamiento que sea una cura de ésta, aunque se han producido grandes avances en el perfil de los nuevos antipsicóticos en cuanto a reducción de los posibles secundarios y la biodisponibilidad de las moléculas. Vamos a describir a continuación algunas de las principales hipótesis etiológicas:

A.) Factores biológicos.

A.1) Hipótesis dopaminérgica.- Esta hipótesis ha sido la más estudiada y relacionada con la esquizofrenia. Surge desde que los primeros antipsicóticos, como la clorpromacina y la reserpina, demostraran el bloqueo de los receptores de la dopamina D2, mostrándose eficaces a la hora de controlar los síntomas positivos en la esquizofrenia. Desde entonces se mostró gran interés ante el hecho de que las alteraciones bioquímicas pudieran estar asociadas con la enfermedad.

Posteriormente, también se observó que el uso de sustancias con agonismo indirecto por la dopamina, como son las anfetaminas, podía inducir psicosis en pacientes sanos, y síntomas psicóticos en pacientes esquizofrénicos⁽⁸⁵⁾, por lo que sugirió como

causa de la esquizofrenia la alteración en la neurotransmisión de la dopamina.

La dopamina es un neurotransmisor ampliamente distribuido por el Sistema Nervioso Central, organizándose su actividad en 4 vías dopaminérgicas:

- Vía mesolímbica: se extiende desde el área tegmental ventral del mesencéfalo a la región límbica.

- Vía mesocortical: desde el área tegmental a la corteza frontal.

- Vía nigroestriatal: conecta la pars compacta de la sustancia negra con las dos porciones del cuerpo estriado.

- Vía infundibular: desde el hipotálamo a la hipófisis.

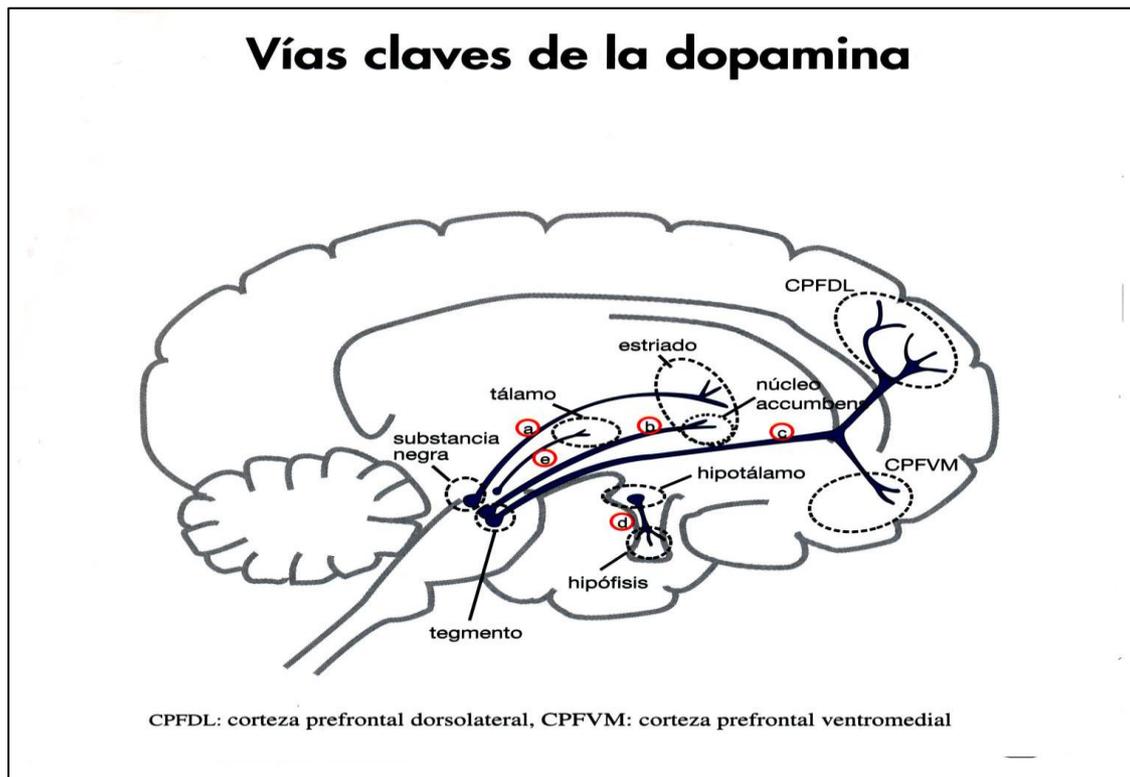


Figura 1. Vías clave de la dopamina. Tomada de Psicofarmacología Esencial, Stahl, 2014⁽⁸⁶⁾.

En un principio, la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia consistiría en una hiperactividad dopaminérgica, pero sin conocer si esto es debido a una liberación

elevada del neurotransmisor, a la presencia de un elevado número de receptores de dopamina o una hipersensibilidad de éstos, o una combinación de estos mecanismos. Esto explicaría la respuesta del tratamiento antipsicótico ante los síntomas positivos, a través de su bloqueo de receptores D₂, mientras que no se veía influencia sobre los síntomas negativos.

En 1991, Davis et al., proponen la hipótesis dopaminérgica revisada en la que la esquizofrenia se asociaría a una alteración en la transmisión dopaminérgica con un aumento de la función dopaminérgica subcortical en las proyecciones mesolímbicas (sobrestimulación de receptores D₂ responsable de la aparición de síntomas positivos), mientras que en la vía mesocortical existiría una disminución de la función dopaminérgica cortical (hipoestimulación de receptores D₁ en córtex frontal y la aparición de síntomas negativos y cognitivos)⁽⁸⁷⁾.

En 2009, Howes et al., proponen un nuevo modelo como hipótesis de la dopamina, en el que se produciría un aumento de dopamina presináptica en el estriado⁽⁸⁸⁾, influenciado por factores de riesgo genéticos y ambientales⁽⁸⁹⁾. A su vez, se ha visto que cambios en la neurotransmisión dopaminérgica estriatal pueden tener efectos secundarios en la corteza prefrontal⁽⁹⁰⁾, pudiendo contribuir a una disfunción cognitiva y a los síntomas negativos de la esquizofrenia.

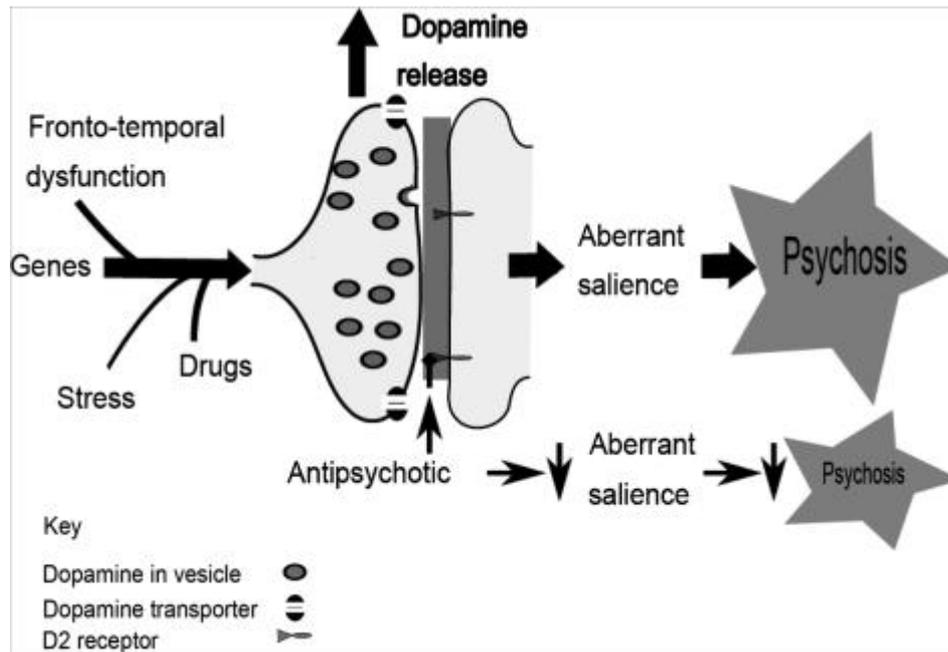


Figura 2. Múltiples factores interactúan para dar lugar a una desregulación de la dopamina estriatal que altera la evaluación de los estímulos. Tomada de Howes y Kapur, 2009.⁽⁸⁹⁾

Se podría afirmar que una alteración en la actividad dopaminérgica presináptica estaría relacionada con el comienzo de la enfermedad y se relacionaría con la aparición de psicosis, sin excluir la posibilidad de que un componente adicional estuviera relacionado con el riesgo de desarrollo de esquizofrenia⁽⁹¹⁾.

A.2) Hipótesis serotoninérgica.- Esta hipótesis nace con la descripción de los síntomas psicóticos que provocaba el uso de la dietilamina del ácido lisérgico⁽⁹²⁾ (LSD, en sus siglas en inglés; es un potente antagonista de la serotonina). Otro argumento de peso fue el descubrimiento de los antipsicóticos atípicos, como la clozapina, que ejercían un antagonismo a la serotonina con un poco de selectividad sobre el receptor de la dopamina D2⁽⁹³⁾, además de otros antipsicóticos de segunda generación, planteando inicialmente que el exceso de serotonina es la causa tanto de los síntomas positivos como negativos.

Estudios postmortem del líquido cefalorraquídeo y estudios de imagen de receptores y transportadores serotoninérgicos, realizados durante los últimos años, han sugerido una disfunción serotoninérgica en los pacientes esquizofrénicos⁽⁹⁴⁾.

Las hipótesis realizadas sobre la función de la serotonina en la enfermedad, sostienen una alteración en la interacción dopamina-serotonina. Según el balance dopamina y serotonina, la serotonina inhibe la función dopaminérgica en el área tegmental ventral, influyendo en la corteza y en el sistema límbico, reduciéndose así la sintomatología negativa⁽⁹⁴⁾.

A.3) Hipótesis glutaminérgica.- La clave de la relación entre el receptor del glutamato, tipo N -metil-D-aspartato (NMDA), y la esquizofrenia está en la similitud de la sintomatología en esta enfermedad, con la psicosis provocada por la fenciclidina (PCP), un antagonista no competitivo del receptor NMDA, que provoca el bloqueo de la neurotransmisión del glutamato⁽⁹⁵⁾. Además de los síntomas propios de la esquizofrenia, como los síntomas positivos, negativos y cognitivos⁽⁹⁶⁾, puede provocar otros síntomas, como los afectivos, la enfermedad de Alzheimer y los trastornos del espectro autista⁽⁹⁷⁾.

Hay evidencia farmacológica, genética y bioquímica sustancial para apoyar la hipofunción del receptor de NMDA como un componente etiológico clave de la esquizofrenia. Este déficit funcional del receptor NMDA, afecta predominantemente a las interneuronas y resulta en una pérdida de control inhibitorio GABAérgico sobre las células piramidales glutamatérgicas⁽⁹⁸⁾, provocando una hiperexcitación en las células piramidales de la corteza⁽⁹⁹⁾, lo que puede ocasionar la ruptura de la sincronización de la conectividad entre los conjuntos neuronales intracorticales y un aumento excesivo de descarga cortical sobre los centros subcorticales⁽¹⁰⁰⁾. Los datos de estudios clínicos, genéticos y de modelos animales implican fuertemente el receptor NMDA como un eje central para muchos de los procesos cerebrales patológicos que ocurren en la esquizofrenia. Los datos de los pacientes y los cerebros post mortem humanos también sugieren que el receptor del NMDA es hipofuncional en la esquizofrenia⁽¹⁰¹⁾.

A.4) Hipótesis GABAérgica.- Un factor importante dentro de la sintomatología de la esquizofrenia son los síntomas negativos y cognitivos que padece el paciente, siendo un factor determinante en la funcionalidad de éste⁽¹⁰²⁾. Se ha visto que los antipsicóticos

actuales no ofrecen unos resultados completos en este área⁽¹⁰³⁾, lo que lleva a plantearse la intervención de otros factores desencadenantes de la enfermedad.

La disfunción de la corteza prefrontal dorsolateral parece ser una característica central de la fisiopatología de la esquizofrenia y esta disfunción puede estar relacionada con alteraciones en el neurotransmisor ácido gamma aminobutírico (GABA)⁽¹⁰⁴⁾, siendo ampliamente corroborado en estudios postmortem de sujetos con esquizofrenia⁽¹⁰⁵⁾.

Se ha visto, en distintos estudios, un vínculo importante entre la transmisión GABA y las alteraciones cognitivas en la esquizofrenia, debido a una reducción de la transmisión inhibitoria GABA en la corteza prefrontal puede inducir diversas anomalías cognitivas y emocionales que se asemejan a los distintos síntomas de la enfermedad⁽¹⁰⁶⁾.

B.) Estudio de los genes relacionados.

En los estudios realizados hasta la fecha, se ha visto que la enfermedad tiene una base poligénica y heterogénica. En la esquizofrenia el riesgo de padecer la enfermedad no se explica por la alteración de un solo gen, por lo que es considerada una enfermedad compleja, donde la transmisión hereditaria no se ajusta a los modelos de herencia simple monogénica mendelianos.

Por lo tanto, se han propuesto dos modelos para tratar de entender la herencia genética de la esquizofrenia, y el desarrollo de esta, ajustándose a la segregación de la enfermedad en una familia: (1) por un lado, se cree que puede ser la consecuencia de la existencia de muchos polimorfismos en el individuo, con un efecto combinado entre ellos, generalmente bajo, lo que se conoce como "modelo de enfermedades comunes-variantes comunes"⁽¹⁰⁷⁾; (2) por el otro, tenemos el "modelo de enfermedades complejas-variantes raras", donde las variantes infrecuentes tendrían unos efectos relativamente más grandes, con una penetrancia más elevada^(108, 109). Sin embargo, aún no es posible saber qué modelo es el que impera en la enfermedad con los conocimientos actuales.

Existen ciertos factores, que de forma general, no solo en la esquizofrenia, sino

en las enfermedades complejas, pueden distorsionar las proporciones mendelianas, dificultando el análisis genético de la enfermedad, ya que pueden tomarse como afectado a individuos normales y viceversa. Estos factores podrían ser⁽³³⁾:

- Penetrancia incompleta: Proporción de individuos con un genotipo específico que expresan el fenotipo esperado. Es decir, el que un individuo tenga un alelo que predisponga una enfermedad, no significa que éste la vaya a desarrollar. Para ello sería necesario la intervención de otros factores, como puede ser los ambientales, edad, sexo..., factores ya vistos con anterioridad.

- Fenocopias: al contrario que la penetrancia incompleta, se observa cuando un individuo presenta la enfermedad sin presentar ningún alelo que determine susceptibilidad a padecerla, como puede pasar con el consumo de anfetaminas, que puede provocar una sintomatología parecida a la esquizofrenia.

- Heterogeneidad genética: parece tener un papel importante en la herencia de la esquizofrenia, y podría ser un factor importante en la dificultad de encontrar los genes implicados. Se puede observar que en diferentes grupos de personas con esquizofrenia van a presentar diferentes combinaciones de genes mutados y diferente exposición a factores ambientales, lo que puede explicar la falta de reproducibilidad de los resultados al estudiar diferentes poblaciones⁽¹¹⁰⁾.

- Origen poligénico: serían muchos los genes implicados en el origen de la enfermedad, necesitando de la presencia de mutaciones en todos ellos, donde se sumaría el efecto de cada uno de ellos para el desarrollo de un fenotipo concreto.

- Epigenética: serían los mecanismos que regulan la expresión génica sin alterar el código genético o secuencia de ADN. Intenta descubrir los mecanismos moleculares por los que los factores ambientales, las experiencias emocionales, sociales o cognitivas pueden modificar la expresión de los genes⁽¹¹¹⁾, lo que podría explicar que en gemelos monocigóticos, con la misma información genética, presenten un alto porcentaje de discordancia para la esquizofrenia⁽⁵³⁾.

Los principales hallazgos en genética molecular hasta el momento se han

realizado a través de diferentes técnicas de investigación, donde se están viendo grandes avances en los últimos años, en la búsqueda de genes implicados en la enfermedad. Sin embargo, si se está observando la presencia de genes que confieren una propensión de padecer esquizofrenia. Estos avances se están llevando a cabo a través de estudios de citogenética, estudios de ligamiento y estudios de asociación, que comentaremos a continuación:

B.1) Estudios de citogenética.- En un estudio realizado por Millar et al.⁽¹¹²⁾, en 1998, se evidencio la presencia de una traslación equilibrada entre el cromosoma 11 y el cromosoma 1((1; 11) (q42.1; q14.3)) en una familia escocesa, donde sus miembros tenían esquizofrenia. Se ha visto que esta mutación genética afecta a dos genes, el DISC1 y el DISC2 (disrupted in schizophrenia 1 y 2), asociados directamente con el desarrollo de esquizofrenia⁽¹¹³⁾.

Otra mutación genética, en este caso la delección de la región 22q11, también conocido como el síndrome de DiGeorge o el síndrome velocardiofacial, se asocia con un aumento del riesgo de padecer esquizofrenia⁽¹⁰⁹⁾, en torno a un 25%⁽¹¹⁴⁾.

B.2) Estudios de ligamiento.- Este tipo de estudios obtienen buenos resultados en la investigación de enfermedades mendelianas. En la esquizofrenia, se han realizado numerosas publicaciones sobre estudios de ligamiento, identificándose numerosos loci asociados en familias particulares pero con el problema posterior de no poder reproducirlo de manera significativa en estudios con otras familias. Para aumentar el poder de significación de estos, el meta-análisis puede lograr tamaños de muestra mucho más grandes que los estudios individuales, amplificando así la asociación con la enfermedad.

Van de Leemput, en 2016, recoge 3 meta-análisis de estudios de ligamiento⁽¹¹⁵⁾, los cuales veremos a continuación: Badner y Gershon, en 2002, publican un meta-análisis de sobre estudios de ligamiento genético en el trastorno bipolar y en la esquizofrenia, encontrando evidencia en los cromosomas 8p, 13q y 22q para esquizofrenia, y en los cromosomas 13q y 22q para trastorno bipolar⁽¹¹⁶⁾. En otro meta-análisis realizado por Lewis et al., en 2003, encontraron evidencia de ligamiento para

esquizofrenia en las regiones de los cromosomas 1q, 2p, 2q, 3p, 5q, 6p, 8p, 11q, 14p, 20q y 22q⁽¹¹⁷⁾. Por último, en el año 2009, Ng et al., realiza el meta-análisis en el que incluye más estudios de ligamiento, un total de 32, donde incluyó 3255 familias con 7413 casos con genotipo afectadas con esquizofrenia o trastornos relacionados. Este autor observó evidencia sugerente de vinculación con esquizofrenia, en mayor medida, en 2 regiones diferentes del cromosoma 2q, y en el cromosoma 5q. También se refiere a otros loci ligados a esquizofrenia, aunque con menos evidencia que los anteriores, en las regiones de los cromosomas 1, 2q, 3q, 4q, 5q, 8p y 10q, así como en el cromosoma 8p, aunque en este caso para poblaciones europeas⁽¹¹⁸⁾.

Estudios	Individuos Nº fa*/ Nº ind**	Cromosomas	Fenotipo
Badner y Gershon, 2002	681/1929	8p, 13q y 22q	Esquizofrenia y trastorno bipolar
Lewis et al., 2003	1208/2945	1q, 2p, 2q, 3p, 5q, 6p, 8p, 11q, 14p, 20q y 22q	Esquizofrenia
Ng et al., 2009	3255/7413	1, 2q, 3q, 4q, 5q, 8p y 10q	Esquizofrenia

*Nº fa: número de familias. **Nº ind: número de individuos.

Tabla 4. Meta-análisis de ligamiento. Tomada de van de Leemput J. et al⁽¹¹⁵⁾.

B.3) Estudios de asociación.- Estos estudios tienen una mayor resolución que los estudios de ligamiento, y una potencia suficiente para localizar variantes genéticas comunes entre los individuos. En los estudios de asociación, las regiones del genoma analizado son más pequeñas que en los estudios de ligamiento, lo que significa que los datos obtenidos se pueden utilizar para la evaluación de posibles genes candidatos, o las regiones genómicas únicamente⁽¹¹⁹⁾.

Uno de los métodos de asociación más utilizados es el de casos y controles, que se basan en la secuenciación en el ADN de un gen o genes sospechosos de estar implicado en la enfermedad, en personas enfermas (casos) y personas sanas (controles), buscando la mutación o mutaciones más frecuentes que aparezcan entre las personas enfermas. Al incluir casos y controles de una misma familia aumenta la posibilidad de detectar una mutación causante de la enfermedad, puesto que el número de diferencias en el ADN entre familiares es menor que entre personas no emparentadas.

Con las nuevas técnicas de secuenciación se ha podido pasar del estudio de determinados genes que pudieran causar la enfermedad, a estudios de asociación, donde se analiza todo el genoma humano. Se le conoce como Genome-Wide Association Studies (GWAS).

Por otra parte, los estudios de asociación pueden producir falsos positivos, debido a la gran cantidad de análisis que se realizan sobre el genoma, lo que puede llevar a sobrevalorar los resultados obtenidos⁽¹²⁰⁾. Para minimizar este resultado, es necesario aumentar el número de individuos en los estudios.

En un estudio realizado por Ariel Cariaga-Martínez et al. ⁽¹¹⁹⁾, en 2016, recogen información de los principales estudios de asociación a través de GWAS y se presentan en la tabla 5.

Nº de muestras esquizofrénicas	Genes de interés	Cromosoma / Locus	Referencias
320	<i>PLXNA2</i>	1q32.2	Mah et al., 2006 ⁽¹²¹⁾
158	<i>CSF2RA</i>	Xp22.32, Yp11.3	Lencz et al., 2007 ⁽¹²²⁾
479	<i>ZNF804A</i>	2q32.1	O'Donovan et al., 2008 ⁽¹²³⁾
660	<i>RELN</i>	7q22	Shifman et al., 2008 ⁽¹²⁴⁾
738	<i>AKT1, CSF2RA, IL3RA, PRODH, RGS4, ZDHHC8, la COMT, DAOA, DISC1, DRD3, DTNBP1, HTR2A, NRG1, PLXNA2, SLC6A4</i>	14q32.33, Xp22.33, 22q11.21, 1q23.3, 22q11.21, 13q33.2, 1q42.1, 3q13.3, 6p22.3, 13q14-q21, 8p12, 1q32.2, 17q11.2	Sullivan et al., 2008 ⁽¹²⁵⁾
574	<i>CCDC60</i>	12q24.23	Kirov et al., 2009 ⁽¹²⁶⁾
119	<i>JARID2</i>	6p23	Liu et al., 2009 ⁽¹²⁷⁾
900	<i>ADAMTSL3</i>	15q25.2	Need et al., 2009 ⁽¹²⁸⁾
3322	<i>MHC, MYO18B, ZNF804</i>	22, 6p, 22q11.2	Purcell et al., 2009 ⁽¹²⁹⁾
8008	<i>HIST1H2AG</i>	6p22.1	Shi et al., 2009 ⁽¹³⁰⁾ . Meta-análisis
2663	<i>región MHC, TCF4 NRG1</i>	6p21, 11q24, 18q21	Stefansson et al., 2009 ⁽¹³¹⁾
201	<i>PLAA, ACSM1, ANK3</i>	9p21, 16p12, 10q21	AthanasIU et al., 2010 ⁽¹³²⁾
17.198	<i>CMYA5</i>	5q14.1	Chen et al., 2011 ⁽¹³³⁾ . Meta-análisis
3322	<i>NRXN1, CNTNAP2, barricas, CDC42, PRKCZ,</i>	2p16.3, 7q35, Xp11.4, 1p36.1, 1p36.33-p36.2	O'Dushlaine et al., 2011 ⁽¹³⁴⁾
1172	<i>ASTN2, GABR1, CNTNAP2</i>	9q33.1, 6q15, 7q35	Wang et al., 2010 ⁽¹³⁵⁾ . Meta-análisis
9394	<i>MIR137 PCGEM1 TRIM26 CSMD1 MMP16 CNNM2 NT5C2 STT3A CCDC68, TCF4</i>	1p21.3, 2q32.3, 6p21.3-p22.1, 8p23.2, 8q21.3, 10q24.32, 10q24.33, 11q24.2, 18q21.2, 18q21.2	Ripke et al., 2011 ⁽¹³⁶⁾ . Meta-análisis

18945	<i>ZNF804A</i>	2q32.1	Williams et al., 2011 ⁽¹³⁷⁾ . Meta-análisis
626	<i>ELAVL2</i>	9p21	Yamada et al., 2011 ⁽¹³⁸⁾
746	<i>ZKSCAN4, NKAPL, PGBD1, TSPAN18</i>	6p21, 6p22.1, 6p22.1, 11p11.2	Yue et al., 2011 ⁽¹³⁸⁾
795	<i>SLAMF1, NFKB1, RIPK4, DOCK4, RGMB, AKAP9, CSMD1, ZCCHC14, ZNF492</i>	1q23.3, 4q24, 21q22.3, 7q31.1, 5q15, 7q21.2, 8p23.2, 16q24.2, 19p12	Liou et al., 2012 ⁽¹³⁹⁾
1169 (2569 en el estudio de seguimiento)	<i>AMBRA1, DGKZ, CHRM4, MDK y TCF4, CUX1</i>	11q1 y 18q21.2, 7q22.1	Rietschel et al., 2012 ⁽¹⁴⁰⁾
5001	<i>CACNA1C, CACNB2, TSNARE</i>	12p13.33, 10p12.32, 8q24.3	Ripke et al., 2013 ⁽¹⁴¹⁾
9379	<i>MHC, CACNA1C, MIR137, MMP16, CSMD1, STT3A</i>	6p21.33, 12p13.33, 1p36.22, 8q21.3, 8p23.2, 11q24.2	Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics, 2013 ⁽¹⁴²⁾
36.989	<i>DRD2, GRM3, GRIN2A, CACNA1I, GRIA1, SRR, CLCN3, RIMS1, KCTD13, NLGN4X (seleccionados de 108 loci)</i>	11q23.2, 7q21.12, 16p13.2, 22q13.1, 5q33.2, 17p13.3, 4q33, 6q12-13, 16p11.2, Xp21.33-32.	Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, 2014 ⁽¹⁴³⁾
34 241 (698)	<i>CACNA1C, CSMD1</i>	12p13.33, 8p23.2	Takahashi et al., 2015 ⁽¹⁴⁴⁾ . Meta-análisis
1955	<i>NKAIN2, LSM6, GLRA1 (asociado a la presencia síntomas negativos) y KIAA1430, NRG1, PHACTR3 (asociada a los síntomas positivos de presencia)</i>	6q22.31, 4q31.22, 5q33.1, 4q35.1, 8p12, 20q13.32.	Edwards et al., 2016 ⁽¹⁴⁵⁾ . Meta-análisis

Tabla 5. Resumen de los hallazgos más relevantes en los estudios GWAS en la esquizofrenia. Tomada de Ariel Cariaga-Martínez et al., 2016⁽¹¹⁹⁾.

C.) Estudio de las anomalías cerebrales.

El avance en técnicas de neuroimagen ha permitido estudiar la existencia de alteraciones cerebrales en los pacientes con esquizofrenia, a través de dos tipos de

imagen, las pruebas estructurales y las pruebas funcionales.

Las técnicas de neuroimagen estructural, como son la tomografía axial computarizada (TAC) y resonancia magnética (RM), y las técnicas de neuroimagen funcional, como la tomografía por emisión de fotón único (SPECT), tomografía por emisión de positrones (PET) y la resonancia magnética funcional (RMf), permiten el estudio macroscópico de cerebro humano *in vivo*. En el momento actual todas estas técnicas son más útiles para la investigación que para el diagnóstico de esquizofrenia.

C.1) Neuroimagen estructural.- Los primeros estudios realizados, entre 1970 y 1980, se observó un aumento del volumen de los ventrículos laterales y del tercer ventrículo, mediante TAC, que se confirmaría en los años posteriores mediante múltiples estudios con RM⁽¹⁴⁶⁾. Posteriormente se han analizado regiones de interés en todas las áreas cerebrales, pero sin obtenerse unos marcadores biológicos relevantes para la esquizofrenia.

En el año 2016, el Grupo de Trabajo de Esquizofrenia ENIGMA, realizaron un meta-análisis prospectivo, donde analizaron las imágenes por RM del cerebro de 2028 pacientes con esquizofrenia, y 2540 de controles sanos, a través de una evaluación con métodos estandarizados en 15 centros de todo el mundo⁽¹⁴⁷⁾. En este estudio concluyen que hay una disminución del tamaño del hipocampo⁽¹⁴⁸⁾, además de otras estructuras como el tálamo⁽¹⁴⁹⁻¹⁵¹⁾, la amígdala^(150, 151), el núcleo accumbens⁽¹⁵¹⁾ y de los volúmenes cerebrales medios⁽¹⁵²⁾. Por otra parte, se observó un aumento del tamaño en el volumen de los ventrículos laterales⁽¹⁵³⁾ y del globo pálido⁽¹⁵⁴⁾. Otros estudios hablan de un aumento en los ganglios basales⁽¹⁴⁶⁾ (caudado, putamen y globo pálido).

En la corteza se pueden observar cambios en los patrones de plegado y una reducción del volumen y espesor cortical, siendo más pronunciada en los lóbulos frontal y temporal⁽¹⁵⁵⁾.

C.2) Neuroimagen funcional.- Es una técnica que permite la visualización en vivo del cerebro a través de imágenes dinámicas, observando los cambios que se producen en el cerebro mientras se realiza una actividad cognitiva, mediante áreas de activación o

de desactivación neuronal.

Estos estudios se han llevado a cabo a través de diferentes métodos aplicación, en los que se han observado una hipofunción en la corteza prefrontal (disminución relativa del metabolismo y/o flujo sanguíneo cerebral), en particular en el córtex prefrontal dorsolateral en personas con esquizofrenia^(156, 157), siendo el hallazgo funcional más replicado. También se ha visto una menor activación de las áreas corticales sensitivomotoras al realizar tareas motoras^(157, 158).

Los estudios de neuroimagen funcional demostraron que la corteza auditiva, el sistema límbico y las áreas de lenguaje se activan durante las alucinaciones auditivas⁽¹⁵⁹⁾. Los modelos psicológicos y neurofisiológicos de la alucinación pueden integrarse si tenemos en cuenta que los pacientes con esquizofrenia pueden adscribir monólogos o diálogos internos a fuentes externas, lo que explicaría la activación de las áreas del lenguaje, mientras que la activación del sistema límbico podría corresponder a los aspectos emocionales que a menudo acompañan a las alucinaciones.

D.) Modelo de Diátesis-Estrés.

En 1977, Zubin y Spring⁽¹⁶⁰⁾, propusieron un modelo de vulnerabilidad para el desarrollo de esquizofrenia, en el que señalaban la importancia de la interacción entre factores biológicos y ambientales en el origen de la patología esquizofrénica, como hemos ido señalando hasta el momento.

Según este modelo, serían necesarios un conjunto de factores de estrés biológico y psicológico actuando sobre una predisposición biológica. También conocida como hipótesis del "doble impacto"⁽¹⁶¹⁾, parte de la idea que para que aparezca una psicosis, un determinado individuo ha de poseer un sustrato biológico disfuncional predisponente (vulnerabilidad), sobre el que otros factores más tardíos van a actuar años después poniendo en marcha el curso de la enfermedad. Podríamos hablar de dos tipos de vulnerabilidades, una innata y otra adquirida.

En la vulnerabilidad innata, el factor de riesgo más importante sería la genética, mientras que la vulnerabilidad adquirida encontraríamos los factores de riesgo ambientales (complicaciones perinatales, infecciones víricas o hipoxia durante el período intrauterino, exposición a cannabis, migración, urbanicidad, etc.). Es importante tener en cuenta el concepto de "interacción" en este modelo, ya que para que haya interacción ha de darse una coparticipación sinérgica de ambos factores, es decir, donde el efecto de uno es condicionada por el otro⁽¹⁶²⁾. La exposición al primer factor genera un estado de vulnerabilidad que hará que el individuo que lo presente tenga dificultades para el manejo del estrés ambiental y psicosocial en fases posteriores de su vida (como la adolescencia). Por tanto, se considera que este segundo impacto como un factor necesario, pero no suficiente por sí solo, para el inicio de esquizofrenia⁽¹⁶³⁾.

E.) Hipótesis de neurodegeneración y de neurodesarrollo.

E.1) Hipótesis de Neurodegeneración.- En un proceso neurodegenerativo, hay una destrucción del tejido cerebral, lo que supone la pérdida neuronal y sináptica, así como el desarrollo de un tejido cicatricial en el cerebro (gliosis)⁽¹⁶⁴⁾. Esta hipótesis se centra, en el caso de la esquizofrenia, en es considerado un trastorno de curso crónico y progresivo, implicando unos cambios a nivel bioquímico que pueden conducir a distintos síndromes clínicos, y afectando a una pérdida de la función neurológica y a un deterioro del comportamiento⁽¹⁶³⁾.

Ya en las primeras definiciones sobre la esquizofrenia, Emil Kraepelin con su "dementia praecox", puso el foco de la patología en la evolución hacia un deterioro progresivo de los pacientes. Sin embargo, los primeros estudios longitudinales en pacientes esquizofrénicos sobre su funcionamiento neurocognitivo no mostraron una disminución de su funcionamiento a lo largo del tiempo. La principal conclusión que se extrae de estos estudios es que después de la aparición de la esquizofrenia, los déficits cognitivos son relativamente estables durante largos períodos de tiempo, no encontrando una disminución de las funciones cognitivas y llegando a afirmar de que se trataba, más que de una enfermedad degenerativa, una "encefalopatía estática"^(165, 166).

Posteriormente, diversos estudios confirmaron estas afirmaciones, remarcando la estabilidad en el funcionamiento cognitivo⁽¹⁶⁷⁻¹⁶⁹⁾ y una mejoría en el funcionamiento en los primeros años después de la enfermedad, produciéndose un aplanamiento posterior a los 5 años y a los 10 años se iguala con las pruebas neurocognitivas del inicio de la enfermedad⁽¹⁷⁰⁾. En estudios más amplios se ha visto un incremento del deterioro con el transcurso de la enfermedad⁽¹⁷¹⁾, con una disminución del aprendizaje y de la memoria verbal, además de una falta de mejoría en la atención y velocidad de procesamiento a más largo plazo^(164, 172).

La hipótesis de que la esquizofrenia es un trastorno neurodegenerativo resurgió de nuevo, principalmente en base a los estudios de neuroimagen longitudinales⁽¹⁷³⁾, donde se aprecia la presencia de alteraciones morfológicas cerebrales, como la reducción de los lóbulos frontal y temporal y el agrandamiento de los ventrículos, no siendo atribuible a un patrón de envejecimiento normal⁽¹⁷⁴⁾. Rund, en el 2009, resume los resultados más sólidos que parecen observarse en los pacientes con esquizofrenia en⁽¹⁶⁴⁾:

- Reducción del volumen de los lóbulos temporales, entre otras áreas del lóbulo temporal medial, que incluye el complejo hipocampal de la amígdala y el lóbulo temporal neocortical^(146, 175, 176).

- Ventrículos más grandes que los controles sanos^(153, 175, 176).

- El volumen de los lóbulos frontales se reduce en comparación con controles sanos^(175, 176). También se han encontrado anomalías del lóbulo parietal y occipital en estudios^(164, 176).

Otro proceso que pueden orientar hacia la hipótesis de la neurodegeneración en la esquizofrenia son los estudios sobre la presencia de neurotoxicidad, como ocurre en la hipótesis dopaminérgica y la hipótesis del NMDA⁽¹⁶³⁾. La dopamina está implicada en procesos de proliferación, migración y poda neuronal, así como en procesos de estrés oxidativo y excitotoxicidad que producen neurodegeneración⁽¹⁷⁷⁾, mientras que la hipótesis de los receptores del NMDA produciría un aumento de liberación de

glutamato, a través del aumento de concentraciones de glucocorticoides en respuesta a hipersensibilidad al estrés de estos pacientes, provocando la muerte neuronal⁽¹⁷⁸⁾ y de oligodendrocitos, especialmente en el hipocampo⁽¹⁷⁹⁾. También se ha propuesto como hecho que puede orientar hacia la hipótesis degenerativa el efecto de la medicación antipsicótica, que parece frenar el avance de la enfermedad⁽¹⁶³⁾.

E.2) Hipótesis del neurodesarrollo.- La corteza cerebral tiene un papel primordial en la generación de los procesos mentales, tales como la memoria, los sentimientos y la consciencia. Durante el desarrollo embrionario ocurren una serie de procesos que coordinan la proliferación, migración y diferenciación de las neuronas, y son fundamentales para el correcto ensamblaje de la corteza cerebral y la formación de los sistemas nerviosos complejos, a nivel de las células del tubo neural embrionario⁽¹⁾. Este ensamblaje debe hacerse bajo unos patrones de tiempo y espacio adecuados, migrando las neuronas a las regiones específicas y anclándose en el lugar correcto en el momento adecuado, contruyéndose así las redes neuronales locales, con una adecuada función⁽¹⁸⁰⁾.

Daniel Weinberger⁽²⁾ y Robin Murray⁽¹⁸¹⁾, en 1987, se planteó la posibilidad de que la esquizofrenia fuese un trastorno del neurodesarrollo, en torno a la observación del aumento de prevalencia de la enfermedad ante determinadas circunstancias y eventos adversos tempranos (como complicaciones durante la gestación y el parto, el nacimiento en meses invernales), pudiendo interferir estos eventos en la proliferación celular y la migración neuronal normal, ocasionando fallos neuronales y perjudicando la organización de las conexiones axonales. Nada de esto indicaba que el paciente pudiera desarrollar esquizofrenia muchos años después, sin embargo, se había observado un período de latencia entre las complicaciones obstétricas y sus secuelas en la epilepsia y las discinesias, planteándose que en estos pacientes, la lesión permanece inactiva hasta que el cerebro madura lo suficiente para poner en funcionamiento los sistemas dañados⁽¹⁸¹⁾.

Dicho de otra forma, esta hipótesis viene a referir que el individuo esquizofrénico tiene unos factores genéticos que predisponen a la enfermedad, y que en la interacción

con ciertos factores ambientales se produciría un desarrollo anormal del cerebro, iniciándose la enfermedad en algún momento de su evolución ante la afectación de factores externos o internos⁽³⁾. Todo esto recuerda a lo comentado en la hipótesis de vulnerabilidad-estrés expuesta con anterioridad, pudiendo enmarcarlo dentro de éste, por lo que la acción de un primer factor causaría un estado de vulnerabilidad, que altera en cierta medida el neurodesarrollo, siendo imprescindible la acción de un segundo factor que ocasiona las alteraciones propias de la enfermedad⁽¹⁶³⁾. Se produciría un tiempo de latencia hasta la manifestación de los síntomas psicóticos, ya que las estructuras cerebrales responsables de estos síntomas deben completar su maduración, e iniciar su funcionamiento⁽¹⁸²⁾. Es entonces cuando manifestarían su déficit⁽¹⁸³⁾. Por lo tanto, las influencias genéticas y ambientales por sí solos pueden conferir riesgo para la esquizofrenia, pero sería necesaria la combinación de múltiples factores para manifestar la enfermedad en la mayoría de los casos⁽¹⁸⁴⁾.

En una revisión realizada por Oscar Pino y colaboradores⁽¹⁶³⁾, en 2014, recoge los principales estudios de investigación que encuentran esta teoría una buena explicación para el desarrollo de esquizofrenia, como por ejemplo:

- Alteraciones pre y perinatales. Se ha observado la influencia de determinados factores prenatales y perinatales en el aumento de prevalencia en la esquizofrenia, como son las complicaciones obstétricas durante el embarazo (diabetes, incompatibilidad del Rh, preeclampsia), las alteraciones en el desarrollo y crecimiento fetal (bajo peso al nacer, malformaciones congénitas) y las complicaciones del parto (hipoxia⁽¹⁸⁵⁾, cesárea de urgencia, atonía uterina)⁽⁷⁴⁾. También las infecciones en el embarazo son responsables de anomalías congénitas del cerebro, disfunción neurocognitiva y trastornos del comportamiento, como el virus de la Influenza, la rubeola⁽¹⁸⁶⁾, la toxoplasmosis, o el virus del herpes simple tipo 2^(67-69, 187).

Otros factores como la estación de nacimiento también pueden influir en el aumento de prevalencia de la esquizofrenia en personas nacidas en los meses de invierno y primavera⁽¹⁸⁸⁾; así como también una correlación entre vivir en zonas urbanas

y aumento del riesgo de padecer esquizofrenia, en comparación con vivir en zonas rurales^(75, 76).

- Alteraciones en el desarrollo. La presencia de anomalías físicas de poca importancia para el paciente con esquizofrenia, pueden haberse desarrollado durante los primeros meses del embarazo (primer trimestre y principios del segundo), donde se produce el mayor desarrollo cerebral^(163, 189). Dado que tanto el sistema nervioso central y la piel se derivan del mismo tejido ectodérmico, las anomalías físicas menores se podrían considerar como marcadores externos de un desarrollo anormal del cerebro⁽¹⁹⁰⁻¹⁹³⁾. Estas alteraciones pueden ser una menor circunferencia craneal, paladar ojival, orejas de implantación baja y diferencias en los dermatoglifos^(163, 194).

Por otro lado, un meta-análisis realizado en el año 2012, por Dickson y colaboradores, mostraron una mayor frecuencia de déficits significativos en el coeficiente intelectual y en la función motora, mostrando un retraso en determinados hitos del desarrollo infantil⁽¹⁹⁵⁾.

- Alteraciones en el funcionamiento neurocognitivo. Hemos visto en el apartado de la neurodegeneración que si existiera una evolución claramente degenerativa en el cerebro de los pacientes esquizofrénicos, podría observarse un declive claro de las funciones y procesamientos cognitivos, que no se ha observado en los estudios⁽¹⁶³⁾.

- También tienen en cuenta la presencia de factores genéticos y ambientales ya vistos en páginas previas. En cuanto a la genética, determinados loci de susceptibilidad y genes asociados con la esquizofrenia pueden tener un papel principal en la expresión anormal de ciertos procesos neuronales, como la migración neuronal, conectividad y mantenimiento de microcircuitos neuronales^(24, 163). Se han identificado varios genes de susceptibilidad putativos de esquizofrenia como la neuroregulina1 (NRG1), la disbindina, el DISC1, el regulador de la proteína G señalización-4 (RGS4), COMT, GRM3 y G72⁽¹⁹⁶⁾.

- Alteraciones neuroquímicas. En el desarrollo cerebral, los procesos secuenciales más decisivos serían probablemente la proliferación de los precursores neuronales y la migración de la neuronas, que determinarían su estructura interna, así como la

citoarquitectura y conexiones sinápticas⁽¹⁾. Diferentes grados de proliferación y/o migración neural van a ocasionar pequeñas alteraciones en su desarrollo inicial, que supondrán importantes alteraciones posteriores en su funcionalidad. Se ha demostrado la existencia de alteraciones en determinadas señalizaciones moleculares, produciendo disfunciones en la formación y organización cerebral, y que se manifestarían sintomáticamente con patologías como la esquizofrenia^(1, 163, 197, 198).

Por otra parte, dentro de la hipótesis del neurodesarrollo, y considerándolo como un factor de la etiopatogenia de la esquizofrenia, voy a realizar una revisión de los trastornos en el desarrollo cortical, concretamente en las malformaciones debidas a una anormal migración neuronal. Para ello, se revisan los diferentes procesos necesarios para la correcta formación de la corteza cerebral, y las malformaciones que se pueden producir, centrándome en la lisencefalia como tipo de malformación de la migración cortical anormal más frecuente y característica.

II.2. CORTEZA CEREBRAL.

II.2.1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

El desarrollo del SNC es un proceso muy complicado, que precisa de una organización muy precisa, tanto temporal como espacialmente, siendo el desarrollo de la corteza cerebral el evento más importante a destacar. En el año 2010, Verrotti et al.⁽¹⁹⁹⁾, expone la organización del desarrollo de este en los siguientes pasos:

1. Neurulización primaria: que ocurre en las 3-4 primeras semanas de gestación, con el comienzo de la migración neuronal en la 5ª semana.

2. Desarrollo prosencefálico, desde los 2 meses de gestación hasta estadios perinatales.

3. Proliferación neuronal, a los 3-4 meses de gestación.

4. Migración neuronal, a los 2-5 meses de gestación.

5. Organización conexiones, desde 5º mes de gestación hasta estadios perinatales.

6. Mielinización, que es un proceso que comienza después del nacimiento.

II.2.2. CORTEZA CEREBRAL DE MAMÍFEROS

El desarrollo de la corteza cerebral en los mamíferos ha hecho de ésta el órgano más complejo entre los animales⁽²⁰⁰⁾, sobre todo en los primates y homínidos. Su desarrollo evolutivo ha ido confiriendo a cada especie un crecimiento diferencial⁽²⁰¹⁾, tanto estructural como funcionalmente. En los mamíferos, y dentro de ellos en los primates, se produce un gran crecimiento radial de la corteza, lo que hace que esta ocupe la mayor parte de la superficie del cerebro llegando a abarcar el 80% en el humano⁽²⁰²⁾. Posee una disposición típica en 6 capas celulares^(203, 204), paralelas, y con un

tamaño homogéneo, distribuyéndose en el hombre en una serie pliegues en superficie, llamados circunvoluciones, y manteniendo su estructura.

Las células de cada capa proyectan y reciben impulsos desde diferentes lugares y están interconectadas funcionalmente por una compleja red de axones y dendritas. Esta evolución les confiere, sobre todo a primates y homínidos, unas capacidades características, como mayor poder de representación y análisis del mundo, mayor capacidad de memoria y predicción, además de la planificación de su conducta⁽²⁰⁵⁾. En el hombre, ese desarrollo es aún mayor, con capacidades como la producción y la apreciación del arte, con mayores habilidades mentales y cognitivas⁽²⁰⁶⁾. Además, la corteza cerebral realiza otras funciones como hacer consciente estímulos sensoriales, actos motores y motivaciones, etc. Estas funciones se llevan a cabo por la activación de circuitos neuronales integrados, que aumenta la complejidad del cerebro humano y contribuye a su singularidad⁽²⁰⁶⁾.

II.2.2.1. DESARROLLO CORTICAL NORMAL

Para la formación de la arquitectura de la corteza cerebral en los mamíferos se necesita una elaborada secuencia de procesos de desarrollo que incluye la neurogénesis, la migración, el crecimiento neuronal y el establecimiento de conexiones, es decir, se requiere de un conjunto de procesos y movimientos celulares desde diferentes partes del cerebro, que van ocurriendo en una determinada secuenciación temporal donde alcanzarán su posición final correcta, en una determinada orientación y estableciendo conexiones con otras células⁽²⁰⁷⁾, siendo el proceso de migración celular el más dilatado en el tiempo^(208, 209). Este proceso termina con la formación de la corteza cerebral en forma de 6 capas, que se establece en los mamíferos a partir de un patrón de capas “de dentro a fuera”⁽²¹⁰⁾ de neuronas nacidas en la zona ventricular hacia la placa cortical, disponiéndose las células más modernas sobre las capas ya establecidas.

El telencéfalo embrionario consta de dos partes: el palio (techo) y el subpalio (base), teniendo su origen la corteza cerebral a partir de la zona rostródorsal del tubo

neural, llamada telencéfalo, más concretamente en la zona palial del telencéfalo, al igual que el hipocampo⁽²¹¹⁾. En el inicio del desarrollo de la corteza cerebral, la pared del telencéfalo está compuesta por una capa uniforme de células germinales neuroepiteliales, que son células progenitoras que abarcan toda la zona ventricular y la zona marginal o intermedia⁽¹⁹⁹⁾. Tras la fase de neurulación de la placa neural comienza el proceso de proliferación y diferenciación de las células progenitoras del neuroepitelio, dando lugar a neuronas y células gliales. Una vez que estas nuevas neuronas van acabando su ciclo mitótico (que se produce en diferentes momentos y no al mismo tiempo)⁽²⁰⁵⁾, van abandonando la zona ventricular para ocupar la zona intermedia (IZ) o capa del manto.

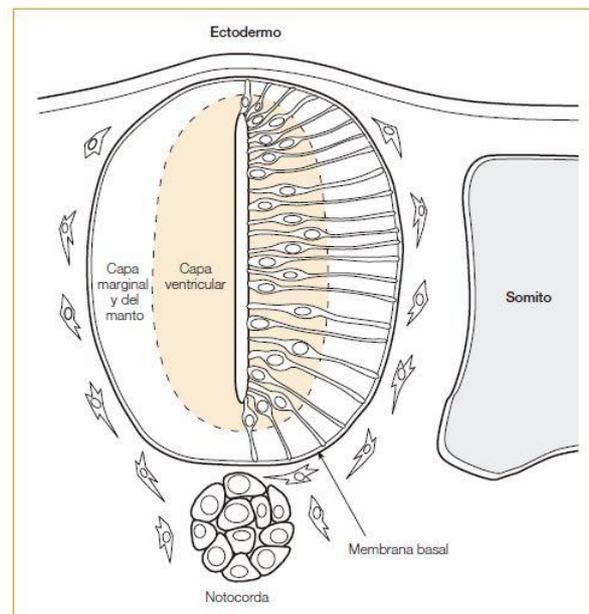


Figura 3. Tubo neural: se observa la distribución radial de los progenitores neurales en la zona ventricular (neuroepitelio). Tomada de Neuroanatomía, Puelles et al., 2008⁽²⁰⁵⁾.

Se produce así la formación de neuronas o neurogénesis, que comienza en la zona ventricular del palio telencefálico, mediada por las células progenitoras de la glía radial, y también a partir de las células progenitoras intermedias en la zona subventricular^(212, 213). La neurogénesis inicia la secuencia histogénica que, seguida de diversos procesos celulares, lleva a la formación de la corteza. Estos procesos son la migración, crecimiento, diferenciación y muerte celular⁽²¹⁴⁻²¹⁶⁾.

En esta zona ventricular que es aparentemente homogénea, ocurren ciertos procesos citogenéticos⁽²¹⁷⁾ regulados de forma precisa por la expresión de un conjunto de genes, que cuando están mutados pueden causar graves alteraciones de la formación de la corteza cerebral y representan la base causal de diversos procesos patológicos^(211, 218, 219). La expresión diferencial de estos genes a lo largo de los ejes anteroposterior y ventrodorsal de la vesícula telencefálica codifica información posicional y determina la aparición de territorios estructurales y funcionales diferenciados (regionalización cerebral o genoarquitectura)⁽²⁰⁵⁾.

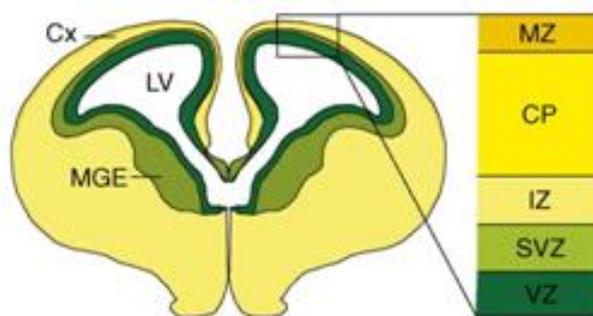


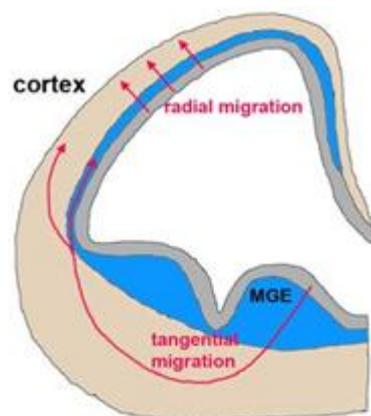
Figura 4. Subregiones principales del neocórtex en desarrollo. Tomada de Kerjan y Gleeson, 2007⁽²⁰⁷⁾.

El cerebro de mamífero en desarrollo tiene dos hemisferios simétricos, cada uno con un ventrículo lateral (LV) lleno de líquido cefalorraquídeo. La eminencia del ganglio medial (MGE) es una fuente importante de interneuronas, que migran ampliamente a todas las áreas del cerebro, incluyendo la corteza cerebral (Cx). La corteza cerebral (Cx) en desarrollo se puede dividir en cinco subregiones desde el fondo (apical) hasta la parte superior (basal): zona ventricular (VZ), zona subventricular (SVZ), zona intermedia (IZ), placa cortical (CP) y zona marginal (MZ). Casi todas las neuronas en la corteza adulta se generan (es decir, someterse a mitosis final) dentro de la VZ o SVZ y luego migrar en el CP.

La mayoría de las neuronas se generan en la zona ventricular y luego en los estadios posteriores, en la zona subventricular⁽²²⁰⁾, para posteriormente comenzar su migración hasta su ubicación específica en la corteza, estableciendo circuitos neuronales funcionales entre sí^(211, 219). Las neuronas que se posicionan en la corteza cerebral se generan distalmente a su lugar de origen y pueden realizar un largo trayecto hasta éste⁽²²⁰⁾.

En los mamíferos, el desarrollo cortical comienza con la formación de la preplaca

o capa plexiforme primordial, que se forma a partir de la primera cohorte de neuronas que migran desde la zona ventricular, a través de un proceso migratorio que puede producirse de dos formas, basándose en su orientación: mediante migración radial, en la cual las células migran de la zona progenitora ventricular hacia la superficie del cerebro siguiendo la disposición radial del tubo neural; o mediante migración tangencial, por el que neuronas de origen subpalial, desde los ganglios a la base, se incorporan a la estructura celular cortical^(219, 221, 222). Además, esta preplaca incluye una zona de neuronas pioneras, que sería la zona marginal (futura capa I). A partir de la preplaca y la migración neuronal, se forma la placa cortical, que está poblada de neuronas con una orientación radial, y en su mayoría proceden de la zona ventricular del telencéfalo⁽²²³⁾ y migran a través de las fibras gliales radiales. Otras neuronas que forman esta placa cortical migran desde la eminencia ganglionar medial, por el proceso de migración tangencial.⁽²¹⁹⁾



MGE: eminencia ganglionar medial.

Figura 5. Vías de migración de las neuronas. Tomada de Liu, 2011⁽²¹⁰⁾.

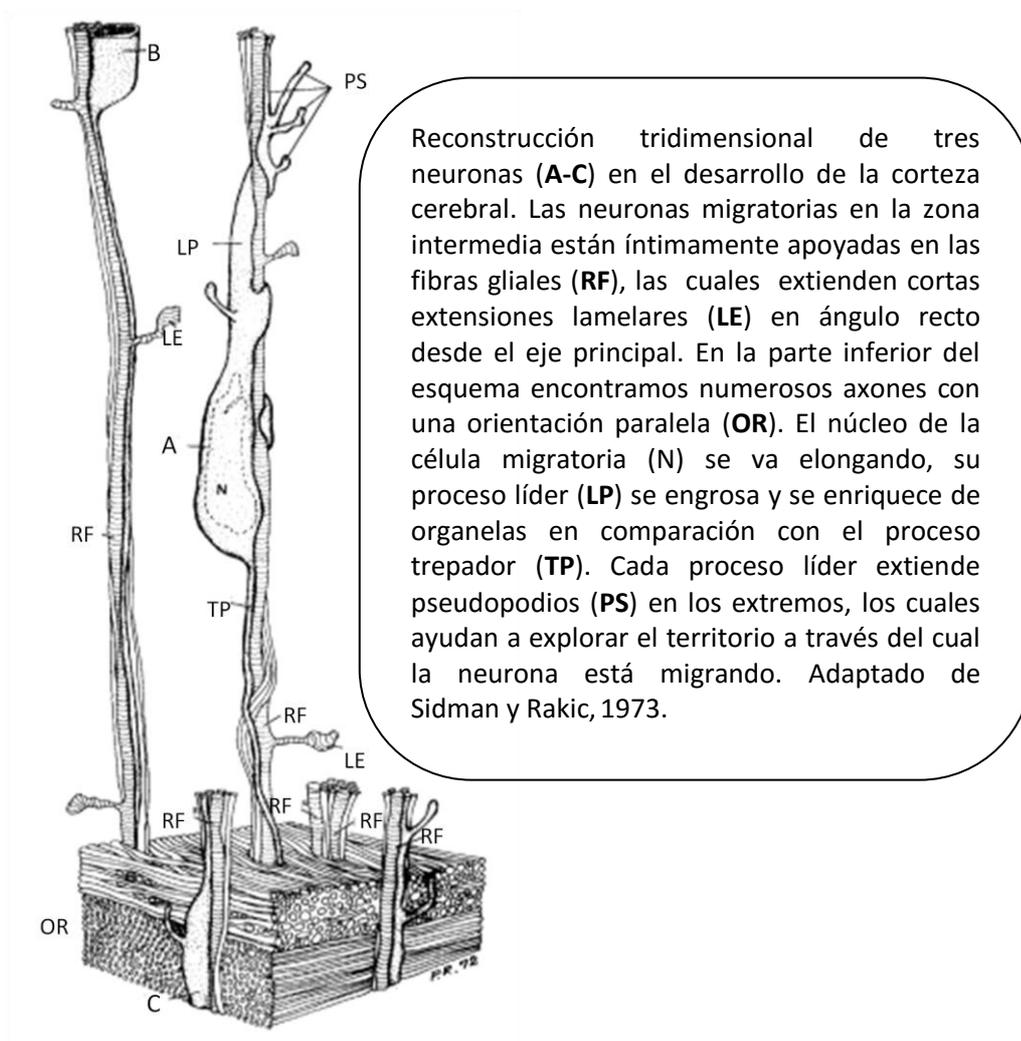
En el diagrama de sección coronal de la corteza cerebral en desarrollo se pueden observar las vías migratorias tanto de las neuronas excitatorias (radial) como de las interneuronas inhibitoras (tangenciales). Las neuronas excitatorias y las neuronas inhibitoras surgen de las regiones dorsal y ventral adyacentes a los ventrículos laterales, respectivamente.

Las alteraciones de la migración neuronal pueden provocar localizaciones finales erróneas de las neuronas, pudiendo producir malformaciones cerebrales como displasias focales, heterotopia subcortical, laminación cortical incorrecta y

liscencefalia⁽²²⁴⁾.

Hay que destacar la migración radial en la formación de la corteza, ya que posibilita la estratificación en capas de esta. Este tipo de migración involucra el movimiento de las células desde la zona ventricular a la capa del manto. Es la migración más importante en el encéfalo de los mamíferos, y es determinante en estratificación de la estructura cortical en capas⁽²⁰⁵⁾. Hay dos tipos de migración radial, el primero sería la migración de células que se produce al inicio de la formación de la corteza, cuando la vesícula cerebral es todavía relativamente fina, llamado desplazamiento nuclear o traslocación somática^(222, 225, 226), y no necesita de la glía radial para su desplazamiento; mientras que en etapas posteriores de la formación de la corteza, cuando la capa va adquiriendo cierto engrosamiento, hay un elemento importante para la migración radial en el cerebro, la glía radial, que proporciona la estructura necesaria para que esta se produzca^(214, 222, 227). Se ha visto en estudios in vitro⁽²²⁸⁻²³⁰⁾ y en estudios in vivo⁽²³¹⁻²³³⁾ sobre la corteza de los mamíferos, que el 80-90% de los precursores neuronales migran a lo largo de las fibras de la glía radial. Después de la época de la migración, las células de la glía radial se transforman en astrocitos estrellados⁽²³⁴⁻²³⁶⁾.

Durante el proceso de migración, existe una estrecha unión entre las neuronas y la glía radial (Figura 6): las neuronas se unen a la glía mediante una unión intersticial que aparece bajo el soma de la neurona en el lugar de aposición a la fibra glial⁽²³⁷⁾. Esta unión tan estrecha sugiere que los componentes de la membrana de la superficie celular median en la migración.



Reconstrucción tridimensional de tres neuronas (A-C) en el desarrollo de la corteza cerebral. Las neuronas migratorias en la zona intermedia están íntimamente apoyadas en las fibras gliales (RF), las cuales extienden cortas extensiones lamelares (LE) en ángulo recto desde el eje principal. En la parte inferior del esquema encontramos numerosos axones con una orientación paralela (OR). El núcleo de la célula migratoria (N) se va elongando, su proceso líder (LP) se engrosa y se enriquece de organelas en comparación con el proceso trepador (TP). Cada proceso líder extiende pseudopodios (PS) en los extremos, los cuales ayudan a explorar el territorio a través del cual la neurona está migrando. Adaptado de Sidman y Rakic, 1973.

Figura 6. Reconstrucción tridimensional de neuronas. Adaptado de Sidman y Rakic, 1973⁽²¹⁴⁾.

Una vez que se forma la placa cortical, esta divide a la preplaca en dos partes⁽²²⁶⁾: la ya comentada zona marginal donde se quedan algunas células y formaría la capa I de la corteza cerebral definitiva; mientras que otras células quedarían situadas entre la zona localizada entre la nueva placa cortical y la zona intermedia (IZ), que sería la capa más profunda, llamada en este momento subplaca⁽²³⁸⁾. Las células de Cajal-Retzius, que nacen en el momento en que se forma la preplaca, permanecen cerca de la superficie pial en la zona marginal, mientras que el resto de las células primordiales constituyen la subplaca, donde sus neuronas se transforman en células intersticiales profundas⁽²³⁹⁾, conteniendo así, tanto la zona marginal como la subplaca, las neuronas más tempranas de la corteza⁽²¹⁹⁾.

Así pues, la pared cerebral queda subdivida en seis zonas embrionarias transitorias desde la región ventricular a la superficie pial⁽²⁴⁰⁾ (figura 7):

-ZONA VENTRICULAR, donde tiene lugar la división celular (ventricular zone, VZ en sus siglas en inglés).

-ZONA SUBVENTRICULAR (subventricular zone, SVZ).

-ZONA INTERMEDIA, la futura sustancia blanca (intermediate zone, IZ)

-SUBPLACA (en la figura como deeper layers)

-PLACA CORTICAL, en la que se acumulan las neuronas postmigratorias y la guía para formar las distintas capas celulares de la corteza madura (cortical plate, CP)

-ZONA MARGINAL (marginal zone, MZ; en la figura como upper layers), futura capa I.

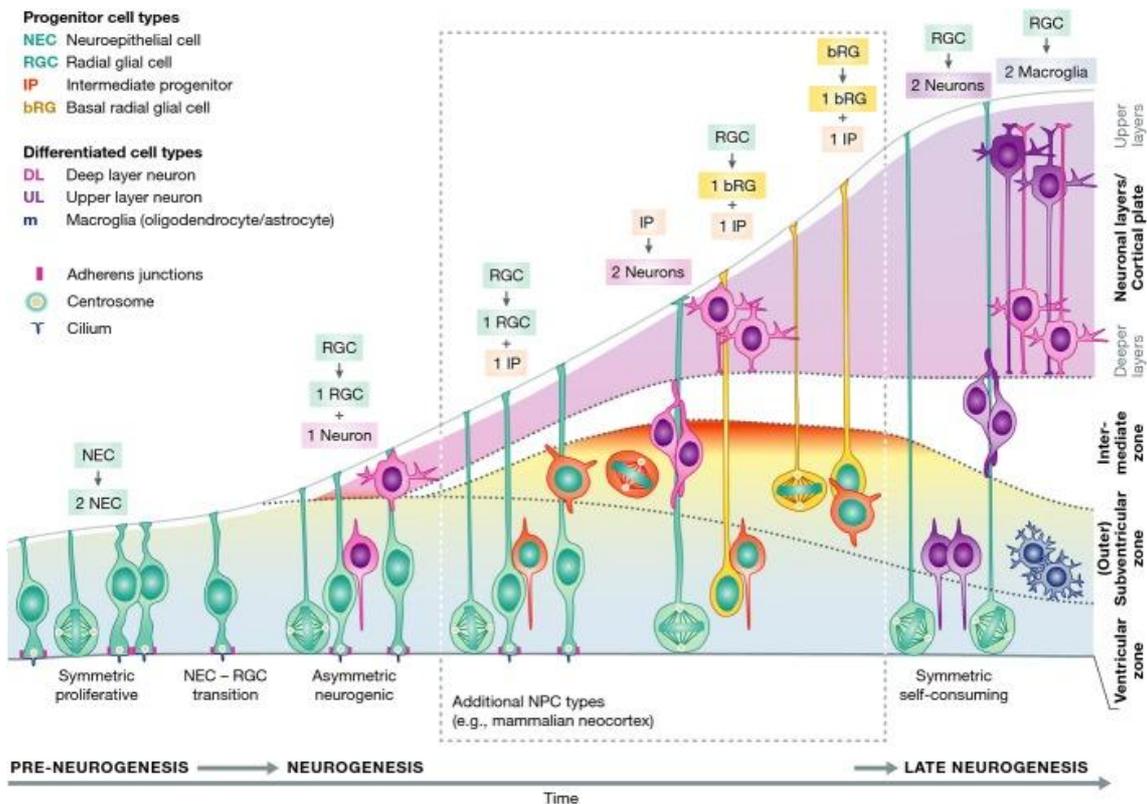


Figura 7. Capas transitorias de la corteza cerebral en formación. Tomada de Paridean et al., 2014⁽²⁴¹⁾.

II.2.2.2. ESTUDIO DE LA CORTEZA CEREBRAL.

El neocórtex cerebral se divide en 6 capas celulares diferentes con una función y organización determinada, y que operan de forma conjunta. Contiene en estas capas neuronas, células gliales, vasos y fibras nerviosas, en una organización paralela, como hemos comentado de dentro hacia fuera⁽²¹⁰⁾, comenzando su estratificación ascendente⁽²³⁹⁾.

La zona intermedia de la corteza cerebral en formación contiene en este momento múltiples y distintos elementos celulares, como las células de la glía radial, cuya misión, entre otras, está de la guiar a las células postmitóticas que migran desde la región periventricular hacia la placa cortical^(219, 239). También encontraríamos en esta zona las neuronas que migran desde las regiones subpaliales, en la eminencia ganglionar medial, mediante un movimiento tangencial^(221, 242, 243). Tras esta migración tangencial sobre la zona intermedia e incluso subventricular, migrarán radialmente para alcanzar niveles corticales más superficiales⁽²¹⁹⁾.

Las células de la capa I, principalmente las células de Cajal-Retzius, segregan una glicoproteína importante para la migración de las neuronas, llamada Reelina y que atrae a las células migratorias, ascendiendo hacia la capa I y estableciendo unos contactos funcionales importantes^(219, 239). Este proceso de atracción sobre las neuronas migrantes, provoca la formación de una dendrita apical (figura 8), sobre las neuronas de la capa cortical, que llega hasta la capa I. Si estas neuronas migratorias mantienen el contacto con la capa I, se transforman en células piramidales, que abarcarán todo el espesor de las capas de la corteza cortical. Sin embargo, si se acaba perdiendo este contacto con la capa I, las células se transformarán en algunos tipos de interneuronas^(239, 244-246).

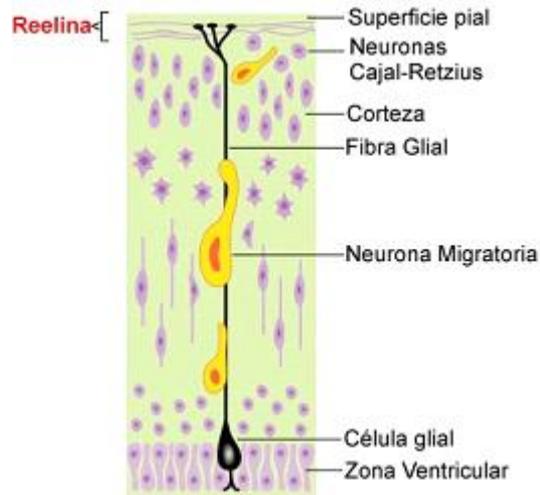


Figura 8. Efecto de la glicoproteína Reelina sobre las células migratorias.

La placa cortical, precursora de la mayoría de las capas de la corteza (capas VI, V, IV, III y II, en orden de formación ascendentes), va incrementando su grosor por la adición de neuronas que migran radialmente desde la zona ventricular, sobrepasando las capas previamente formadas hasta alcanzar niveles más superficiales. Así, las capas VI y V, que son las más profundas son generadas primero, mientras que neuronas más jóvenes forman, progresivamente, las capas IV, III y II. Este gradiente “dentro-fuera” de formación de la corteza cerebral es un hecho general en mamíferos, y esta organización de capas es lo que diferencia a los mamíferos del resto de especies⁽²³⁹⁾.

Por lo tanto, la disposición final de la corteza cerebral quedaría de la siguiente forma (Figura 9):

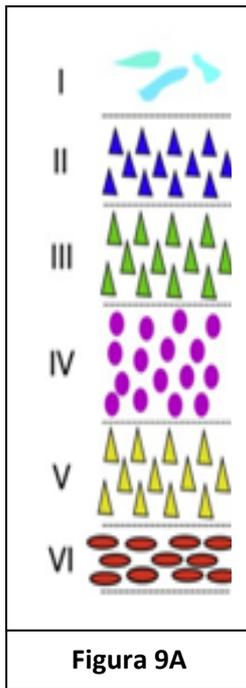


Figura 9A

- CAPA I O MOLECULAR: con células (neuronas) horizontales de Cajal-Retzius y otros tipos de interneuronas.
- CAPA II O CAPA GRANULAR EXTERNA: con neuronas granulares o estrelladas, y algunas piramidales.
- CAPA III O PIRAMIDAL EXTERNA: que posee neuronas piramidales de pequeño y mediano tamaño.
- CAPA IV O GRANULAR INTERNA: con neuronas granulares o estrelladas.
- CAPA V O PIRAMIDAL INTERNA: con piramidales de mediano y gran tamaño.
- CAPA VI O CAPA MULTIFORME: con neuronas de diversa morfología como piramidales, fusiformes y de Martinotti.

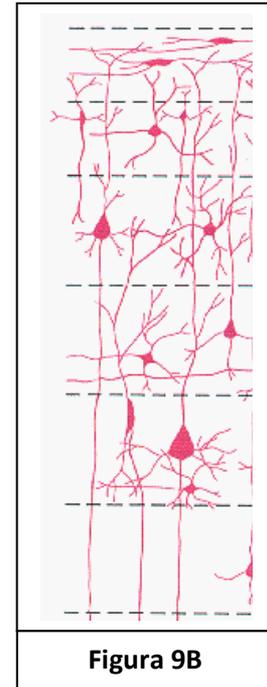


Figura 9B

Figura 9 A y B. Distribución de las distintas capas que forman el isocórtex y las células que componen cada una de las capas. Tomada de Guerrini y Parrini, 2010⁽²⁴⁷⁾.

La corteza cerebral de mamíferos posee una enorme variedad de tipos celulares, pudiendo clasificarlas en dos grandes grupos: las células piramidales o de proyección; y las células intrínsecas o interneuronas.

Las neuronas piramidales o neuronas de proyección, vehiculizan información local hacia otras regiones a través de sus axones, distribuyéndose en las capas II, III, V y VI, y siendo las más frecuentes de la corteza, hasta un 70-80%^(206, 220). En las capas II y III crean eferencias cortico-corticales, que proyectan desde unas regiones de la corteza cerebral hacia otras⁽²⁰⁶⁾; mientras que en la capa V, estas neuronas piramidales crean proyecciones subcorticales, como son las corticoestriadas, corticopontinas, corticobulbares y corticoespinales⁽²⁰⁵⁾, abandonando la estructura cortical. Gran parte de ellas son excitatorias, utilizando el aminoácido glutamato como principal neurotransmisor^(206, 220).

Las neuronas de proyección local realizarían la función de interneuronas, y se distribuyen por todas las capas de la corteza, estando sus ramificaciones localizadas en la propia corteza sin salir de ella. Se clasifica en distintos tipos según su morfología,

como pueden ser: neuronas estrelladas escasamente espinosas y lisas, neuronas bipenachadas, neuronas bipolares, neuronas en cesto, neuronas en candelabro, entre otras⁽²²⁰⁾. La mayor parte de ellas son GABAérgicas e inhibitorias⁽²⁰⁶⁾.

El neocórtex se organiza en columnas cilíndricas, a través de las 6 capas, llamadas columnas corticales, consideradas como elementos unitarios de la corteza, y comunicándose entre sí a través de las interneuronas. Por aquí llegarían las aferencias específicas que finalizarían sobre las neuronas corticales, cuyos axones suelen converger sobre las neuronas de proyección del interior de la columna.

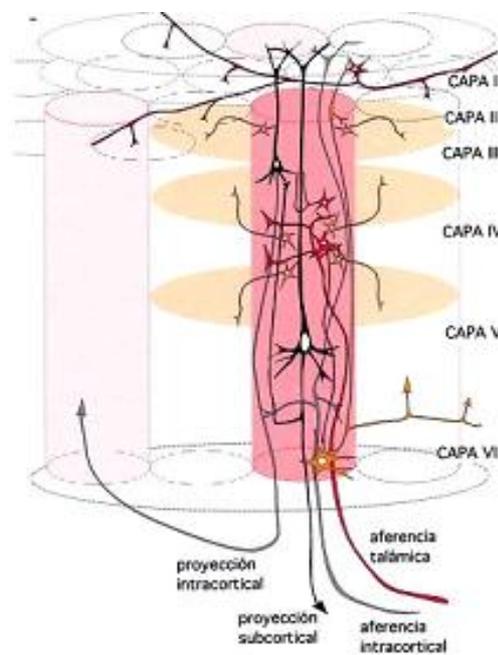


Figura 10. Organización de la corteza cerebral en columnas cilíndricas interconectadas entre sí. Tomada de Neuroanatomía, Puelles et al, 2008⁽²⁰⁵⁾.

II.2.3. MALFORMACIONES DEL DESARROLLO CORTICAL.

Cualquier alteración en este proceso de desarrollo y formación de la corteza se puede traducir en diferentes anomalías corticales, que podrían manifestarse como: hipoplasia cortical (reducción en el número de células); ectopias corticales (anomalías en el posicionamiento de las células corticales); y displasias corticales (anomalías en la forma neuronal, tamaño o número de dendritas), con la

consiguiente producción de las distintas patologías malformativas.

A grandes rasgos, estas malformaciones consisten en determinadas alteraciones en el cerebro según la disposición de las células en la corteza cerebral. Según Liu⁽²¹⁰⁾, en 2011, las malformaciones causadas por la interrupción de la migración neuronal pueden clasificarse como:

1. Agiria (liscencefalia) o paquigiria.- La liscencefalia clásica estaría causada por mutaciones en los genes relacionados con el citoesqueleto y la migración celular⁽²⁴⁸⁾. También se la conoce con el término de agiria-paquigiria, donde agiria estaría caracterizado por la ausencia total de circunvoluciones y con capa cortical engrosada, conservando parte de su organización neuronal radial, mientras que en paquigiria se encontraría la existencia de pocos giros cerebrales muy amplios⁽²⁴⁹⁾, siendo esta última menos severa. En la observación microscópica de la corteza cerebral se pueden observar una disposición de las capas distinta, en cuatro capas en lugar de seis^(249, 250).

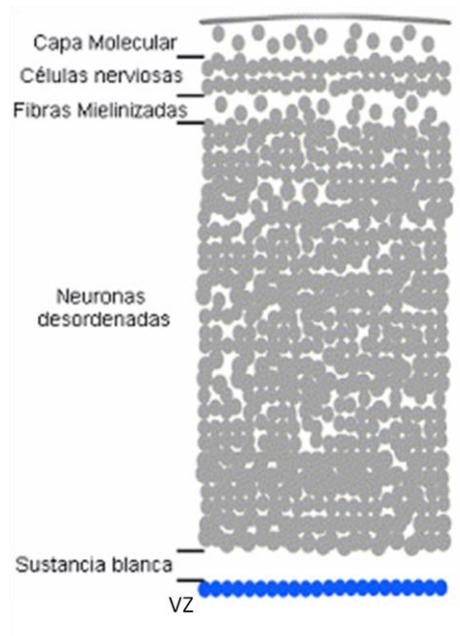


Figura 11. Disposición en cuatro capas en la corteza agírica. Tomada de Olson Y Walsh, 2002⁽²⁵¹⁾.

2. Polimicrogria.- "Muchos giros pequeños" sería el significado de esta malformación, que se caracteriza por un plegamiento excesivo de la capa cortical más

externa y puede deberse a un daño en las capas más profundas o neuronas que nacen tempranamente⁽²¹⁰⁾. A menudo, se asocia con otras malformaciones como la agenesia del cuerpo calloso. En la lisencefalia en adoquines o tipo II, se produce por una alteración en la interacción entre las células gliales radiales y su anclaje en la superficie pial, provocando una laminación cortical anormal y una sobremigración de neuronas, que resultan en la rotura de la superficie cortical y el desbordamiento de las neuronas por encima de las meninges^(224, 248), dando lugar a la desorganización de la corteza cerebral y presencia de gruesas circunvoluciones con regiones de agiria⁽²⁵²⁾. Se producirían por defectos en la membrana basal que resultan de las mutaciones en las moléculas encargadas de la glicosilación, para la detención de las neuronas migratorias, y por lo tanto deben diferenciarse de la lisencefalia tipo I, donde el defecto se encontraría en las moléculas encargadas de la formación del citoesqueleto de la corteza⁽²¹⁰⁾.

3. Heterotipia.- Son poblaciones de células nerviosas localizadas en lugares anormales, en diferentes formas y tamaños de colecciones macroscópicas. En general y a grandes rasgos, cualquier situación anómala de las neuronas son heterotopias. Esta alteración se puede presentar aislada o asociada a otras anomalías estructurales. En un sentido amplio, todas las anomalías de la migración son heterotopias, ya que, todas ellas están compuestas de células nerviosas normales en localizaciones anormales. El conocimiento de las causas genéticas y embriológicas de esta malformación son poco conocidas, aunque en el caso de una de ellas, la heterotopia nodular periventricular, parece existir una anomalía neuroependimal, en el epitelio de la zona ventricular, acumulándose las neuronas en forma de nódulos^(224, 252). En esta malformación intervendrían alteraciones en las moléculas que intervienen en la formación del citoesqueleto, como son filamina A (FLNA) o ADP-ribosilación factor de guanina factor de intercambio 2 (ARFGEF2)^(252, 253).

Estas malformaciones vistas anteriormente se pueden producir en distintos estadios del desarrollo cortical, en los diferentes procesos que se producen en el desarrollo de la corteza. Bahi-Buisson y Guerrini⁽²⁵⁴⁾, en 2013, dividen la formación de la corteza cerebral en tres eventos fundamentales en los cuales se producirían las

malformaciones: 1). Proliferación de neuronas y de la glía en la zona ventricular y en la zona subventricular; 2). Migración multidireccional de neuronas inmaduras, que han acabado su proceso mitótico, a la corteza cerebral en desarrollo; 3). Organización cortical.

Otra clasificación es la realizada por Guerrini et al⁽²⁵⁵⁾, en 2014, realiza una clasificación en función de la gravedad clínica de los síntomas que presenta el paciente, dividiéndola en pacientes con discapacidades severas y pacientes con discapacidades menos severas. A su vez, divide la presentación clínica en dos grupos, según la presentación sea de aparición temprana o tenga una aparición más tardía.

Una clasificación parecida a la de Bahi-Buisson es la realizada por Barkovich et al⁽²²⁴⁾, en 2012, donde organiza estas malformaciones en relación a las etapas del desarrollo de la corteza y su relación con genes implicados, donde incluye en cada grupo las patologías más frecuentes:

Grupo I.- Malformaciones secundarias a la proliferación neuronal y glial anormal o la apoptosis. Un ejemplo serían, entre otras, microcefalia, megaloencefalia y las disgenesias corticales con proliferación celular anormal.

Grupo II.- Malformaciones debidas a una migración cortical anormal. Por ejemplo: heterotopia, lisencefalia, heterotopia subcortical y displasia sublobar, malformación en adoquines, etc.

Grupo III.- malformación secundaria al desarrollo cortical anormal. Por ejemplo: polimicroglía y esquizoencefalia, displasias corticales focales, microcefalia postmigracional, etc.

II.2.3.1. MALFORMACIONES DEBIDAS A UNA MIGRACIÓN CORTICAL ANORMAL.

Es en el segundo grupo de la clasificación realizada por Barkovich et al⁽²²⁴⁾, en

2012 (*malformaciones debidas a una migración cortical anormal*), en el que me centraré en las siguientes páginas para encuadrar el trabajo realizado. Revisaré las malformaciones que ocurren en éste periodo embrionario, cruciales para la vida posterior.

Verrotti et al⁽¹⁹⁹⁾, en el año 2010, resume la información recopilada en los últimos años sobre las moléculas que se encuentran involucradas en el control de la migración neuronal, y su orientación final en el destino de estas. Estas moléculas las divide en cuatro grandes categorías:

- Moléculas del citoesqueleto: estas moléculas tendrán una función importante en el inicio y a progresión de la migración neuronal. Estas moléculas serían: Filamina-A, ARFGEF2 o ADP-ribosilación factor de guanina factor de intercambio 2, doblecortina, LIS1, TUBA1A.

- Moléculas de señalización: intervendrían en la laminación de la corteza cerebral, y serían: reelina y algunos receptores de reelina, p35, cdk5, Brn1 / Brn2.

- Moléculas que modulan la glicosilación: estas moléculas parecen proporcionar las señales necesarias para la detención de las neuronas que se encuentran migrando. Estas moléculas serían: POMT1, POMGnT1, fukutina y quinasa de adhesión focal.

- Por último, pueden intervenir otros factores, como los neurotransmisores (glutamato y GABA), los factores tróficos (el factor neurotrófico derivado del cerebro y las hormonas tiroideas), las moléculas derivadas del metabolismo peroxisomal y los factores ambientales (etanol y cocaína)⁽²⁵⁶⁾.

Como hemos visto en la clasificación de Barkovich et al⁽²²⁴⁾, las malformaciones más frecuentes en la migración neuronal anormal son (Tabla 6):

Clasificación de malformaciones secundarias a anomalías de la migración neuronal
<p>1. Heterotopia periventricular:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Heterotopia nodular periventricular (PNH) predominantemente anterior y difusa. - PNH predominantemente posterior (temporal-trigonal) - Heterotopia periventricular no nodular o bilateral. - Heterotopia en banda ondulante o en cinta ribbon-like.
<p>2. Malformaciones secundarias a anomalías generalizadas de la migración transmanto: Lisencefalia (LIS).</p> <ul style="list-style-type: none"> - LIS clásica predominantemente anterior o difusa (cuatro capas) y heterotopia subcortical en banda (SBH). - LIS clásica predominantemente posterior o difusa (cuatro capas o dos capas) y SBH. - LIS ligado al X (tres capas) con agenesia del cuerpo calloso y genitales ambiguos. - LIS tipo reelina (laminación cortical invertida). - Variantes de LIS.
<p>3. Malformaciones secundarias a anomalías localizadas de la migración del transmanto: heterotopias.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Heterotopia subcorticales. - Displasia sublobar, clínicamente definida de causa desconocida.
<p>4. Malformaciones secundarias a anomalías de la migración terminal y defectos en la membrana limitante pial: malformaciones tipo Cobblestone o en empedrado.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anomalías del complejo distroglicano-laminina con malformaciones tipo adoquines con o sin distrofia muscular congénita. - Malformaciones tipo adoquines en los CDG. - Malformaciones tipo adoquines sin defectos en la glicosilación. - Otros síndromes con disgenesia cortical y heterotopia marginal glioneural con tipos celulares normales.

Tabla 6. Malformaciones de la migración neuronal. Tomada de Barkovich A. et al⁽²²⁴⁾.

Estas patologías, poseen unas características reconocibles macro y

microscópicamente, sin embargo, unos déficits menos perceptibles en el desarrollo de la migración neuronal pueden producir retraso mental y epilepsia^(197, 257), proponiéndose también en la esquizofrenia y a los trastornos del espectro autista como resultantes de una migración neuronal anormal^(197, 198, 258).

Podemos observar que determinadas malformaciones del desarrollo cortical pueden ser atribuidos a defectos en la migración neuronal en humanos, lo que puede desembocar en diferentes patologías que afecten a la persona que lo padezca.

En el año 2006, Tabarés-Seisdedos et al.⁽²⁴⁾, publicaron un artículo de investigación en el que pretendían probar la hipótesis de la existencia de una anomalía en el desarrollo y migración neuronal de la corteza en pacientes con esquizofrenia y trastorno bipolar.

Se basaron para plantearse esta hipótesis en varios estudios realizados hasta la fecha, como los estudios postmortem en pacientes con esquizofrenia y trastorno bipolar, donde se evidenció una alteración significativa de la migración neuronal en corteza prefrontal y giro dentado^(259, 260). Por otra parte, se ha visto que la lisencefalia puede provocar defectos en la migración neuronal hacia la corteza cerebral⁽²⁶¹⁾, con manifestaciones secundarias a estas alteraciones tales como epilepsia⁽²⁶²⁾ y retardo mental⁽²⁶³⁾, así como de esquizofrenia^(197, 198). Por otra parte, se ha evidenciado en diferentes estudios un aumento de riesgo de padecer esquizofrenia en pacientes y familiares de pacientes con epilepsia^(264, 265), así como un aumento de riesgo de padecer epilepsia en pacientes con esquizofrenia, lo que sugiere que pudiese existir un mismo factor genético en el origen de la esquizofrenia y la epilepsia^(24, 266, 267). En un meta-análisis y revisión sistemática, realizado por Clancy et al.⁽²⁶⁸⁾, en el año 2014, concluyeron que los pacientes con epilepsia tenían un aumento de riesgo de padecer psicosis unas ocho veces mayor, y un 6% de probabilidad de tener una psicosis comórbida.

Para ello analizaron dos regiones cromosómicas relacionadas con la migración

neuronal: la región crítica de lisencefalia, en el cromosoma 17p13.3, que abarca el gen *LIS1* y que participa en la lisencefalia humana; y los genes relacionados con el Factor Activador de Plaquetas (PAF, en sus siglas en inglés), que funcionalmente está relacionado con *LIS1*⁽²⁴⁾.

En este estudio incluyeron 52 pacientes con esquizofrenia, 36 pacientes con trastorno bipolar y 65 pacientes control, libres de enfermedad. Concluyeron que el 14,8% de los pacientes mostraban alteraciones en cualquiera de los dos marcadores relacionados con lisencefalia o en el gen receptor del PAF. Además, implementaron una batería de pruebas neuropsicológicas, tanto a los pacientes con esquizofrenia y trastorno bipolar, como a los pacientes control, sugiriendo que las variaciones en los genes implicados en la migración neuronal predicen la gravedad de los déficits cognitivos prefrontales en ambos trastornos⁽²⁴⁾.

A.) LISENCEFALIA:

Entre los trastornos de la migración neuronal figuran las formas de lisencefalia, caracterizadas por la ausencia prácticamente del total de surcos y distribución anómala de las capas de la corteza. Lisencefalia es un término que procede del griego y su determinación sintáctica se divide en "*Lissos*" (liso) y "*Enkephalos*" (cerebro), realizándose la primeras descripciones de la enfermedad en humanos en 1914, , con una prevalencia estimada en un rango de 11.7 a 40 por cada millón de nacimientos, aunque se cree se subestima su prevalencia real ^(269, 270) y una incidencia global se estima en torno a 1,2 por cada 100.000 nacimientos⁽²⁷¹⁾.

La lisencefalia es una malformación que en humanos se manifiesta por una superficie cerebral plana y alteraciones en la migración neuronal. Este término fue introducido por Owen en 1868 y distinguía los cerebros lisos "lisencefalia" de los cerebros plegados "girencefalia", correspondiendo los primeros a especies de mamíferos inferiores o fetos en evolución⁽²⁷¹⁾. En los últimos años, se han visto diferentes tipos de lisencefalia, que las podríamos dividir en diferentes grupos según su afectación clínica y genes implicados⁽¹⁹⁹⁾.

Tipo de lisencefalia.	Subtipos.	Genes involucrados.
Lisencefalia clásica o tipo I.	<ul style="list-style-type: none"> - Secuencia de lisencefalia aislada - Sd. de Miller-Dieker 	<ul style="list-style-type: none"> - LIS1, DCX, TUBA1A - Co-delección de LIS1 y YHAWAE
Lisencefalia en adoquines o tipo II.	<ul style="list-style-type: none"> - Sd. de Walker–Warburg - Enfermedad Músculo-Ojo-Cerebro - Distrofia muscular congénita de Fukuyama 	<ul style="list-style-type: none"> - POMT1, POMT2, FKTN, FKRP, LARGE - POMGnT1 - FKTN
Lisencefalia ligada al cromosoma X con agenesia del cuerpo caloso (XLAG)		- ARX
Lisencefalia con hipoplasia del cerebelo (LCH)		- RELN, VLDLR
Microlisencefalia	<ul style="list-style-type: none"> - Sd. de Norman-Roberts - Sd. de Barth - Enanismo osteodisplásico primario y microcefalia (MOPD tipo 1) 	- Indefinido

Tabla 7. Tipos de lisencefalia y genes involucrados. Tomada de Verrotti et al⁽¹⁹⁹⁾.

La alteración de los factores que intervienen y regulan la migración de las neuronas en la corteza cerebral en formación, suelen desembocar en una serie de patologías conocidas como lisencefalia. Se han identificado varios genes involucrados en esta etapa del desarrollo cortical en diversos estudios^(199, 210, 247, 255). Estos genes implicados son: "*LIS (17p13.3) que codifica para la proteína PFAH1B1: regula la dineína citoplasmática e influye en la función de los microtúbulos. Es el principal gen implicado en la lisencefalia. TUBA1A (12q12-q14): Unidad alfa 1 tubulina A, responsable del 1-4% de las lisencefalías; DCX: gen de la doblecortina (Xq22.3), interviene en la polimeración y*

estabilización de los microtúbulos.; ARX (Xp22.13): nuevo factor de transcripción homeobox; WDR2 (cr. 9) función desconocida; RELN: reelina (7q22.1) glicoproteína relacionada con la interacción célula a célula de la migración.; VLDLR (9p24): vía molecular de la reelina"⁽²⁷²⁾.

Guerrini y Parrini⁽²⁴⁷⁾, en el año 2010, realiza un esquema de las vías de señalización de LIS1 y Reelina en la migración neuronal, y del que comentan:

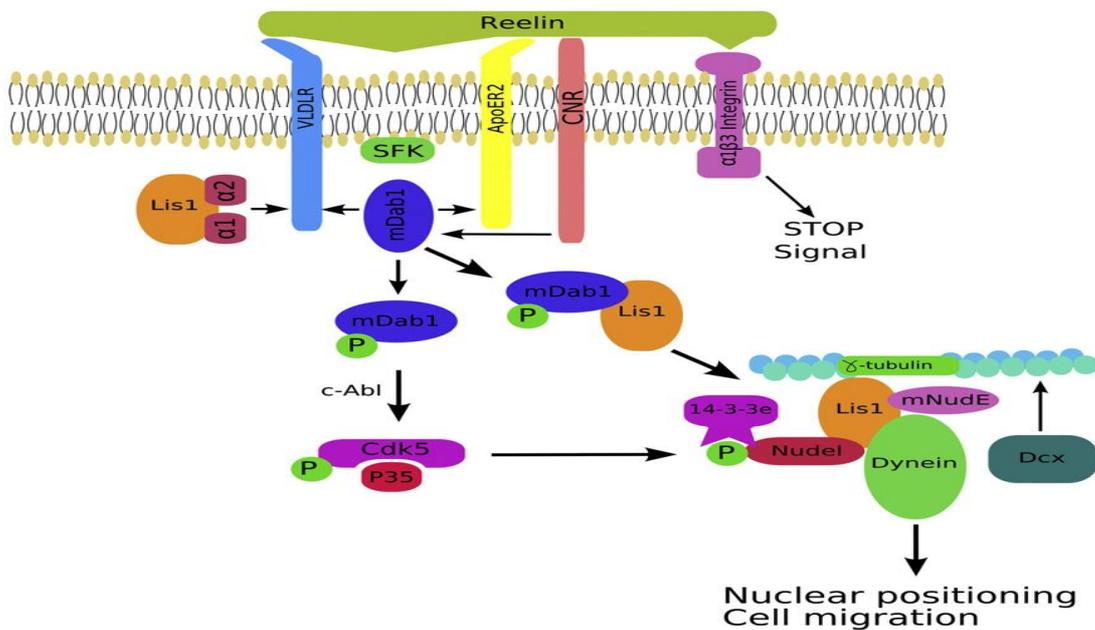


Figura 12. Vías de señalización LIS1 y Reln para la migración neuronal. Tomada de Guerrini y Parrini, 2010⁽²⁴⁷⁾.

"Lis1 y Reln son vías de señalización para la migración neuronal. La Reelina (Reln) extracelular se une a uno de los tres complejos receptores: receptor neuronal relacionado con la cadherina (Cnr), Vldlr/ApoER2 o 3βintegrin. Esta unión activa mDab1, que puede activar Cdk5/p35. Cdk5 puede fosforilar muchas dianas intracelulares incluyendo Nudel. Nudel fosforilado forma un complejo con Lis1, mNudE, dineínas y microtúbulos. Este complejo es necesario para la migración celular y el posicionamiento nuclear. También se cree que Dcx interactúa con Lis1 y modula la función de los microtúbulos. Además, la unión de Reln con VLDLR y ApoER2 causa la activación de src-Familykinase (SFK) y la fosforilación de Dab1. Tras la estimulación Reelina, Dab1 fosforilado interactúa con Lis1. Lis1 también se une a las subunidades catalíticas del complejo Pafah1b (a1 y a2), así como a componentes del complejo de dineína citoplasmática. Las subunidades a1 y a2 también se unen a VLDLR y compiten con Dab1 para la ocupación del receptor. La unión de las subunidades catalíticas de Pafah1b a VLDLR puede desplazar P-Dab1 y promover su interacción con Lis1"⁽²⁴⁷⁾.

Estudios recientes, encaminados a analizar la formación de los surcos y

circunvoluciones han puesto en evidencia la existencia de una glía radial basal, que migraría desde la región subventricular a la capa del manto y la placa cortical, y serviría de sustrato para la migración divergente de las neuronas corticales en la formación de las circunvoluciones cerebrales en cerebros girencefálicos⁽²⁷³⁾. Las alteraciones de la migración de esta glía radial basal podrían explicar la falta de la formación adecuada de las circunvoluciones cerebrales.

B.) Gen LIS1.

- El gen *LIS1* se ha localizado en la región 17p13.3 del cromosoma 17, y fue el primer gen relacionado con la migración de las neuronas clonado en humanos^(274, 275). Es una proteína que está implicada en diversos procesos celulares e interacciones proteína-proteína. Su déficit es inviable con la vida de los organismos que la expresan, incluso la media dosis puede ser mortal, aunque si se expresa en parte, las afecciones son menos severas, es decir, hay una respuesta dependiente a niveles de reducción de *LIS1*⁽¹⁹⁸⁾. Su ausencia en diferentes grados puede ocasionar alteraciones en la migración neuronal, afectando a la migración radial y también a la migración tangencial de interneuronas inhibitoras^(198, 276). Es una proteína expresada de forma ubicua, y se ha aislado en todos los tejidos examinados de pacientes afectados de lisencefalia, aunque su expresión es más acentuada en el cerebro, corazón y músculo esquelético.

- *LIS1* codifica una proteína de 45 kDa (PAFAH1B), que se identificó como la subunidad reguladora (subunidad Ib) de la enzima PAFAH (factor activador de plaquetas acetil hidrolasa)^(198, 247). Esta enzima es un tetrámero que se compone de un dímero *LIS1* (la subunidad β), y de dos subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y su integridad sería determinante para una actividad cerebral normal⁽¹⁹⁸⁾. Su regulación viene determinada por el equilibrio entre su síntesis (por medio de fosfolipasas) y su degradación (por acetilhidrosilasas).

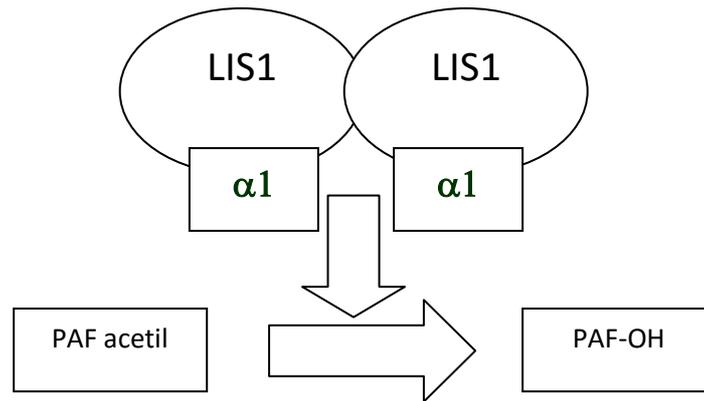


Figura 13. Mecanismo de acción de la PAF acetilhidrolasa.

El factor activador de plaquetas (PAF) es un mediador potente de fosfolípidos, que actúa uniéndose a un receptor transmembrana acoplado a una proteína G (PAFR)⁽¹⁹⁸⁾. Una de sus funciones más fundamentales es asegurar la viabilidad del cigoto en fase embrionaria y su desarrollo normal. También puede actuar como mensajero intercelular^(277, 278), y se ha visto en neuronas cultivadas in vitro, que análogos del receptor de PAF puede interrumpir la migración neuronal⁽²⁷⁹⁾. Como he comentado anteriormente, en el estudio de Tabarés-Seisdedos et al⁽²⁴⁾, se ha descrito anomalías en deleciones de *LIS1*, dentro de la región codificante del gen PAFR, correlacionándolo con la esquizofrenia y los trastornos bipolares⁽²⁸⁰⁾.

- *LIS1* también regula la migración nuclear a través de su interacción con la tubulina del citoesqueleto neuronal^(212, 281). Un homólogo de *LIS1*, *NudF*, se identificó unida a una dineína citoplasmática, en el hongo *Aspergillus nidulans*^(282, 283), permitiendo la migración nuclear durante el crecimiento vegetativo, así como el desarrollo⁽²⁸⁴⁾. Un gen adicional que se encontró en esta unión, *NudE*, tiene dos homólogos en mamíferos, como son *Nde1* y *Ndel1*⁽²⁸⁵⁾.

En mamíferos, la dineína citoplasmática es responsable del movimiento migratorio celular, y *LIS1*, mediante la acción de *Ndel1*, permite la unión estable con la dineína motor de los microtúbulos del citoesqueleto, creando el complejo *LIS1/Ndel1/Dineína*. Este complejo permite la función de la dineína motor para el transporte (migración) de las neuronas^(198, 286). Una quinasa, la *Cdk5*, fosforila a *Ndel1* y

ayuda a mantener el acoplamiento del complejo.

Se ha visto a su vez que Ndel1 interacciona con una DISC1, que ya hemos visto con anterioridad que su alteración se relaciona con la esquizofrenia⁽¹²⁵⁾, por lo que se relaciona a Ndel1 con esta enfermedad^(198, 287, 288). Además de interaccionar DISC1 con Ndel1, también lo hace con LIS1⁽²⁸⁷⁾. Kamiya et al⁽²⁸⁹⁾, en 2005, concluyó que DISC1 era un componente de los microtúbulos asociados a la dineína motor de los microtúbulos, siendo esencial para mantener el complejo en el centrosoma, contribuyendo así a la dinámica microtubulares normales. Además, la reducción de DISC1 inhibe la migración neuronal radial⁽²⁸⁹⁾ y a una interrupción del acoplamiento nuclear a los microtúbulos, como ocurre cuando se reduce LIS1 o Ndel1⁽¹⁹⁸⁾.

- Otra ruta importante donde interviene LIS1 es en la vía de señalización de la Reelina. Las células de Cajal-Retzius producen la Reelina, que es proteína extracelular que participa en la migración neuronal. Esta se une a unos receptores transmembrana, llamados VLDLR y ApoER2, que provoca la fosforilación de la proteína intracelular de señalización Dab1⁽²⁹⁰⁾. Dab1 fosforilado puede interaccionar mediante dos vías con LIS1: (1) facilitando la función del citoesqueleto, y permitiendo el movimiento de las neuronas en el cerebro en desarrollo; (2) por una parte, puede interactuar directamente con PAFAH1B1 (recordemos que es parte de LIS1)⁽²⁹⁰⁾. La asociación entre LIS1 y la vía de la Reelina, vincula a LIS1 con la esquizofrenia y el autismo^(198, 291); por otra parte, Dab1 activa la quinasa Cdk5/p35, que fosforila a Ndel1, y formando parte del complejo anteriormente mencionado junto a LIS1 y dineína, interviniendo de esta forma en la migración nuclear mediante el movimiento de los microtúbulos⁽²⁴⁷⁾.

II.3. MODELO DE RATÓN CON MUTACIÓN EN *Lis1*.

La mutación del gen *Lis1* en ratones ha permitido comprobar que los embriones homocigóticos para el alelo mutado mueren inmediatamente después de la implantación, mientras que los individuos heterocigóticos son viables y fértiles^(292, 293). La reducción en la dosis de *Lis1*, con la producción de proteína truncada, afecta a la migración neuronal en la corteza en desarrollo, mientras que su organización laminar es normal en el ratón adulto. Una reducción importante en la dosis de *Lis1* produce alteraciones severas en la organización de la corteza y el hipocampo^(292, 294-296).

En el laboratorio de la Dra. O. Reiner (Departamento de Genética Molecular del Instituto de Ciencia Weizman, Rehoboth, Israel) se ha producido, por recombinación homóloga, usando la recombinasa `cre` para una delección loxP, un ratón mutante cuya mutación provoca la producción de una proteína *Lis1* más corta. Este mutante nos ha servido de modelo para estudiar las alteraciones que tienen lugar durante su desarrollo embrionario y postnatal en los casos de mutación del gen *Lis1*, y caracterizar electrofisiológicamente la corteza cerebral del mutante. Ello nos ha permitido comprobar que la reducción de la dosis de *Lis1*, con la producción de una proteína truncada, s*Lis1*, que afecta a la migración neuronal de la corteza en desarrollo^(294, 295).

El estudio de este ratón mutante *Lis1/sLis1*, fue iniciado en nuestro laboratorio por la Dra. Teresa Escámez, quien realizó estudios a nivel embrionario obteniéndose, entre otros, los siguientes resultados:

a. Alteraciones en la formación de la placa cortical y retraso en la inervación cortical por fibras talámicas en embriones *Lis1/sLis1*.

b. Alteraciones en el movimiento nuclear y en la migración neuronal radial en embriones *Lis1/sLis1*.

c. Alteraciones en el crecimiento axonal y morfología neuronal en embriones *Lis1/sLis1*.

Estudios posteriores han ido sumando datos para comprender mejor los mecanismos causales de la alteración en la migración y la ectopia neuronal^(180, 297, 298) (Dominguez et al., *Lis1 neuronal heteropatias impairs inhibitory system in neocortex producing a non-drastic functional phenotype*, en revisión en *Neuronal Cortex*): las alteraciones de la migración son más evidentes en las capas superficiales de la corteza cerebral, donde las interneuronas inhibitorias son más escasas en los ratones mutantes que en los WT.

Las consecuencias funcionales de estas alteraciones estructurales^(24, 297, 299) (Dominguez et al., en revisión): en los ratones *Lis1/sLis1* existe una sobre excitación local de las neuronas piramidales, consecuencia de una alteración de la innervación GABAérgica, con menor velocidad de conducción cortico-cortical, mayor coherencia entre capas y un retraso en la innervación septo-hipocámpal.

Todo ello nos permite proponer este modelo animal como modelo en esquizofrenia, en el que el mecanismo causal es un fenotipo no muy severo de alteración de la migración que se manifiesta más por sus alteraciones funcionales que por las estructurales.

II.4. ALUCINACIONES AUDITIVAS COMO FENOTIPO ALTERNATIVO DE LA ESQUIZOFRENIA.

La utilización de un fenotipo alternativo o endofenotipo puede ayudar en la investigación de enfermedades complejas^(300, 301). Weiser et al.⁽³⁰²⁾, define los endofenotipos como un componente medible de la ruta patofisiológica que se toma como base para correlacionar los resultados obtenidos. Este componente puede consistir en un síntoma de la esquizofrenia.

Las alucinaciones son definidas en el DSM-5⁽³⁰³⁾ como *"percepciones que tienen lugar sin la presencia de un estímulo externo. Son vividas y claras, con toda la fuerza y el impacto de las percepciones normales, y no están sujetas al control voluntario"*. Puede ser de cualquier modalidad sensorial, pero las más frecuentes en la esquizofrenia son las alucinaciones auditivas. También pueden apreciarse en trastornos neurológicos e incluso en la población general, pero en ambos casos son más frecuentes las alucinaciones visuales⁽³⁰⁴⁻³⁰⁶⁾.

Representan parte del criterio diagnóstico para esquizofrenia, fácilmente identificable, y a pesar de no ser específico para esta enfermedad, es muy frecuente su presencia, afectando a más del 70% de los pacientes⁽³⁰⁷⁾.

Las alucinaciones auditivas, en nuestro caso, constituyen un fenotipo alternativo para el estudio de la esquizofrenia.

Estudios de neuroimagen en alucinaciones auditivas

Se han realizado múltiples estudios de neuroimagen, tanto estructural como funcional para poder determinar alteraciones que ocurren en el cerebro de estos pacientes, así como poder determinar las áreas cerebrales involucradas en este tipo de alucinación.

En estudios de imagen estructural se ha observado una reducción del tamaño de la corteza temporal en pacientes con alucinaciones auditivas, más concretamente en el giro temporal superior o circunvolución de Heschl⁽³⁰⁸⁻³¹⁰⁾.

En estudios de neuroimagen funcional mediante diferentes técnicas (SPECT, fMRI, PET, etc.) se ha visto una activación del giro temporal superior o circunvolución de Heschl en hemisferio derecho e izquierdo, que implica a la corteza auditiva primaria^(307, 311-316). Esta activación se ha asociado con la activación en diferentes áreas, como es la corteza de asociación sensorial (área auditiva secundaria), el sistema límbico y áreas del lenguaje, tanto motoras (área de Broca) como sensoriales (área de Wernicke) para las alucinaciones auditivas^(159, 310, 317, 318).

III.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

III.1. HIPÓTESIS

La hipótesis es que la disminución significativa de interneuronas en las capas superficiales de la corteza cerebral, y en nuestro caso la corteza auditiva primaria, causarían un incremento de la actividad neuronal en el ratón mutante (Lis1/sLis1) comparado con ratones Wild Type (WT), en condiciones basales.

El estudio de la región auditiva del cerebro humano con lisencefalia mostraría el mismo déficit de neuronas inhibitorias en las capas superficiales de la corteza, lo que nos permitiría especular con la posibilidad de una mayor actividad cortical basal y, por lo tanto, proponer esta anomalía en la migración neuronal como la base estructural de las alucinaciones auditivas en la esquizofrenia.

III.2. OBJETIVOS DE LA TESIS

1. Describir las alteraciones estructurales de la corteza auditiva de los ratones mutantes Lis1/sLis1.
2. Estudio de la actividad basal de la corteza auditiva en ratones mutantes Lis1/sLis1 en condiciones ambientales basales.
3. Descripción de las alteraciones estructurales de la corteza temporal en el cerebro de un paciente diagnosticado de lisencefalia tipo I.
4. Desarrollar una hipótesis fisiopatológica para explicar las anomalías estructurales que puedan estar implicadas en las alucinaciones auditivas en la esquizofrenia.

IV.- MATERIAL Y MÉTODO

El objetivo del estudio es ampliar el estudio ya realizado por Tabares et al⁽²⁴⁾, aplicándolo a investigación básica en ratones modificados genéticamente con la alteración en región crítica para la lisencefalia (cromosoma 17p) que abarca el gen Lis1, y los genes relacionado con el factor activador de plaquetas (PAFR).

Pretendemos estudiar las cortezas auditivas de estos ratones en condiciones de ruido ambiente normal, y evaluar la activación de las neuronas corticales en estado de no excitación específica (resting stage). Analizaremos mediante la expresión de genes de respuesta rápida (c-fos) la actividad neuronal. Con marcadores específicos de tipo neuronal determinaremos que tipo de neuronas está implicado en los cambios de actividad observados. Para ello, utilizaremos los siguientes grupos:

a). Ratones grupo control: 10 ratones WT.

b). Ratones experimentales: 10 ratones mutantes Lis1/sLis1 distribuidos en los grupos experimentales como se describe posteriormente.

IV.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN (RATONES MUTANTES Lis1/sLis1).

Todas las manipulaciones sobre los ratones han sido supervisadas y aprobadas por el comité ético de experimentación animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Se han cumplido las normativas éticas de experimentación: Directiva española, Real Decreto 1201/2005; Directiva de la Comunidad Europea 86/609/EEC.

Para realizar este trabajo hemos utilizado ratones mutantes del gen Lis1, el cual se generó por recombinación homóloga en el laboratorio de la Dra. Orly Reiner del Instituto Weizmann, Rehoot, Israel⁽²⁹⁴⁾. Los ratones han sido criados en el animalario de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Campus de San Juan de Alicante) facilitados en su día por la Dra. Reiner. Todos los animales eran animales sanos que no fueron manipulados con ningún fármaco antes de la realización de los experimentos que hemos llevado a cabo.

Para identificar todas las neuronas GABAérgicas se desarrolló un modelo de ratón doble transgénico cruzando machos mutantes Lis1/sLis1 con hembras que expresan GFP (Green Fluorescent Protein, siglas en inglés) bajo el promotor de la CAD67⁽³¹⁹⁾, con el fondo genético de C57BL6. En cada camada los animales que mostraban ambas mutaciones eran seleccionados para experimentación.

IV.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El diseño experimental de esta memoria de Tesis Doctoral está dividido en varios bloques que corresponden a las distintas partes de las que consta este trabajo:

- Estudio morfológico de la corteza auditiva de mutantes heterocigóticos mediante técnicas de inmunohistoquímica y tinciones citoarquitectónicas tradicionales.

- Determinación de la expresión de c-fos como marcador de la actividad neuronal en la corteza auditiva, en condiciones normales. En ratones WT y ratones Lis1/sLis1 en las mismas condiciones de ruido ambiental.

- Estudio morfológico de la corteza auditiva de un cerebro humano diagnosticado de lencefalia mediante genética molecular y con alteraciones estructurales características de la lencefalia.

IV.2.1. Estudio morfológico del encéfalo de mutantes heterocigóticos mediante técnicas de inmunohistoquímica y tinciones citoarquitectónicas tradicionales.

IV.2.1.1. Obtención de muestras.

Para este tipo de estudios se han utilizado ratones adultos de 30 días de edad postnatal (P30), los cuales se anestesiaron de forma terminal mediante inhalación de éter etílico (PANREAC) y se fijaron por perfusión intraventricular. En primer lugar se pasaba una solución de lavado (PBS 0.1M pH 7.4) durante 5 minutos y a continuación se

introducía la solución fijadora, que en todos los casos fue paraformaldehído 4% (PFA 4%) 0,1 molar, pH 7,4, que se dejaba pasar unos 30 minutos. A continuación se extraía el encéfalo y se mantenía en PFA 4% a 4°C de 14 a 16 horas. Después las muestras se procesaban para inclusión en parafina o para la realización de cortes por congelación. Para este segundo procedimiento se procedía a la criopreservación de las muestras. Los cerebros se cortan a 7 µm en micrótomos de parafina o 30 µm en micrótomos de congelación.

Los cortes procesados se montarán sobre portas y se analizarán para conteo neuronal y la obtención de datos numéricos para tratamiento estadístico.

IV.2.1.2. Fijación y fijador.

La finalidad de la fijación es bloquear el desarrollo de los procesos orgánicos (autólisis, putrefacción y descomposición), por interrupción de los procesos enzimáticos, fijando y conservando de la manera más fidedigna posible el estado y la situación en que se encontraban los tejidos en el organismo vivo.

Para la realización de este trabajo se ha utilizado como fijador PFA. El PFA es el producto de polimerización, por acción del frío, de soluciones concentradas de formaldehído (CHOH). Se prepara al 4% en tampón Fosfato Salino (PBS) pH 7,4, 0,1M y se deja actuar 24 horas, como máximo, a 4°C.

IV.2.1.3. Inclusión y sección en parafina.

Después de fijados, los encéfalos disecados fueron deshidratados en etanol de concentraciones crecientes (70%, 80%, 96% y 100%), dando dos baños de una hora aproximadamente en cada uno de los alcoholes a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se sumergieron en butanol (MERCK), alcohol miscible con la parafina, de 4 a 16 horas. Una vez deshidratado el tejido, se sustituyó el butanol por parafina (SHERWOOD Medical). Para eliminar el butanol de las muestras y sustituirlo completamente por parafina, éstas fueron sometidas a tres baños en ese medio de inclusión de unos 30 minutos a 60°C y a sucesivos vacíos de -70 atmósferas en una

estufa de vacío. Cuando el tejido estuvo completamente impregnado de parafina se orientó la pieza en un molde metálico lleno de parafina líquida y se dejó solidificar el bloque enfriándolo sobre una placa refrigeradora.

La sección de estos bloques se realizó en un micrótomos de parafina, obteniéndose cortes seriados de 7 μm , que se montaron sobre portaobjetos (limpios con etanol) con una solución acuosa de albúmina de huevo [clara de huevo, glicerol al 30% (C₃H₈O₃, PROLABO) y timol (C₁₀H₁₄O, MERCK)] al 3% en agua destilada sobre una placa a 50°C. Así se obtuvieron series paralelas de cada muestra que una vez fijadas al portaobjetos se dejaron secar a 37°C durante un día, como mínimo. Para comenzar cualquiera de los procesos que más adelante se describen, las secciones fueron desparafinadas por baños sucesivos en xilol (MERCK) y posteriormente hidratadas desde etanol de 100% hasta 70% (con lavados de 10 minutos en cada uno de los alcoholes decrecientes) para, finalmente, ser introducidos en PBS.

IV.2.1.4. Inclusión y sección de las muestras en Criótomo.

Después de fijados los encéfalos disecados, se lavaron bien en PBS para retirar todos los restos de fijador. Posteriormente se procedió a la crioprotección del tejido mediante la inclusión en PBS + Sacarosa al 20%, donde estuvieron 24 horas a 4°C. Seguidamente se pasaron a PBS + Sacarosa al 30%, donde estuvieron otras 24 horas a 4°C. Una vez el tejido estuvo crioprotegido, se realizaron cortes flotantes de 30 μm de espesor en un Criótomo de congelación (MICROM). De cada cerebro se fueron haciendo 4 series recogidas en placas multipocillos con PBS. Para su posterior identificación el hemisferio derecho de cada cerebro se atravesaba con una aguja entomológica.

IV.2.1.5. Técnica inmunohistoquímica.

Este tipo de técnicas se basan en la afinidad específica entre el antígeno y el anticuerpo. Si una solución que contiene un anticuerpo marcado se aplica a un tejido que contenga el antígeno adecuado, el anticuerpo reconocerá al antígeno, por lo que el marcaje será detectado en aquellos lugares en los que el anticuerpo se haya unido al antígeno, ya que la unión antígeno-anticuerpo es específica.

Descripción de la técnica:

En este trabajo se ha utilizado la técnica del “complejo avidina-biotina” (ABC), que es un método indirecto basado en la afinidad de la avidina (glicoproteína de la clara de huevo) o estreptavidina (proteína microbiana que no contiene carbohidratos) por la biotina (vitamina que forma el coenzima o grupo prostético de varios enzimas que transfieren grupos carboxilo). Cada molécula de avidina consiste en cuatro subunidades idénticas, cada una capaz de unirse a una molécula de biotina, pudiendo ser biotinilada (proceso por el que se conjugan inmunoglobulinas y otras proteínas con la biotina). El ABC está formado por una mezcla de avidina con peroxidasa biotinilada (HRP). Con este método se observa un elevado marcaje, ya que contiene más de tres moléculas de HRP por lugar biotina unida (Figura 14). El ulterior revelado de la HRP, mediante su reacción con una solución de DAB (3-3' diaminobencidina, SIGMA) y agua oxigenada, nos permite localizar el antígeno por una reacción de color. Esta técnica se realizó sobre secciones transversales de tejido cerebral de ratón fijado con PFA 4% y cortado en criótomo de congelación.

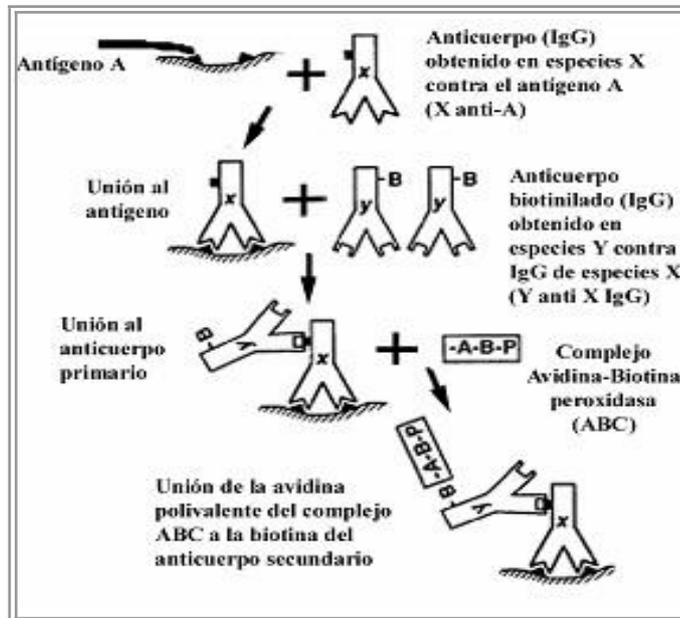


Figura 14. Técnica inmunohistoquímica.

El protocolo seguido ha sido el siguiente (Tabla 8):

TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA.
<ul style="list-style-type: none">- Inactivación de la peroxidasa endógena para evitar un precipitado inespecífico en el revelado: Incubación de las secciones durante 30 minutos con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS, a temperatura ambiente y en oscuridad. Lavados con PBS y Tritón (SIGMA). Dependiendo del anticuerpo, el Tritón será al 1%, al 0.1% o sin Tritón en los lavados. - Bloqueo con lisina para evitar una posible unión inespecífica del anticuerpo al tejido: Incubación durante una hora en L-lisina 0.1M en PBS + Tritón 1% ó 0.1% + BSA (Suero fetal bovino, SIGMA) 1% + Azida sódica (SIGMA) 0.1% - Incubación con el anticuerpo primario disuelto en PBS + Tritón + BSA +Azida. La concentración y las condiciones óptimas varían según el anticuerpo y se especifican más adelante. Lavados con PBS ó PBS + Tritón. - Incubación con el anticuerpo secundario disuelto en PBS + Tritón + BSA. El anticuerpo y su concentración dependerán del anticuerpo primario usado. El tiempo de incubación fue de una hora en todos los casos. Lavados con PBS ó PBS+Tritón. - Incubación en el complejo avidina-biotina (kit ABC estándar, VECTOR), disuelto en PBS + Tritón + BSA en una concentración de 1:500, durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad. Estas condiciones se mantuvieron en todo los casos. - Lavados con PBS ó PBS+ Tritón - Lavados en tampón Tris-HCl 0.05M. - Reacción de revelado, mediante la incubación de los cortes en una solución de 3-3' diaminobencidina (DAB, SIGMA), diluida al 1% en tampón Tris-HCl 0.05M y peróxido de hidrógeno al 0.9%, durante un tiempo variable a temperatura ambiente y oscuridad. - La reacción se para en tampón Tris-HCl 0.05M, se deshidratan los cortes y se montan con EUKIT.

Tabla 8. Técnica inmunohistoquímica.

Anticuerpos utilizados:

Los anticuerpos utilizados en este trabajo han sido:

- Anti-Calretinina (CR) (SWANT SWIS Abs.) y anti-Calbindina (CB) (SWANT SWIS Abs): anticuerpos policlonales contra calretinina y calbindina, que son proteínas quelantes de calcio. Estos anticuerpos fueron usados como marcadores inespecíficos de poblaciones neuronales (interneuronas principalmente).

- Anti-GFP (Molecular Probes): anticuerpo monoclonal control de la proteína verde fluorescente de los ratones GFP. Este anticuerpo fue utilizado para detectar las células procedentes del trasplante de LGE realizado con el ratón GFP como donante, y los ratones WT o Lis1/sLis1 como huésped.

- Anti-mGluR2 (Chemicon International INC): anticuerpo policlonal contra receptores metabotrópicos de Glutamato tipo 2. Este anticuerpo se ha empleado para detectar poblaciones de neuronas excitadoras.

- Anti-Parvalbúmina (Pv) (SWANT SWIS Abs): anticuerpo policlonal contra la proteína parvalbúmina. Empleada en la detección de poblaciones de interneuronas, como son las interneuronas de disparo rápido (fast spiking).

- C-fos (Goat antirabbit) de ThermoFisher: anticuerpo policlonal contra la proteína c-fos: péptido sintetizado de la región central de la proteína c-fos humana.

Cada uno de los anticuerpos fueron utilizados en una concentración diferente y con un anticuerpo secundario distinto, según fuesen monoclonales o policlonales. En el primer caso se utilizó como anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse (GAM): inmunoglobulina IgG de cabra anti-ratón biotinilada (VECTOR). Cuando el anticuerpo primario era policlonal, se utilizó como secundario el anticuerpo Goat Anti-Rabbit (GAR): inmunoglobulina IgG de cabra anti-conejo biotinilada (VECTOR). Las concentraciones usadas y otras modificaciones puntuales se resumen en la siguiente tabla:

ANTICUERPO	FIJADOR	ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO	ABC	REVELADO
CR	PFA 4%	1:2000	GAR - 1:300	1:500	DAB + H2O2
CB	PFA 4%	1:2000	GAR - 1:300	1:500	DAB + H2O2
c-fos	PFA 4%	1:400	GAR - 1:300	1:500	DAB Niquel
GFP	PFA 4%	1:1000	GAM - 1:300	1:500	DAB + H2O2
mGluR2	PFA 4%	1:2000	GAR - 1:300	1:500	DAB + H2O2
Pv	PFA 4%	1:2000	GAR - 1:300	1:500	DAB + H2O2

Tabla 9. Tipo de fijador utilizado para cada anticuerpo.

IV.2.1.6. Tinción con Cresil violeta.

Para la realización de esta técnica los cortes flotantes se montaron ordenadamente en portas, empleando una mezcla de gelatina-alcohol, y se dejaron secar para que quedasen totalmente adheridos al porta entre 14 y 16 horas. Una vez secos se introdujeron en el colorante violeta de cresilo (MERCK) durante el tiempo necesario para su tinción (entre 5 y 15 minutos, dependiendo del grosor del corte) y posteriormente, se deshidrataron y diferenciaron su coloración en una batería de alcoholes de concentración ascendente hasta etanol 100%. Finalmente se sumergen en xilol y se montan con EUKIT (O. Kindler HmbG, y CO, Freiburg).

Este tipo de tinciones nos permite realizar un estudio citoarquitectónico del encéfalo del ratón Lis1/sLis1 y compararlo con el WT.

IV.2.2. Determinación de la expresión de c-fos como marcador de la actividad neuronal en la corteza auditiva, en condiciones normales. En ratones normales y ratones Lis1/sLis1 en las mismas condiciones de ruido ambiental.

Para determinar la actividad neuronal se realizará inmunohistoquímica con anticuerpo primario anti c-fos siguiendo los protocolos convencionales para cortes flotantes, siguiendo los tiempos y los procedimientos descritos en el apartado anterior. Para incrementar la inmuno-reactividad nuclear de c-fos se utilizó la técnica de intensificación de DAB-Niquel (2,5%).

El conteo de células positivas para c-fos se realizó en al menos cuatro secciones por animal. Un total de diez animales fueron utilizados, tanto WT como mutantes. Para esta cuantificación se usó el programa Image J y el análisis estadístico se realizó con el programa Sigmaplot v11.0. Se realizaron comparaciones pareadas de las medias de los conteos de células positivas para c-fos, entre el mutante Lis1/sLis1 y sus hermanos controles. Los datos fueron presentados como la media de valores más el error standard (SE) y el test t de Student fue usado para comparar el mutante Lis1/sLis1 y sus controles (n=4; *P<0.05).”

IV.2.3. Estudio morfológico de la corteza auditiva de un cerebro humano diagnosticado de lisencefalia mediante genética molecular y con alteraciones estructurales características de la lisencefalia.

Se presenta una descripción detallada de un caso de lisencefalia en el que la mutación en el gen Lis1 fue caracterizada molecularmente y la calidad del tejido nos ha permitido realizar el estudio histológico adecuado. Esta paciente, diagnosticada de síndrome de Miller-Dieker presentaba la delección del alelo materno del marcador D17S11866 (figura 15). El procedimiento seguido para el estudio histológico del cerebro fue el siguiente:

- Perfusión: el encéfalo se perfundió a través de las arterias del Polígono de Willis con un litro de PBS frío (4°C) y posteriormente con 5 litros de PFA 4% filtrado y frío durante una hora.

- Procesamiento y corte: Se realizaron cortes coronales y fotografías macroscópicas del encéfalo. Se seccionaron bloques de 1 x 2 cm y 0.5 cm de espesor y se crioprotegieron en sacarosa al 20% en PBS. Se han catalogado y conservado a -20°C estos bloques para su estudio. Los bloques de las regiones afectadas (temporo-parietales) y no afectadas (temporo-occipitales) se cortaron en secciones de 30 mm de espesor para realizar técnicas histológicas en series paralelas, según los protocolos descritos:

-Serie A: Cresil Violeta.

-Serie B: Calbindina.

-Serie C: Calretinina.

-Serie D: Parvalbúmina.

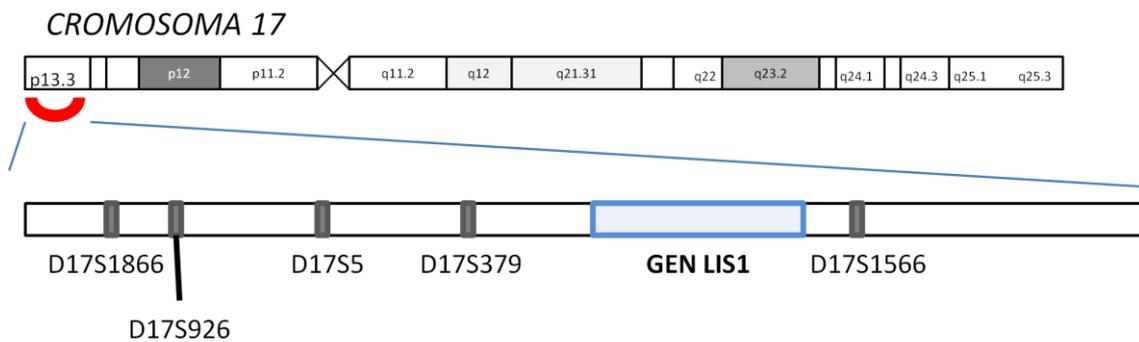


Figura 15. Localización de los marcadores de ADN genómico del gen Lis1.

V.- RESULTADOS.

V.1. CORTEZA AUDITIVA DEL RATÓN MUTANTE *Lis1/sLis1*.

V.1.1. Localización de la corteza auditiva en el cerebro del ratón.

La corteza auditiva primaria (A1) se identifica por la región cortical de terminación de las fibras de proyección del núcleo geniculado medial. Se han identificado diferentes subregiones dentro de la corteza auditiva, sin embargo en nuestro estudio nos vamos a centrar en sus regiones más ventrales y posteriores, donde se encuentran las zonas de recepción de la distribución tonotópica⁽³²⁰⁾.

En los roedores el área identificada como A1 se localiza en la región parietal posterior. Su extensión es significativamente menor que el área identificada como corteza somestésica primaria (S1), que se sitúa dorsal y rostral a A1 y el área visual primaria que se localiza dorsal y caudal a A1. Está situada dorsal al surco rinal en la cara lateral de la vesícula telencefálica.

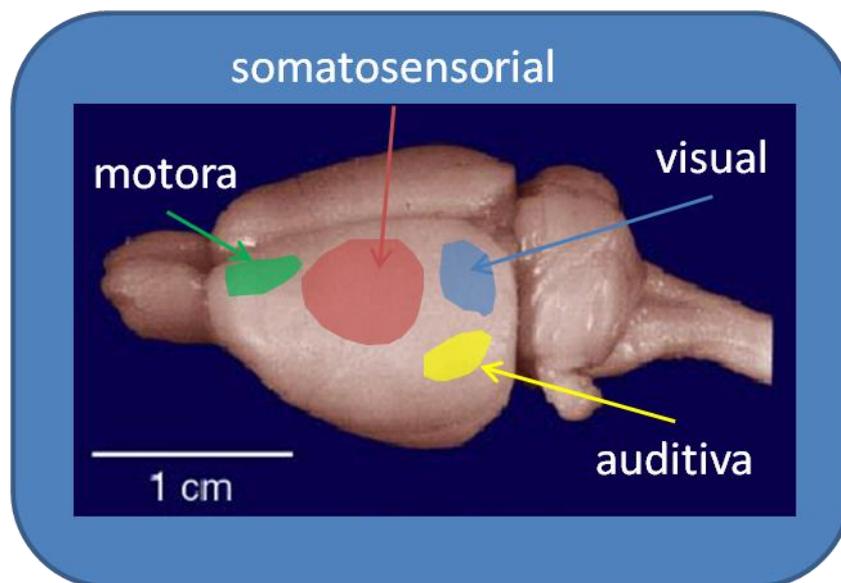


Figura 16. Áreas corticales del ratón. Modificada de Comparative Mammalian Brain Collections.

V.1.2. Descripción de la citoarquitectura de la corteza cerebral del ratón mutante Lis1/sLis1.

La citoarquitectura de la corteza A1 del ratón WT se caracteriza por una elevada densidad celular en la capa IV. Varias clases de células piramidales y no piramidales se distribuyen a través de las seis capas de la corteza auditiva. Las células piramidales con glutaminérgicas y se concentran en las capas III y V, mientras que las células GABAérgicas son principalmente no piramidales y representan aproximadamente una cuarta parte de las neuronas en la mayoría de las capas excepto la capa I (Figura 17 WT). La capa I tiene la densidad celular más baja, donde encontramos pequeñas neuronas GABAérgicas y las células horizontales de Cajal Retzuis. La capa II contiene neuronas piramidales y no piramidales. Las células más pequeñas se localizan superficialmente en la capa II y las células piramidales más grandes predominan cerca de la frontera con la capa III. La capa III está poblada por varios tipos de células piramidales y no piramidales. Las células piramidales más grandes son más profundas en la capa III en el borde con la capa IV. Sus dendritas apicales se extienden hasta la capa I donde se ramifican horizontalmente, mientras que las dendritas basales se extienden ampliamente dentro de las capas III y IV contribuyendo a la banda horizontal que comprende las capas III y IV. Las células piramidales más pequeñas pueblan las partes más superficiales de la capa III. Las células no piramidales de la capa III incluyen neuronas estrelladas y multipolares de varios tamaños y tienden a ser GABAérgicas. La capa IV está poblada principalmente por pequeñas células ovaladas, que tienen el soma orientado radialmente y campos dendríticos y tienen principalmente proyecciones columnares locales. La capa V contiene neuronas piramidales y no piramidales. Los somas de las grandes neuronas piramidales situadas en la capa V tienen dendritas apicales que se extienden hasta la capa I, con varias ramas a lo largo del camino. Las otras células piramidales de la capa V son más pequeñas y están distribuidas más uniformemente (Fig. 17 WT). Las células GABAérgicas de la capa V son principalmente variedades multipolar y bipolar. La capa 6 tiene tal vez la variedad más amplia de tipos de células. Hay varias clases de células piramidales, junto con células multipolar, bipolar y horizontal. Menos del 20% de las neuronas de la capa 6 son GABAérgicas.

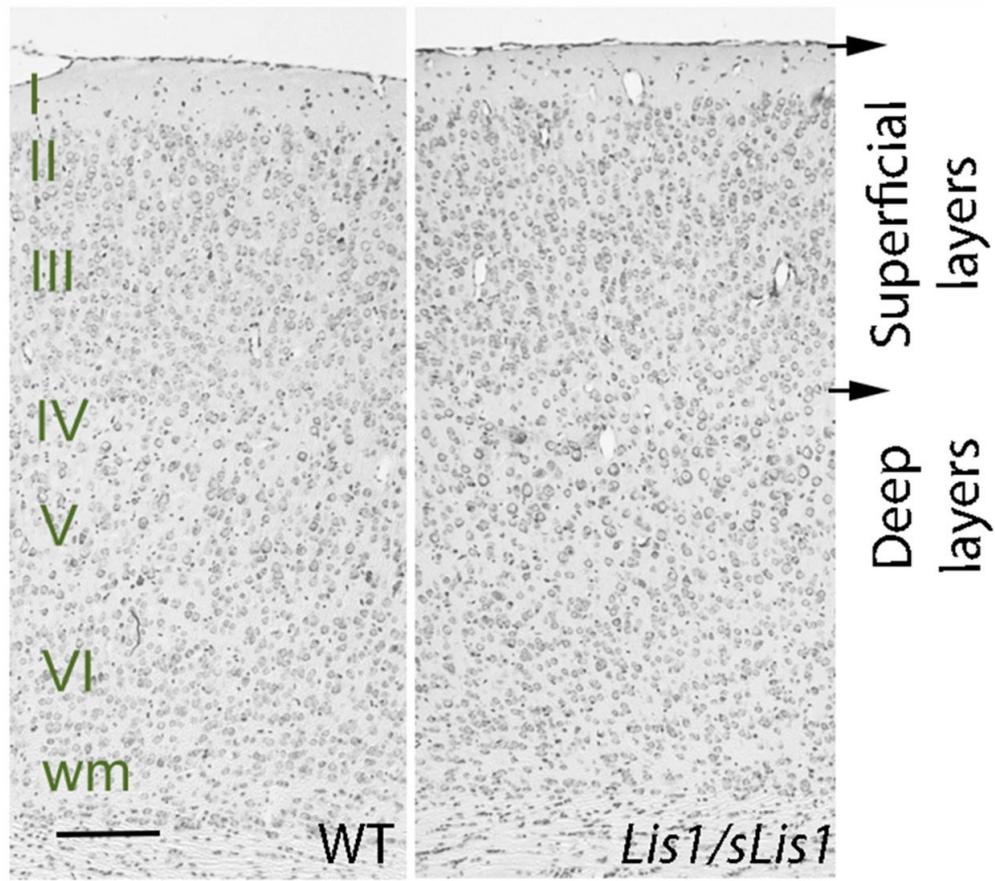


Figura 17. Citoarquitectura de la corteza auditiva del ratón WT y *Lis1/sLis1*, con tinción de Cresil violeta.

En la corteza A1 del ratón mutante *Lis1/sLis1* se aprecian ligeros cambios de la citoarquitectura con relación a la A1 normal (Figura 17 *Lis1/sLis1*). Existe una mayor celularidad de la capa I de la corteza que da una apariencia de ser más estrecha, la diferenciación entre las capas II y III es menos apreciable que en la corteza del ratón WT, en la capa IV es detectable un incremento de células con somas de mayor tamaño. Las capas V y VI presentan una apariencia normal (Figura 17 *Lis1/sLis1*). En líneas generales no se puede apreciar una alteración significativa de la estructura cortical ni de celularidad de la corteza A1 entre ratones WT y ratones mutantes *Lis1/sLis1*.

V.1.3. Inmunohistoquímica para demostrar las alteraciones de la distribución de las interneuronas en la corteza del ratón mutante Lis1/sLis1.

Hemos estudiado la histoquímica de la corteza postnatal del ratón mutante de un mes de vida (P30), empleando marcadores de interneuronas, que son las que mayoritariamente se originan en las eminencias ganglionares y migran tangencialmente. Debido a la alteración en su migración estas neuronas son las que pueden tener una distribución anómala con respecto al ratón WT.

Las reacciones de inmunohistoquímica se realizaron a P30, tanto en el ratón mutante Lis1/sLis1 como en el WT, utilizando los siguientes anticuerpos:

- Anti- Parvalbúmina.
- Anti- Calbindina.
- Anti- Calretinina.
- Anti- mGluR2.

La detección de las células positivas para la PV se realizó en ratones mutantes y WT de P30^(321, 322).

A P30, en condiciones normales, encontramos que las células Pv positivas se distribuyen en dos bandas, una más superficial y otra más profunda (Figuras 18 A, B, G y H); en los animales WT encontramos que las capas más superficiales están más pobladas que en el caso del ratón mutante (Figuras 18 A, B, G y H).

Las células Pv positivas nacen en las Eminencias Ganglionares y migran a la corteza por migración tangencial. Posteriormente finalizan su desplazamiento tangencial a diferentes niveles ventro-dorsales del palio para realizar una segunda migración en el eje radial, que las distribuirá en las capas superficiales de la corteza. Por lo tanto, además de estar parcialmente afectada la migración tangencial, en estas células se encuentra afectada la migración radial secundaria (descrito ya para este mismo

mutante)⁽²⁹⁴⁾, sobre todo en su tramo terminal que invade las capas superficiales de la corteza.

En los casos en los que se utilizó anti-CB se detectó que las células marcadas presentaban una distribución similar, en dos bandas, en ambos casos, WT y Lis1/sLis1, apreciándose más células en las capas superficiales del ratón WT.

En los casos en que se realizó un marcaje inmunohistoquímico frente a CR (Figura 18 C, D, I y J) obtuvimos que en P30 encontramos una distribución similar de células a la encontrada para las células positivas para Pv y CB, para WT y mutantes; encontrando más células marcadas en las capas superficiales en el ratón WT que en el Lis1/sLis1.

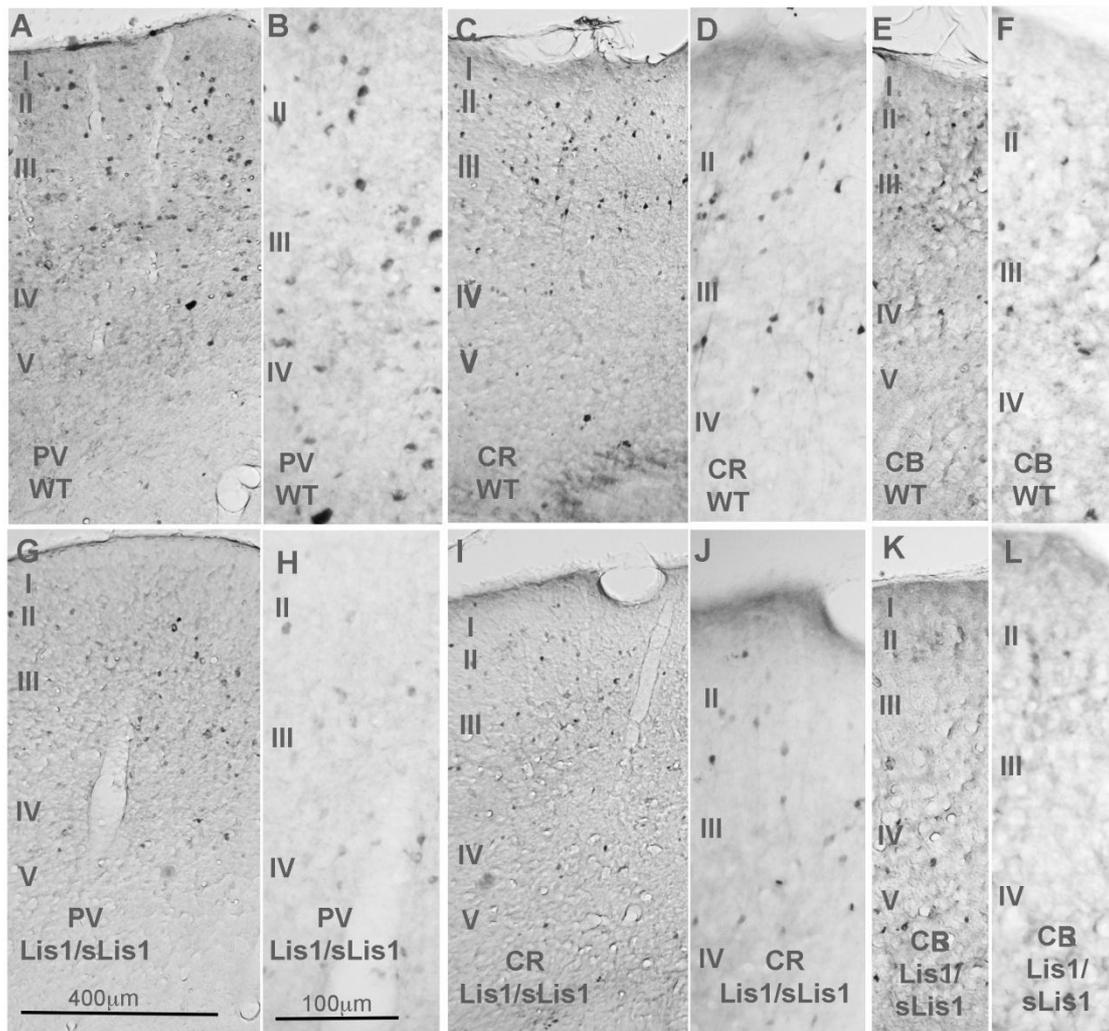


Figura 18. Estudio microscópico de la corteza de ratón WT y la corteza del ratón Lis1/sLis1.

Se ha estudiado la estructura de la corteza auditiva primaria (A1) en ratones normales y mutantes. Mientras que en el ratón WT (de la A, a la F) se aprecia una ordenación regular de las células grandes y pequeñas, en el ratón Lis1/sLis1 (de la G a la L) esta disposición es irregular. Las células pequeñas presentan inmunoreactividad para anticuerpos como Parvalbúmina (PV; A, B, G, H), calretinina (CR; C, D, I, J) y calbindina (CB; E, F, K, L).

Para identificar todas las neuronas GABAérgicas se desarrolló un modelo de ratón doble transgénico cruzando machos mutantes Lis1/sLis1 con hembras que expresan GFP bajo el promotor de la CAD67⁽³¹⁹⁾, con el fondo genético de C57BL6. En cada camada los animales que mostraban ambas mutaciones eran seleccionados para experimentación. Con el uso de un anticuerpo anti-GFP se identifican todas las células GABAérgicas (CAD67+) marcadas clonalmente. Hemos observado como en el animal WT

se observan abundantes células inmunopositivas distribuidas homogéneamente por todo el espesor de la corteza A1 (Figura 19A y B), en el ratón mutante *Lis1/sLis1* se observa una evidente disminución de neuronas GFP+ en las capas superficiales I-III de la corteza A1 (figura 19 C y D).

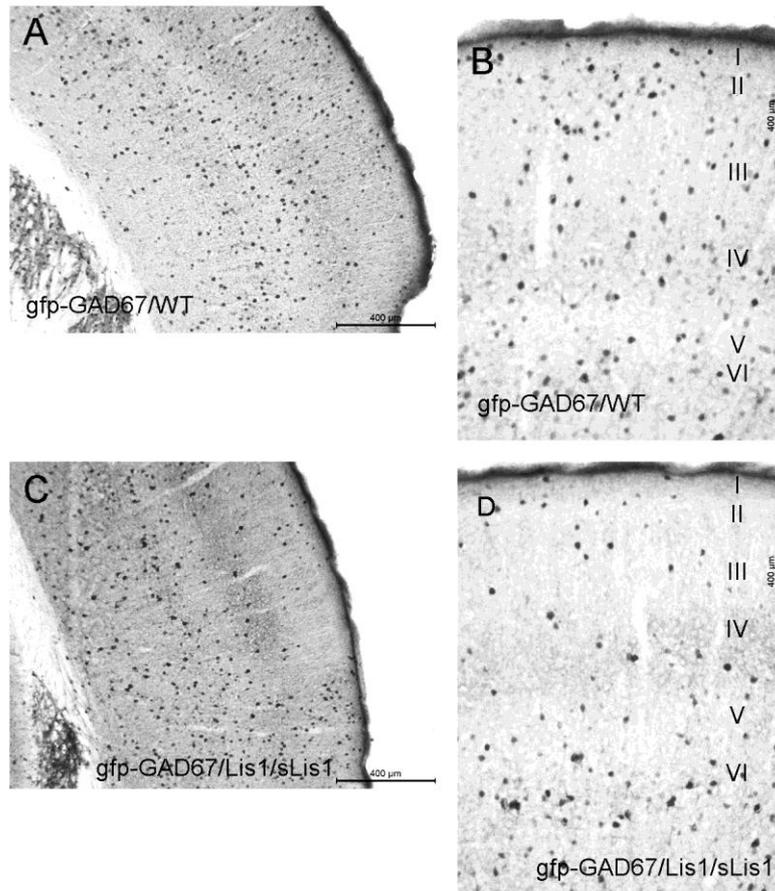


Figura 19. Distribución de células GABAérgicas en la corteza auditiva.

Fotomicrografías de la corteza auditiva de ratones WT (A, B) procesados con inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-GFP en el ratón transgénico *gfp-GAD67*. Se aprecia la distribución homogénea de las neuronas GABAérgicas de la corteza auditiva (B). **C, D:** corteza auditiva de ratón doble transgénico *gfp-GAD67/Lis1/sLis1*. Se aprecia la despoblación de células inmunopositivas de las capas superficiales de la corteza (II/III).

Como complemento al estudio de la distribución de las interneuronas en la corteza cerebral del ratón *Lis1/sLis1*, realizamos un estudio de la distribución de las

neuronas piramidales, marcando el receptor de Glutamato mGluR2 (Figura 20). Hemos podido evidenciar diferencias significativas entre el animal WT y el Lis1/sLis1, en la región ventral de la corteza A1, la capa V-VI de la corteza normal presenta una zona de mayor immuno-reactividad (Figura 20A y B). En el ratón mutante Lis1/sLis1 esta región mGluR2+ es mucho menos aparente, mostrando mayor dispersión de las neuronas inmunopositivas hacia capas superficiales, lo que produce un estrechamiento de la banda superficial inmunonegativas (capa III-IV) (Figura 20 C-F).

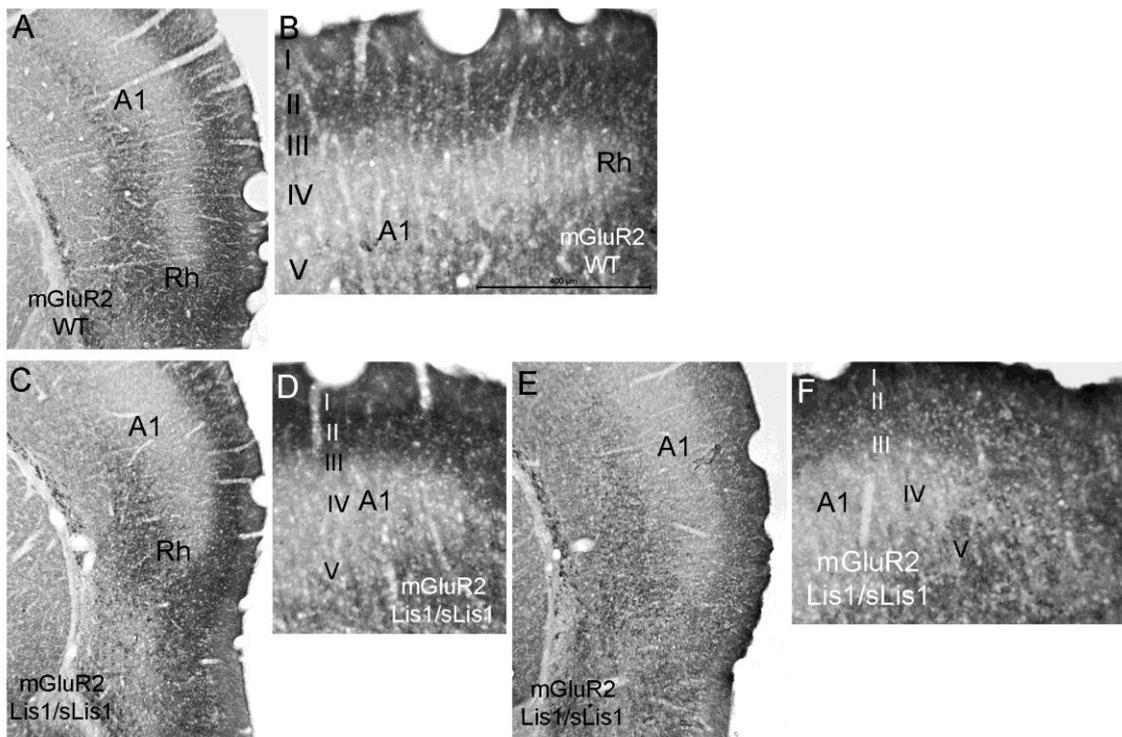


Figura 20. Expresión de mGluR2 en la corteza de animales WT y Lis1/sLis1 de treinta días postnatales (P30).

A P30 se aprecian células mGluR2 positivas en la corteza del ratón WT (A y B) y en ratón Lis1/sLis1 (C, D, E y F) con una distribución similar por toda las capas corticales en ambos casos. No se encuentran diferencias significativas en la morfología de las células (B con D y F) ni en la morfología ni en la distribución de las células excitadoras.

V.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA CORTEZA AUDITIVA DE RATONES MUTANTES *Lis1/sLis1* EN CONDICIONES AMBIENTALES BASALES.

V.2.1. Determinación de la expresión c-fos en la corteza auditiva comparada con otras regiones corticales.

En ratones WT y mutantes *Lis1/sLis1* han sido estabulados bajo las mismas condiciones de alimentación y ciclo luz-oscuridad en el animalario del Instituto de Neurociencias de Alicante. Especial atención se ha tenido a la no exposición de ninguna de las poblaciones a ruidos excesivos en intensidad y tiempo. Podemos decir que ambas poblaciones han estado expuestas a un ambiente sonoro basal y de baja intensidad. 10 ratones control WT y 10 ratones mutantes *Lis1/sLis1* han sido sacrificados bajo anestesia inhaladora con isofluorano. Han sido perfundidos y sus cerebros seccionados en criostato siguiendo el protocolo descrito en Material y Método. En secciones flotantes se ha realizado la inmunohistoquímica para la detección de la expresión del gen de reacción rápida c-fos. Hemos detectado una actividad basal escasa en células dispersas de la corteza A1 de ratones WT, sobre todo en las capas profundas (capa V-VI). En las capas superficiales se aprecian algunas células intensas muy dispersas, sobre todo en la capa II (Figura 21 WT). En la corteza A1 de ratones mutantes *Lis1/sLis1* se aprecia un gran incremento de la actividad neuronal c-fos+ en todas las capas de la corteza, con especial abundancia en la capa IV, en forma de grupos de neuronas activas, y de gran intensidad en la capa II/III (figura 21 *Lis1/sLis1*). El análisis cuantitativo realizado mecánicamente con el instrumento informático (Mediad de puntos marcados en el Programa ImageJ-NHI) muestra una diferencia significativa en el número de neuronas c-fos+ entre ratones WT y mutantes *Lis1/sLis1*, estando mucho más activada la corteza A1 de los ratones mutantes *Lis1/sLis1*.

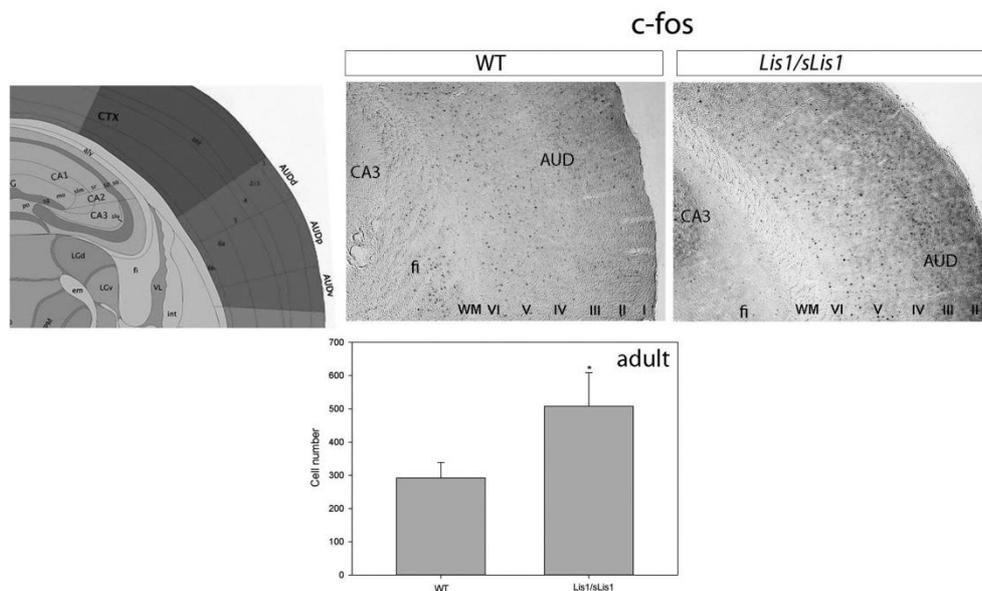


Figura 21. Distribución de neuronas activas de A1 en condiciones basales de ruido.

En ratones WT se observa como en la corteza A1 hay escaso número de células con expresión intensa de c-fos, principalmente en capa II y V. En el ratón mutante *Lis1/sLis1* se aprecia un gran aumento de neuronas intensamente c-fos positivas en las capas II, IV y V. La capa IV presenta un patrón de grupos neuronales positivos.

V.3. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES DE LA CORTEZA TEMPORAL EN UN CEREBRO HUMANO CON LISENCEFALIA TIPO I.

V.3.1. Descripción de la estructura en la corteza cerebral en el humano.

Hemos estudiado macroscópica e histológicamente el cerebro de una niña de 14 años de edad con diagnóstico de Lisencefalia tipo I. La paciente fue diagnosticada de esta anomalía (síndrome de Miller-Dieker), presentando una citogenética normal. La mutación fue identificada por técnicas de genética molecular, detectando una alteración en el marcador genético de síndrome de Miller-Dieker, D17S1866, que se localiza en el cromosoma 17, telomérico con respecto al gen *LIS1*, en muestras de sangre periférica. La mutación consistía en la delección de este marcador en el alelo materno (informe

clínico La Fe Valencia). Este resultado fue interpretado como compatible con la pérdida de material genético, microdelección, que afecta al extremo distal del brazo corto del cromosoma 17, donde se encuentra el gen *LIS1*.

La paciente falleció a los 14 años debido a un cuadro epiléptico con parálisis cardiorespiratoria. La obtención del tejido postmortem se realizó en el momento de la necropsia judicial. El encéfalo se extrajo tras envolverlo con un tejido estéril e impermeable, se depositó en un recipiente en hielo. En el laboratorio se procedió a su pesado en fresco (827 grs). En la superficie lateral del encéfalo era evidente una zona de distribución anómala de la arteria cerebral media, así como la ausencia de pliegue lateral (cisura de Silvio) (Figura 22 A-C). Antes de la fijación se cortaron 2 trozos de 2 mm² de la corteza parietal posterior de ambos lados del encéfalo para análisis molecular.

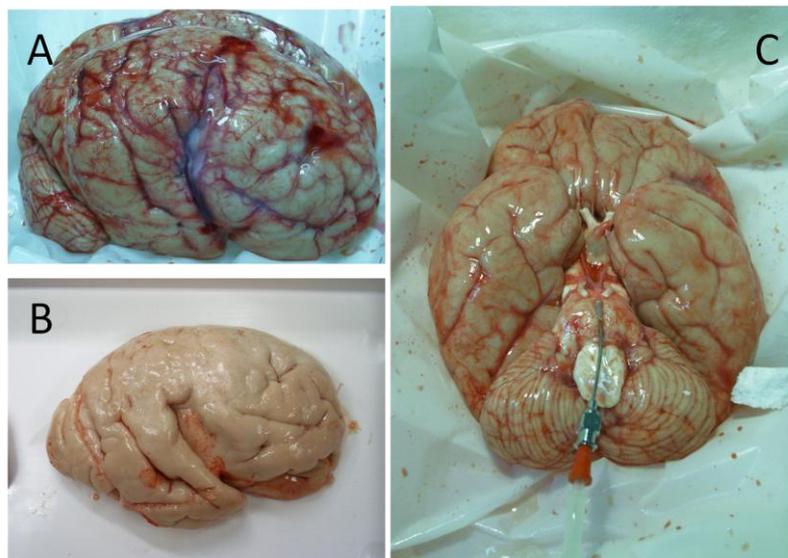


Figura 22. Encéfalo humano de paciente con síndrome de Miller-Dieker.

(A): visión lateral del encéfalo antes de retirar la aracnoides, se aprecia ya un patrón de anormales circunvoluciones y una falta de los opérculos frontal y parietal. **(B):** al retirar la aracnoides se observa un claro patrón lisencefálico fronto-parietal con una evidente paquigiria parietal. La corteza de la ínsula aparece expuesta por la falta de los opérculos frontal y parietal. **(C):** visión ventral del encéfalo donde se aprecia una paquigiria temporal y un patrón normal del tronco cerebral.

Para la fijación se disecaron las arterias del polígono de Willis, se introdujo la cánula de perfusión por la arteria basilar y se cerraron las arterias carótidas antes de dividirse en sus ramas terminales. Con el encéfalo en hielo se perfundió PBS frío (1 litro durante 15 min) y posteriormente paraformaldehído 4% en PBS frío y filtrado, 2 litros durante 1 hora; con la ayuda de una bomba de perfusión. Se fue continuamente monitorizando el lavado y fijación homogénea del encéfalo mediante el color y la textura de la superficie cerebral.

V.3.1.1. Estudio macroscópico de secciones coronales.

La superficie lateral del encéfalo presenta bilateralmente una clara falta de circunvoluciones cerebrales en la región parieto-temporal, que se extiende rostral y caudalmente hacia la parte posterior del lóbulo frontal y hacia el lóbulo occipital. La corteza de la ínsula aparece expuesta sin opérculos frontal y parietal (figuras 23 B y 23 D y E). Aparece también una paquigiria fronto-temporal.

La superficie medial del telencéfalo muestra comisuras telencefálicas con alteraciones, sobre todo el cuerpo calloso. Se aprecia una ausencia del Pico del cuerpo calloso, con una formación normal a nivel de la rodilla, y una disminución del cuerpo y el rodete.

Del estudio macroscópico se deduce que existe una alteración importante de las circunvoluciones y surcos cerebrales que afecta sobre todo a las regiones centrales de la corteza (alrededor del surco central, que está totalmente ausente); es decir: lóbulo parietal, región caudal del lóbulo frontal y región anterior del lóbulo occipital. La corteza de los polos frontal y occipital aparece claramente macrogírica, mientras que el lóbulo temporal es el menos afectado, apareciendo una corteza engrosada pero que ha permitido el desarrollo del opérculo y posiblemente de la corteza A1. Estas alteraciones se presentan de forma simétrica en ambos hemisferios cerebrales.

Se realizaron secciones de un centímetro de espesor en el plano coronal. Se estudiaron la estructura grises y de sustancia blanca que aparecía en los cortes. En relación con los datos de la corteza A1:

- Las secciones del lóbulo temporal presentaban una corteza temporal engrosada con ausencia de circunvoluciones y surcos característicos del *planum temporale* (áreas 41 y 42 de Brodmann) (figura 23 D y E). En la cara medial del lóbulo temporal se aprecia un hipocampo macroscópicamente normal.

- En relación con los núcleos de la base se aprecia claramente como la región ectópica de la corteza fronto-parietal engloba la lámina gris del claustró, haciendo desaparecer la cápsula extrema (figura 23 A-C). Esto indica la importante alteración de la migración tangencial que afecta también al desarrollo de la capa cortical profunda y el claustró.

- Los espacios ventriculares y las regiones coroideas eran de tamaño y aspecto normales.

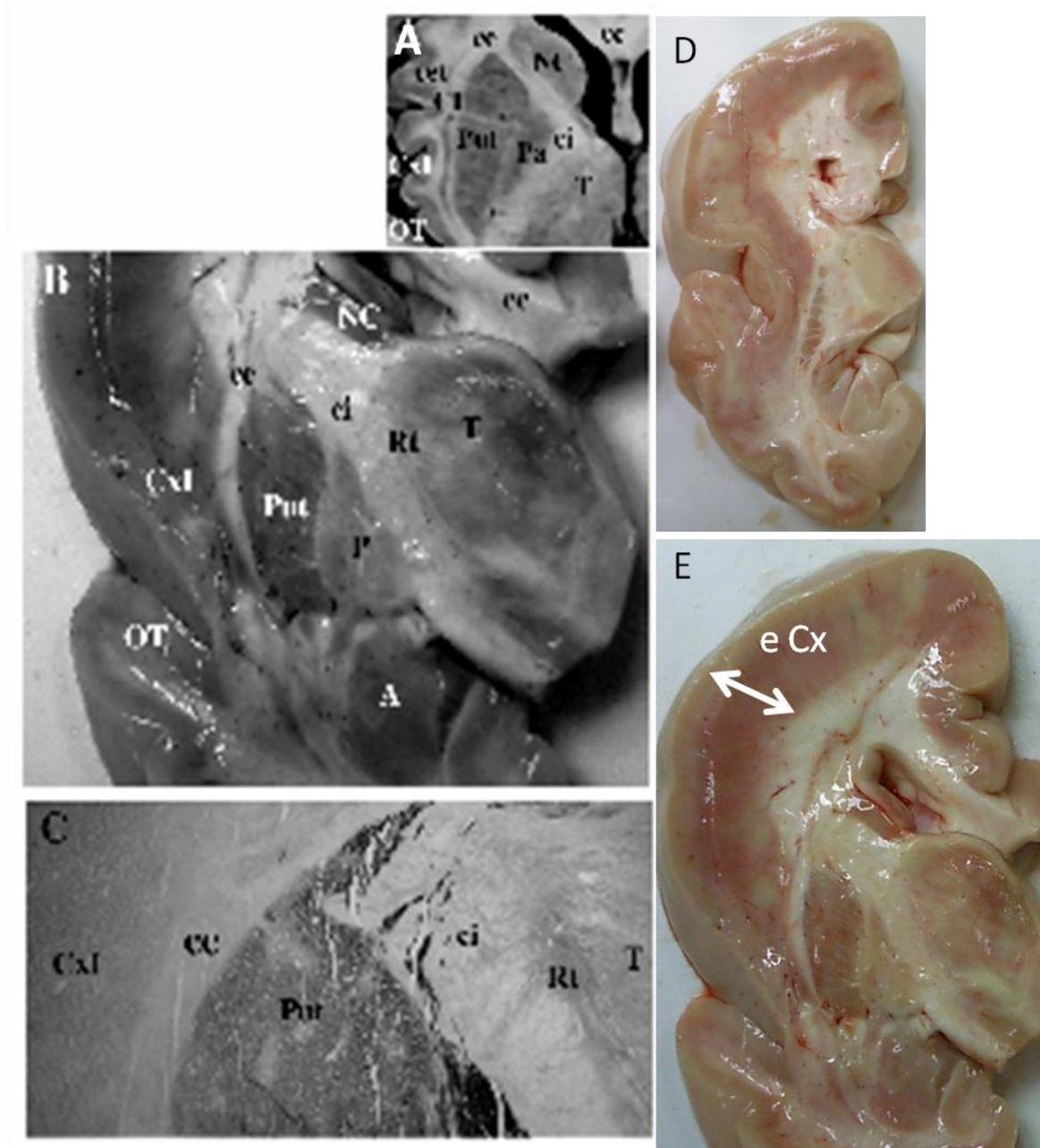


Figura 23. Estudio macroscópico de secciones transversales de encéfalo.

(A): imagen que muestra la región central de un cerebro normal donde se aprecian claramente la distribución y las relaciones de los núcleos estriados (putamen y caudado) con el claustrum y la corteza de la ínsula, a través de la cápsula externa y cápsula extrema. **(B-E):** imágenes de cortes transversales de cerebro con síndrome de Miller-Dieker donde se aprecia la extensa ectopia cortical, con el aspecto engrosado de la sustancia gris de la corteza, y la inclusión del claustrum en la ectopia insular, con la desaparición de la cápsula extrema. El patrón de los núcleos estriados parece normal.

V.3.1.2. Estudio microscópico de la corteza cerebral lisencefálica.

Se tallaron bloques de tejido que incluían la región cortical lisencefálica a nivel fronto-parietal y corteza temporal superior (corteza auditiva) como muestras de estudio, mientras que bloques de la corteza ventral-posterior del lóbulo temporal se utilizaron de control (corteza temporal). Estos bloques se crioprotegieron en sacarosa al 20% en PBS durante varios días a 4°C. Después se congelaron y cortaron por micrótopo de congelación en secciones de 30 µm de espesor. Diferentes series de secciones se recogieron en PBS y se procesaron para tinción de Cresil violeta (estudio citoarquitectónico) y para inmunohistoquímica (según el protocolo descrito en la sección de Material y Métodos) .

A.) Citoarquitectura

En la corteza fronto-parietal, donde la lisencefalia y la ectopia son más aparentes (Figura 24 A y corte macroscópico), dos estratos de las células corticales se aprecian de forma muy evidente en las secciones. Comparando esta corteza lisencefálica con la corteza temporal (de referencia por su aspecto macroscópico normal), las capas corticales son difícilmente identificables en la banda superficial y aparece una gran banda profunda de ectopia (Figura 24 A y B). En la corteza A1, la banda de ectopia no se detectó, mientras que la banda celular superficial, al igual que la banda superficial de la región fronto-parietal, presentaba un aspecto que recordaba cierto grado de estratificación (Figura 24 A1Cx):

- Una capa superficial molecular, capa I, de mayor grosor que la primera capa de la corteza temporal.

- No se apreciaba la densidad celular característica de la capa II de la corteza normal.

- Hemos identificado la región superficial como una posible fusión de las capas II y III, mientras que la zona celular más interna se ha identificado como homóloga de las capas V y VI.

- La región de baja densidad podría corresponder con la capa IV.

El patrón celular superficial de la corteza cerebral, donde se observaron células ectópicas de gran tamaño, de aspecto piramidal propias de las capas V y VI (Figura 24 E y F), en la superficie cortical, se ha podido encontrar una banda celular de distribución ondulante de superficiales en la corteza cerebral. En estas zonas, células de aspecto poligonal y piramidal se orientan en múltiples direcciones (Figura 24 C-F).

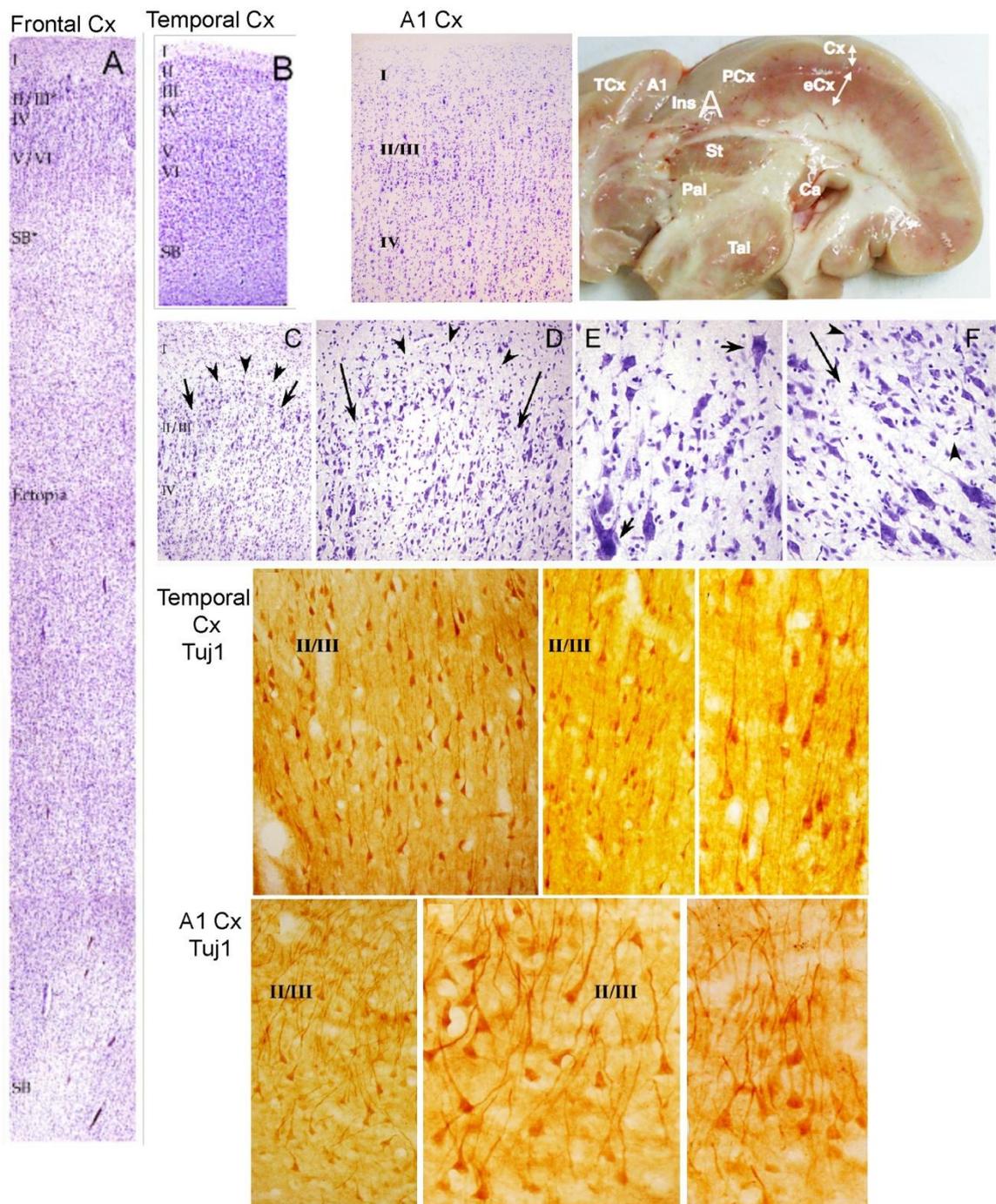


Figura 24. Estudio microscópico de la corteza en cerebro con síndrome de Miller-Dieker.

(A, B): microfotografías de corteza frontal-parietal donde se aprecia la diferencia del grosor cortical debido a la extensa ectopia en la corteza humana con Síndrome de Miller-Dieker. La corteza control (B) ha sido tomada de la corteza medial del lóbulo temporal, donde el patrón de circunvoluciones y el grosor de la corteza aparecen normales. A1Cx muestra la corteza auditiva en la parte posterior del opérculo temporal, como muestra la imagen macroscópica (identificada como A1). (C, D): fotografías de las capas superficiales de A1Cx donde se aprecia la ausencia de capa II y la distribución irregular de neuronas piramidales entre capa I-II/III. (E, F): en la región ectópica y con Cresil violeta se observan abundantes neuronas piramidales con orientaciones anómalas. La identificación de neuronas piramidales con el anticuerpo anti-Tuj1 muestra una distribución normal de pirámides en la capa II/III del córtex temporal (control) y la escasa cantidad y polaridad anómala de estas neuronas de la capa II/III de la corteza A1 del ratón mutante.

B.) Inmunohistoquímica

El análisis de las secciones procesadas para inmunohistoquímica usando el anticuerpo Tuj1 mostró la morfología de las células piramidales de las capas II y III de la corteza A1. En las zonas con corteza de aspecto normal apareció una disposición radial característica de los somas triangulares con el proceso dendrítico apical intensamente inmunoreactivos (Figura 24 Temporal Cx), mientras que en la corteza A1 aparecen las neuronas piramidales con una distribución heterogénea, con dendritas apicales orientadas hacia diferentes ejes no radiales (Figura 24 A1 Cx).

En análisis de las interneuronas en corteza A1 mostró una disminución evidente de las células CB positivas en las capas superficiales (II y III) (Figura 25 A-B''; D, D', H, H'). Del mismo modo se observa también una importante disminución de las células CR positivas (Figura 25 E, E', I, I') y células Pv positivas (Figura 25 F, F', J, J'), en las capas superficiales (II y III) de la corteza cerebral.

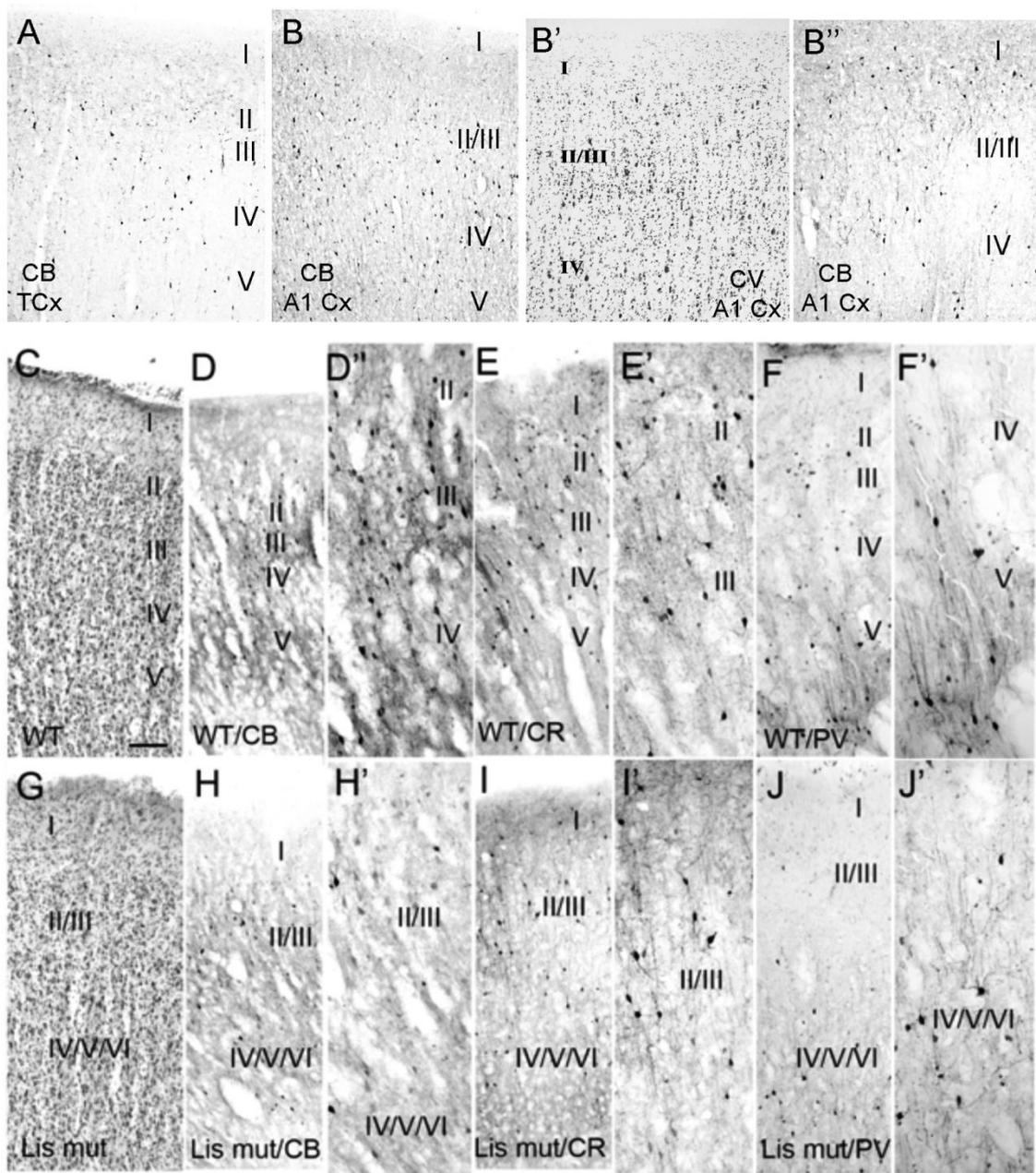


Figura 25. Distribución de interneuronas en las capas superficiales de corteza cerebral humana con síndrome de Miller-Dieker.

(A, B): El análisis de la distribución de las células CB+ en la corteza auditiva muestra diferencias significativas entre corteza control y corteza lisencefálica. **(B', B'')**: en el LIS1/sLIS1 se aprecia una disminución significativa de neuronas en las capas superficiales. El estudio inmunohistoquímico de las interneuronas CB, CR y Pv muestra una disminución significativa de estas poblaciones neuronales en las capas superficiales II/III de la corteza A1 en relación con la corteza temporal medial utilizada como control.

V.3.2. Correlación anatomo-funcional entre las alteraciones observadas en la corteza cerebral temporal entre el ratón mutante Lis1/sLis1 y el cerebro humano con lisencefalia tipo I.

La comparación de las figuras 18 y 25 muestra un paralelismo entre la estructura cortical del ratón mutante Lis1/sLis1 y el cerebro humano con síndrome de Miller-Dieker. En ambos casos es evidente una disminución significativa de interneuronas GABAérgicas en las capas superficiales de la corteza A1.

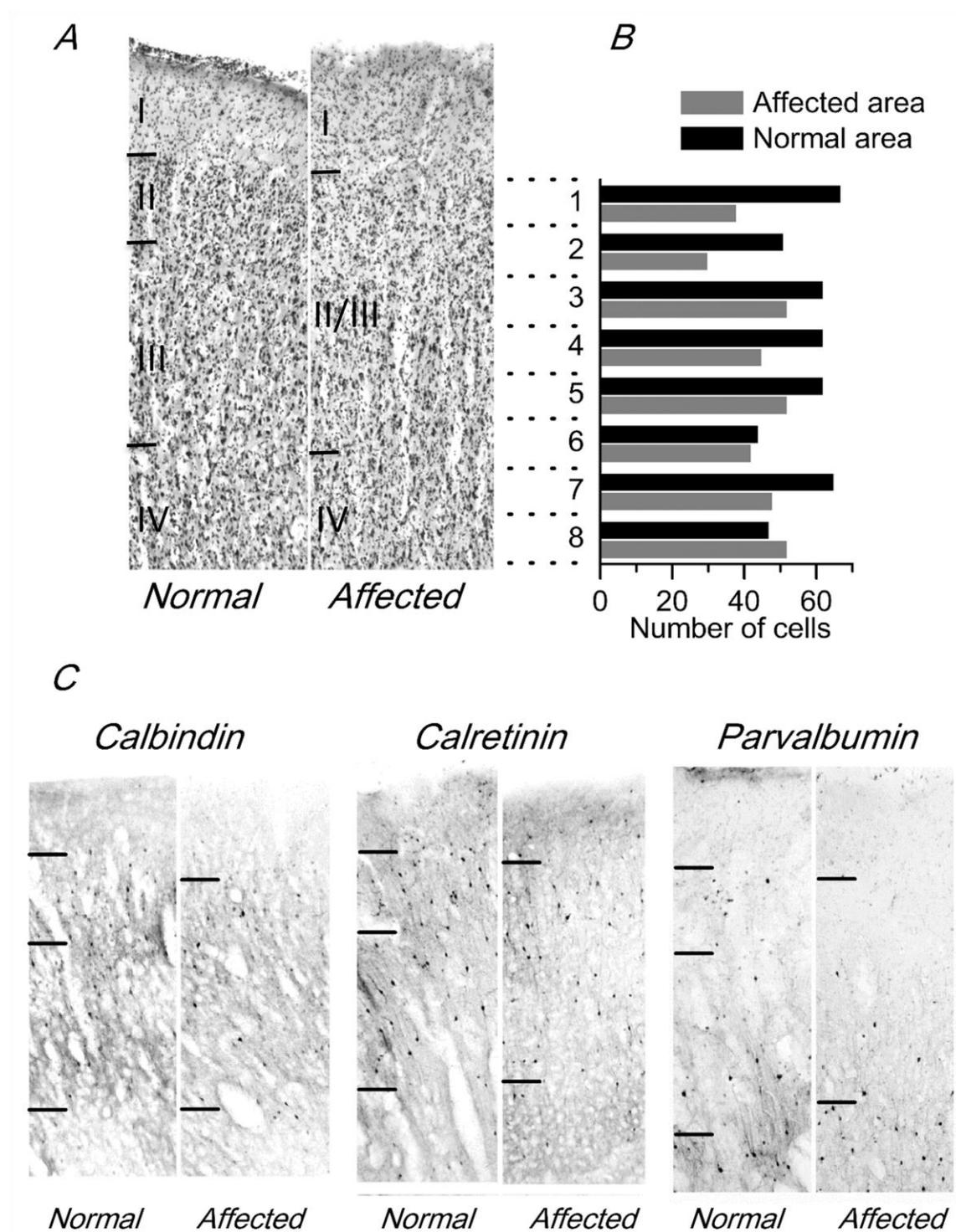


Figura 26. Estudio cuantitativo y cualitativo de la distribución de neuronas en las capas superficiales de la corteza auditiva en el síndrome de Miller-Dieker.

(A): fotomicrografía con Cresil Violeta de la corteza temporal (control) y la corteza auditiva primaria. **(B):** conteo de neuronas (perfiles medianos y grandes) en los territorios identificados en A. se aprecia una disminución de neuronas en las capas superficiales y un aumento en las capas profundas en la corteza del ratón mutante *Lis1/sLis1* en relación con el WT. **(C):** reproducción de la inmunohistoquímica de las capas superficiales de la corteza para marcadores de interneuronas entre la región normal (temporal) y la corteza auditiva primaria.

Por lo tanto podemos pensar que las alteraciones de la migración neuronal observadas en el ratón *Lis1/sLis1* han operado de forma parecida en la corteza cerebral humana con síndrome de Miller-Dieker. Mientras que en las regiones temporo-parietales la alteración ha sido muy importante creando una clara banda ectópica, en la corteza auditiva primaria las alteraciones de la migración han sido menos acusadas. A pesar de la ausencia de una banda ectópica evidente hemos detectado un problema migratorio de las neuronas GABAérgicas en su ascenso a las capas superficiales de la corteza. A sí mismo hay una alteración de las neuronas piramidales, como hemos visto en la sección anterior (Figura 24).

VI.- DISCUSIÓN.

VI.1. LA CORTEZA AUDITIVA EN EL RATÓN *Lis1/sLis1*.

El análisis estructural e inmunohistoquímico ha mostrado una alteración en la migración tangencial secundaria de las interneuronas de la corteza cerebral. Esto se corresponde con los datos publicados por Cahana et al.⁽²⁹⁴⁾ and Reiner et al.⁽²⁹⁵⁾, donde se demuestra como la glía radial con patrón anómalo y la motricidad celular alterada son la causa de la falta de interneuronas en las capas superficiales de la corteza cerebral. Hemos visto como la corteza A1 también presenta una disminución de interneuronas corticales. Por otro lado, no hemos detectado una alteración en las neuronas piramidales de la corteza A1, capas II y III.

Esto indica que posiblemente la alteración migratoria afecta a la migración radial secundaria, que comienza al finalizar la migración tangencial desde las eminencias ganglionares mediales. La alteración observada por Cahana et al.⁽²⁹⁴⁾, sobre la disposición anómala de la glía radial en el ratón mutante *Lis1/sLis1*, parece ser un factor posiblemente causal de esta anomalía migratoria.

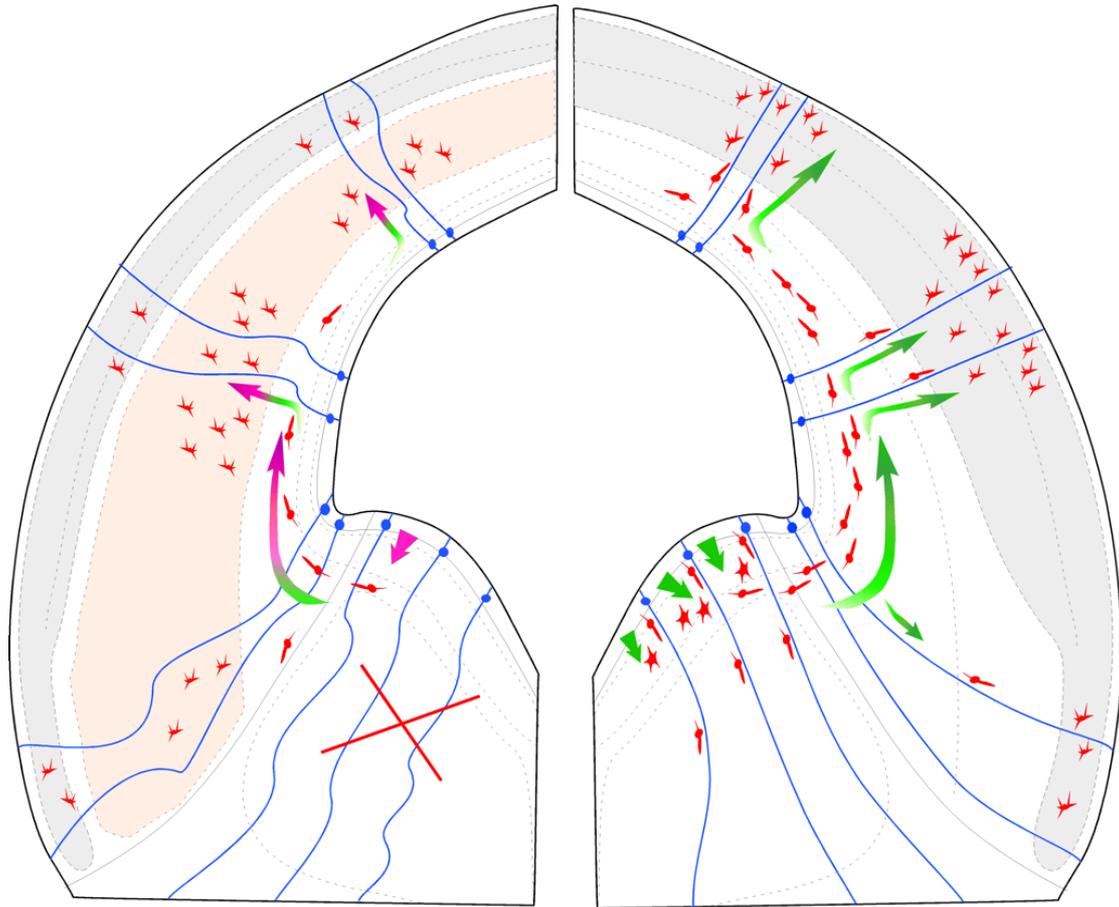


Figura 27. Esquema explicativo de la alteración migratoria y la distribución de la glía radial en el ratón mutante *Lis1/sLis1* (lado izquierdo) y el ratón WT (lado derecho).

Los movimientos migratorios están representados por flechas. La banda ectópica del lado afecto, se produce por una parada precoz en a migración tangencial secundaria de las interneuronas. Lo que produce una disminución importante de neuronas en las capas superficiales.

El ratón *Lis1/sLis1* presenta una delección en el extremo 3' de la región codificante del gen *Lis1*, en el cromosoma 17. Las diferencias en la laminación de la placa cortical de los animales mutantes con respecto a los normales son una consecuencia de las alteraciones en la neurogénesis, y en la migración neuronal^(198, 251, 276, 282, 294, 295). La migración neuronal en los animales *Lis1/sLis1* muestran que las neuronas migran más lentamente, lo que se evidencia por un retraso en la formación de la placa cortical. Esto puede ser debido a la competencia entre la proteína silvestre producida por el alelo normal (*Lis1*) y la proteína más corta (*sLis1*) producida por el alelo mutante en su unión a factores que median su actividad funcional en la migración neuronal⁽¹⁸⁰⁾.

La glía radial es fundamental para el desarrollo normal de la placa cortical, ya que sirve de soporte a las neuronas durante su proceso de migración radial^(223, 323).

En el ratón Lis1/sLis1 las alteraciones corticales son más importantes en las partes dorsales de los hemisferios telencefálicos, donde la expresión del gen es más abundante. Esto concuerda también con lo publicado en pacientes humanos con lisencefalia, que suele aparecer más afectada en corteza fronto-parietal, como es el caso del cerebro estudiado en esta tesis.

Las proteínas Lis1 y sLis1 forman parte de complejos proteínicos in vivo, participando en la regulación de la dinámica de los microtúbulos y en el control de la actividad del enzima PFAH^(212, 251, 281, 282, 290, 294, 295). La regulación de la estabilidad y dinámica del citoesqueleto de los microtúbulos puede ser por su interacción directa⁽³²⁴⁾ o puede ocurrir indirectamente regulando la actividad de la dineína citoplasmática^(282, 286).

La proteína mutante puede interactuar con los microtúbulos, probablemente ocupando los lugares diana de la proteína normal Lis1. Esta interacción, y su consecuente déficit funcional, pueden provocar un incremento local reactivo de la cantidad de proteína normal, lo que alteraría específicamente la actividad del enzima PFAH⁽³²⁵⁾. El efecto de esta mayor actividad enzimática provocaría la reducción de la concentración de PAF, lo cual afectaría al citoesqueleto. La variabilidad en el fenotipo observado puede ser explicada como un efecto dominante negativo de la proteína truncada, con penetrancia variable y con una repercusión mayor durante los períodos de proliferación y migración neuronal.

El fenotipo de nuestro ratón Lis1/sLis1 es menos severo que el mostrado por el ratón Pafah1b1⁽²⁹²⁾. En ambos animales la corteza de los ratones adultos es normal, pero se observan anomalías en el hipocampo solamente en el animal Pafah1b1. Sin embargo, en ambas mutaciones los animales homocigóticos eran inviables. Probablemente esta letalidad temprana esté relacionada con la función de la proteína Lis1 en la mitosis celular, actuando en fases precoces del desarrollo (embriones preimplantación⁽³²⁶⁾).

La razón por la que estos ratones, Pafah1b1⁽²⁹²⁾ y Lis1/sLis1⁽²⁹⁴⁾, presentan un grado de alteración distinto puede ser que la dosis de Lis1 es menor en el mutante Pafah1b1 que en el ratón mutante Lis1/sLis1, que presenta un fenotipo menos acusado. Esta idea está avalada por un estudio⁽²⁹⁶⁾ que analiza las consecuencias de la reducción de la dosis de Lis1 en el desarrollo cortical, utilizando individuos con la dosis normal, heterocigóticos nulos (con una dosis de 45% de proteína Lis1) y un complejo nulo/hipomórfico (con 35% de Lis1). Estos autores muestran en su trabajo que el desarrollo de la preplaca, de las células de Cajal-Retzius y de la glía radial aparentemente no está afectado por la dosis de Lis1, sin embargo, observan una alteración en la organización de la subplaca, así como defectos en la migración neuronal in vivo e in vitro dependientes de la dosis de Lis1. Además, la distorsión en la posición de las neuronas y el número de células mitóticas en la zona ventricular están más alterados cuanto menor es la dosis de Lis1, lo que sugiere defectos en la migración nuclear intercinética y en la proliferación de los neuroblastos⁽²⁹⁸⁾.

El análisis detallado del ratón Lis1/sLis1 muestra que el telencéfalo dorsal es la región del cerebro más vulnerable a la dosis de Lis1, donde la neurogénesis, migración y morfología neuronal se han observado alteradas.

VI.1.1. Actividad basal de la corteza auditiva primaria del ratón mutante Lis1/sLis1.

El estudio funcional de la corteza auditiva primaria en condiciones basales de sonido ambiente de ratones WT muestra una activación basal de neuronas activas sobre todo en las capas profundas.

Desde el trabajo de Herrera y Robertson (1996)⁽³²⁷⁾ sabemos que c-fos es un gen de respuesta rápida a la activación neuronal, con la despolarización neuronal⁽³²⁸⁾. La expresión de c-fos no requiere la síntesis de proteínas nuevas, activándose la expresión del gene de forma rápida y transitoria. Por lo tanto, la detección de c-fos viene siendo un método utilizado para demostrar actividad neuronal o en procesos de sobre-

estimulación (epiléptica, por ejemplo), con nivel de resolución celular⁽³²⁹⁾. Como vemos pues, los genes de respuesta rápida son poderosas herramientas para identificar neuronas y circuitos activos. Está generalmente reconocido que la activación de estos genes regula factores de transcripción codificados que, a su vez, controlan la expresión de otros genes implicados en cambios funcionales en las células activadas. Sin embargo, hay varios ejemplos en los que: (1) la activación neuronal se produce sin inducción de genes de respuesta rápida; (2) la inducción de estos genes no está relacionada con la expresión de neuropéptidos causantes de la estimulación; y (3) algunos marcadores de activación neuronal, como algunos genes de respuesta rápida, no se expresan en neuronas activadas crónicamente. A pesar de estas limitaciones, el uso de c-fos son muy buenos marcadores de la activación neuronal y seguirán siendo una técnica extremadamente potente para estudiar la activación de células neurales. Los modelos desarrollados recientemente, incluyendo ratones transgénicos que expresan diferentes genes marcadores bajo la regulación de promotores de c-fos, ayudarán a monitorear la actividad neuronal in vivo o ex vivo ya revelar la conexión entre neuronas activadas⁽³³⁰⁾ y/o diseñar fármacos dirigidos a poblaciones celulares selectivas⁽³³¹⁾.

La detección de la expresión de c-fos en neuronas activas ha sido empleada para estudiar funcionalmente el sistema auditivo en diferentes especies de vertebrados, pero de forma especialmente importante en roedores. La actividad basal elevada de la actividad cortical de la corteza A1 se ha postulado como modelo para explicar el sustrato neurobiológico de las alucinaciones verbales auditivas⁽³¹⁵⁾. Hemos elegido el ratón mutante Lis1/sLis1 como modelo de estudio para encontrar un modelo animal de alucinaciones por los datos que nuestro grupo ha ido describiendo sobre la estructura y función de la corteza en este modelo animal de alteración de la migración cortical. Así, nuestros estudios previos sobre las propiedades funcionales de la corteza cerebral en el ratón mutante Lis1 /sLis1 demostraron que las neuronas piramidales corticales y la transmisión GABAérgica en estos ratones en el desarrollo postnatal temprano (7 días posnatal) y en adultos (30 días postnatal) difieren de los de los WT de la misma camada⁽²⁹⁷⁾. Estos resultados sugieren una alteración de las células GABAérgicas en la corteza, mostrando un retraso en el desarrollo postnatal de la innervación inhibitoria de las neuronas piramidales de la corteza. En trabajo posterior otras alteraciones

funcionales en la corteza madura Lis1 / sLis1. Las interneuronas Pv positivas, que cumplían propiedades de neuronas fast spiking en la corteza (amplitud de pico de potencial de acción más pequeña, potencial de acción más corto después de la hiperpolarización, frecuencia de disparo aumentada y sEPSCs (spontaneous excitatory postsynaptic currents) de menor frecuencia y mayor amplitud de pico), mostraron alteraciones de algunas propiedades electrofisiológicas intrínsecas y de toda la actividad eléctrica cortical registrada "in vivo" en el ratón Lis1/sLis1. Estas alteraciones podrían ser causadas por las posibles consecuencias de actividad anómala de la proteína Lis1 mutada, en relación con la dinámica de los microtúbulos, el transporte intracelular y el tráfico de membrana, que podría afectar el transporte y la renovación de las proteínas de membrana⁽³³²⁾. Un hallazgo interesante fue el aumento de las tasas de disparo observado en la capa 2/3 de las neuronas fast spiking en respuesta a pulsos de corriente despolarizantes (Dominguez et al., en revisión). La tasa de disparo fast spiking tiene un papel central en la sincronización de la actividad de la red local, particularmente en el rango gamma⁽³³³⁾, y el disparo anormal podría tener consecuencias sobre las propiedades del ritmo gamma⁽³³⁴⁾ observadas en trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia. También se ha demostrado que la reducción en la dosificación Lis1 puede alterar el desarrollo normal de contactos sinápticos^(335, 336). Nuestros resultados sobre las propiedades funcionales de la corteza Lis1 /sLis1 muestran la presencia de alteraciones similares a algunas descritas en algunas enfermedades del desarrollo, como esquizofrenia, trastorno bipolar y autismo. El aumento de potencia en la actividad oscilatoria se ha descrito como una alteración patológica característica EEG de la esquizofrenia y el trastorno bipolar en humanos⁽³³⁷⁻³⁴⁰⁾. En otros modelos que muestran fenotipo tipo esquizofrenia⁽³⁴¹⁾ también, se ha descrito un aumento de la coherencia interhemisférica y regional intrahemisférica, así como en pacientes esquizofrénicos⁽³⁴²⁾. Esto sugiere que el ratón Lis1 / sLis1 no es sólo un modelo animal de lisencefalia, sino que también podría ser un modelo de otras enfermedades cerebrales causadas por alteraciones en el desarrollo cortical.

Hemos observado un aumento de la actividad bilateral de la corteza auditiva primaria en ratones mutantes Lis1/sLis1 en comparación con los ratones control. El patrón de neuronas activas en ratones control, reveladas por la inmunoreactividad con

el anticuerpo anti-c-fos, con predominio en las capas profundas (V fundamentalmente) y capas superficiales (II/II), es el mismo que el publicado por Sadananda et al. (2008)⁽³⁴³⁾, en cerebro de ratas expuestas a sonidos de vocalización. En ratones mutantes *Lis1/sLis1* se ha observado un incremento de células c-fos positivas en estas regiones, así como la aparición de núcleos positivos en capa IV, en forma de clústers de células activas. Este patrón sugiere una respuesta de mayor actividad de las neuronas corticales a los estímulos basales, lo que explicaría el incremento de neuronas activas en las capas V, II y III; así como la activación anómala de nuevas neuronas en la capa IV. Esto puede ser debido a una excitación extrínseca desde otras áreas corticales o desde el núcleo geniculado medial del tálamo. Esta posible hiperactividad subcortical (talámica) pondría en evidencia una alteración funcional, y posiblemente estructural, de regiones subcorticales en este modelo, que hasta el momento no han sido estudiadas. Este punto es interesante para buscar un modelo de alteración talámica en enfermedad mental, como se ha descrito en estudios morfológicos de esquizofrenia (ver introducción).

La similitud en las alteraciones de distribución de neuronas GABAérgicas, CB, CR y Pv positivas en el ratón adulto *Lis1/sLis1*, tanto en corteza motora (Dominguez et al, en revisión), en la corteza auditiva primaria (este trabajo) y en humanos con corteza lissencefálica, podrían explicar los cambios observados en la actividad de la corteza humana, que presentaría una mayor actividad basal y que se percibiría como alucinaciones auditivas.

VI.2. LA CORTEZA AUDITIVA HUMANA.

La lissencefalia en humanos está provocada por un gran número de mutaciones en el locus del gen *LIS1*. La mutación que presenta en el ratón *Lis1/sLis1* es similar a la de los pacientes con una deleción en el extremo 3'-terminal de la región codificante del gen. Además, la proteína producida por el alelo mutante en este animal es similar a la detectada en un paciente lissencefálico^(270, 274). Comparada con la lissencefalia clásica este paciente mostraba un grado menos severo de anomalías corticales, con paquigiria difusa y pequeñas áreas de agiria. El paciente tenía hipotonía leve (era capaz de caminar

solo), no tenía epilepsia y presentaba un retraso mental moderado, siendo capaz de responder a ordenes simples.

El análisis morfológico de la corteza cerebral de un paciente humano diagnosticado de Síndrome de Miller-Dieker (liscencefalia tipo I) ha revelado datos interesantes acerca de la estructura cortical.

Pudimos comprobar que el patrón característico de liscencefalia cerebral, fronto-parietal, limitado por un patrón cortical de paquigiria, se repitió en el cerebro procesado. Este no presentó un tamaño ni pesos que indicasen microcefalia. Así mismo no se observó atrofia cortical secundaria importante, por el hecho de no existir dilatación ventricular. Sin embargo el patrón cortical se correspondió perfectamente con los trabajos previos, revisados y ordenados en Barkovich (2012)⁽²²⁴⁾. La corteza liscencefálica presentaba un grosor considerable que era de tres a cuatro veces el espesor normal de las regiones medidas (fronto-parietales) con respecto a los datos bibliográficos en tejido fresco⁽³⁴⁴⁾ y en tejido fijado.

Histológicamente hay que señalar varios aspectos importantes:

1- El patrón general de la corteza fronto-parietal está muy alterado, apareciendo una banda celular heterotópica profunda, formada por células de proyección y muchas interneuronas, que manifiesta un defecto importante de la migración cortical. También hemos detectado alteraciones importantes en el patrón neuronal de la corteza auditiva primaria, aunque no presenta una banda de heterotopia tan manifiesta como la observada a nivel fronto-parietal. El defecto migratorio parece afectar, sobre todo, a la migración radial secundaria. Si bien, también hemos observado una alteración en el número y la polaridad de neuronas de proyección, lo que indica una alteración en la migración radial primaria. La migración radial secundaria va a producir la anómala distribución de interneuronas en las capas superficiales (GABAérgicas).

La corteza auditiva aparece como un vestigio de una corteza inmadura, en el que la presencia de células neuronales grandes en las capas más superficiales nos sugiere un patrón invertido de migración. La ausencia de capa II en esta región es manifiesto, con

un engrosamiento de la capa I. Las demás capas corticales son prácticamente irreconocibles.

Las células piramidales superficiales presentan una morfología anormal con dendritas apicales orientadas en sentidos divergentes, no paralelos, y cuerpos celulares de aspecto heterogéneo.

2- En las regiones limitantes entre la capa I extendida y las capas celulares de la corteza auditiva primaria aparecen una serie de aglomerados celulares, de aspecto globular y con continuación columnar, separados por septos acelulares, observado también en corteza fronto-parietal por Escámez⁽³⁴⁵⁾, 2004. En ellos los somas de las neuronas presentan un aspecto poligonal y piramidal con múltiples orientaciones. No hemos podido caracterizar las neuronas que forman parte de estas agrupaciones, pero su no observación en tinciones para interneuronas nos sugiere una participación mayoritaria de interneuronas. La presencia de estos aglomerados sugiere una alteración de la glía radial que podría formar ovillos o trenzas que seguidas por grupos celulares en su migración radial acabarían en esas regiones de manera desordenada. Este dato concuerda con la alteración de la glía radial observada en el ratón Lis1/sLis1.

VI.3. ALUCINACIONES AUDITIVAS.

La actividad aumentada de la corteza auditiva primaria se ha relacionado a alucinaciones auditivas asociadas a epilepsia del lóbulo temporal⁽³⁴⁶⁾. El estudio de la actividad cortical en relación con el desarrollo de alucinaciones auditivas en pacientes con esquizofrenia ha mostrado alteraciones múltiples regiones corticales, incluyendo áreas sensoriales primarias, corteza prefrontal y premotora, y corteza cingular anterior (revisado por Dyck et al.⁽³⁴⁷⁾, 2016). Estos nos permite proponer el ratón mutante Lis1/sLis1, que muestra un incremento de actividad en la corteza A1 como modelo de esquizofrenia en el que hemos detectado indicios neurobiológicos que explicarían un fenotipo de alucinaciones auditivas. El origen de la actividad aumentada en la corteza A1 parece ser primario, derivado de un aumento cuantitativo de la actividad normal. En

menor grado, hemos observado la aparición de neuronas activas en capas corticales que no las mostraban en el animal WT. Esto podría indicar una posible contribución de conexiones tálamo-corticales o cortico-corticales anómalas en el mutante.

VII.- CONCLUSIONES.

1. La corteza auditiva del ratón mutante Lis1/sLis1 con mutación en la proteína Lis1, presenta una alteración de la migración de las interneuronas GABAérgicas en corteza A1.

2. El ratón mutante Lis1/sLis1 presenta una actividad aumentada de las neuronas corticales de la corteza A1 en condiciones basales de ruido ambiental.

3. La corteza temporal de un cerebro humano con síndrome de Miller-Dieker (liscencefalia tipo I) presenta una alteración de la migración de las neuronas GABAérgicas de las capas superficiales (II/III).

4. Las alteraciones estructurales observadas en la corteza auditiva del ratón mutante Lis1/sLis1 reproducen las alteraciones observadas en la distribución neuronal de la corteza temporal de humanos con síndrome de Miller-Dieker. Por lo tanto, puede ser un modelo para el estudio de las causas neurobiológicas subyacentes a las alucinaciones auditivas asociadas a alteraciones e la migración de interneuronas (epilepsia del lóbulo temporal y esquizofrenia).

5. La alteración de los circuitos inhibitorios asociada a un incremento de la actividad neuronal de la corteza A1 puede ser propuesta como un modelo fisiopatológico de alucinaciones auditivas.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA.

1. Kuijpers M, Hoogenraad CC. Centrosomes, microtubules and neuronal development. *Molecular and cellular neurosciences*. 2011;48(4):349-58.
2. Weinberger DR. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Archives of general psychiatry*. 1987;44(7):660-9.
3. Rapoport JL, Giedd JN, Gogtay N. Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Molecular psychiatry*. 2012;17(12):1228-38.
4. Bouchard TJ, Jr., McGue M. Genetic and environmental influences on human psychological differences. *Journal of neurobiology*. 2003;54(1):4-45.
5. Brown AS. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Progress in neurobiology*. 2011;93(1):23-58.
6. Harrison PJ. Recent genetic findings in schizophrenia and their therapeutic relevance. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*. 2015;29(2):85-96.
7. van Os J, Kenis G, Rutten BP. The environment and schizophrenia. *Nature*. 2010;468(7321):203-12.
8. Andreasen NC. Pieces of the schizophrenia puzzle fall into place. *Neuron*. 1996;16(4):697-700.
9. Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain : a journal of neurology*. 1999;122 (Pt 4):593-624.
10. Lewis DA, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annual review of neuroscience*. 2002;25:409-32.
11. Bassett AS, Chow EW, Weksberg R, Brzustowicz L. Schizophrenia and genetics: new insights. *Current psychiatry reports*. 2002;4(4):307-14.
12. Nadri C, Kozlovsky N, Agam G. [Schizophrenia, neurodevelopment and glycogen synthase kinase-3]. *Harefuah*. 2003;142(8-9):636-42, 44.
13. Lovestone S, Killick R, Di Forti M, Murray R. Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder. *Trends in neurosciences*. 2007;30(4):142-9.
14. Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, et al. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(26):15718-23.
15. Costa E, Davis J, Grayson DR, Guidotti A, Pappas GD, Pesold C. Dendritic spine

hypoplasticity and downregulation of reelin and GABAergic tone in schizophrenia vulnerability. *Neurobiology of disease*. 2001;8(5):723-42.

16. Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, et al. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Archives of general psychiatry*. 2000;57(11):1061-9.
17. Guidotti A, Grayson DR, Caruncho HJ. Epigenetic RELN Dysfunction in Schizophrenia and Related Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2016;10:89.
18. Ozeki Y, Tomoda T, Kleiderlein J, Kamiya A, Bord L, Fujii K, et al. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(1):289-94.
19. Kamiya A, Tomoda T, Chang J, Takaki M, Zhan C, Morita M, et al. DISC1-NDEL1/NUDEL protein interaction, an essential component for neurite outgrowth, is modulated by genetic variations of DISC1. *Human molecular genetics*. 2006;15(22):3313-23.
20. Hattori M, Kunugi H, Akahane A, Tanaka H, Ishida S, Hirose T, et al. Novel polymorphisms in the promoter region of the neurotrophin-3 gene and their associations with schizophrenia. *American journal of medical genetics*. 2002;114(3):304-9.
21. Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G. GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2002;12(1):13-25.
22. Guillin O, Demily C, Thibaut F. Brain-derived neurotrophic factor in schizophrenia and its relation with dopamine. *International review of neurobiology*. 2007;78:377-95.
23. Gray LJ, Dean B, Kronsbein HC, Robinson PJ, Scarr E. Region and diagnosis-specific changes in synaptic proteins in schizophrenia and bipolar I disorder. *Psychiatry research*. 2010;178(2):374-80.
24. Tabares-Seisdedos R, Escamez T, Martinez-Gimenez JA, Balanza V, Salazar J, Selva G,

- et al. Variations in genes regulating neuronal migration predict reduced prefrontal cognition in schizophrenia and bipolar subjects from mediterranean Spain: a preliminary study. *Neuroscience*. 2006;139(4):1289-300.
25. Carod-Artal FJ, Vazquez-Cabrera CB. [Neurological paleopathology in the pre-Columbine cultures of the coast and the Andean plateau (II). The history of cranial trepanations]. *Revista de neurologia*. 2004;38(9):886-94.
 26. Collado-Vazquez S, Carrillo JM. Cranial trepanation in The Egyptian. *Neurologia (Barcelona, Spain)*. 2014;29(7):433-40.
 27. Bou Khalil R, Richa S. When affective disorders were considered to emanate from the heart: the Ebers papyrus. *The American journal of psychiatry*. 2014;171(3):275.
 28. Scull A. *La locura: Una breve introducción*. Madrid: Alianza editorial; 2013.
 29. Kroll J. A reappraisal of psychiatry in the Middle Ages. *Archives of general psychiatry*. 1973;29(2):276-83.
 30. Lopez-Ibor JJ. The founding of the first psychiatric hospital in the World in Valencia. *Actas espanolas de psiquiatria*. 2008;36(1):1-9.
 31. Vallejo Ruiloba J. *Introducción a la psicopatología y la psiquiatría*. 6a ed. Madrid: Elsevier; 2006.
 32. Jarne A, Talarn A. *Manual de psicopatología clínica*. 2a ed. Barcelona: Herder; 2015.
 33. Vallejo Ruiloba J, Leal C. *Tratado de Psiquiatría*. 1a ed. Barcelona: Ars Medica; 2005.
 34. González de Rivera JL. Evolución histórica de la Psiquiatría. *Psiquis*. 1998;19(5):183-200.
 35. Adityanjee, Aderibigbe YA, Theodoridis D, Vieweg VR. Dementia praecox to schizophrenia: the first 100 years. *Psychiatry and clinical neurosciences*. 1999;53(4):437-48.
 36. Morel BA. *Etudes Cliniques, Traité Théorique et Pratique des Maladies Mentales*. París: Víctor Masson; 1853.
 37. Morel BA. *Traité des Maladies Mentales*. París: Víctor Masson; 1860.
 38. Conti NA. [Benedict Augustin Morel and the origin of the term dementia praecox]. *Vertex (Buenos Aires, Argentina)*. 2003;14(53):227-31.
 39. Mahieu EL. [On Morel and dementia praecox]. *Vertex (Buenos Aires, Argentina)*. 2004;15(55):73-5.

40. Berrios GE. Historia de los síntomas de los trastornos mentales: la psicopatología descriptiva desde el siglo XIX. Mexico: Fondo de Cultura Económica; 2013.
41. Sedler MJ. The legacy of Ewald Hecker: a new translation of "Die Hebeephrenie". Translated by Marie-Louise Schoelly. The American journal of psychiatry. 1985;142(11):1265-71.
42. Conti NA. [Karl Ludwig Kahlbaum: catatonia of tension madness (1874)]. Vertex (Buenos Aires, Argentina). 2012;23(104):310-1.
43. Kendler KS, Engstrom EJ. Kahlbaum, Hecker, and Kraepelin and the Transition From Psychiatric Symptom Complexes to Empirical Disease Forms. The American journal of psychiatry. 2017;174(2):102-9.
44. Jablensky A. The diagnostic concept of schizophrenia: its history, evolution, and future prospects. Dialogues in clinical neuroscience. 2010;12(3):271-87.
45. Sadock BJ, Sadock VA, Ruiz P. Kaplan & Sadock. Sinopsis de psiquiatría. 11a ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2015.
46. McGlashan TH. Eugen Bleuler: centennial anniversary of his 1911 publication of Dementia Praecox or the group of schizophrenias. Schizophrenia bulletin. 2011;37(6):1101-3.
47. Sadock BJ, Sadock VA. Kaplan & Sadock. Sinopsis de psiquiatría. 10a ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2008. p. 468.
48. Crow TJ. Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process? British medical journal. 1980;280(6207):66-8.
49. Andreasen NC, Olsen S. Negative v positive schizophrenia. Definition and validation. Archives of general psychiatry. 1982;39(7):789-94.
50. del Barrio Gándara V. Raíces y evolución del DSM. Revista de Historia de la Psicología. 2009;30(2):81-90.
51. Asociación Americana De Psiquiatría. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales-DSM 5. 5a ed. Madrid: Médica Panamericana; 2014. p. 99-100.
52. Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. PLoS medicine. 2005;2(5):141.
53. Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. Schizophrenia research. 2008;102(1-

3):1-18.

54. Simeone JC, Ward AJ, Rotella P, Collins J, Windisch R. An evaluation of variation in published estimates of schizophrenia prevalence from 1990 horizontal line 2013: a systematic literature review. *BMC psychiatry*. 2015;15:193.
55. Auquier P, Lancon C, Rouillon F, Lader M, Holmes C. Mortality in schizophrenia. *Pharmacoepidemiology and drug safety*. 2006;15(12):873-9.
56. Rossler W, Salize HJ, van Os J, Riecher-Rossler A. Size of burden of schizophrenia and psychotic disorders. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2005;15(4):399-409.
57. Hor K, Taylor M. Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*. 2010;24(4 Suppl):81-90.
58. De Hert M, Dekker JM, Wood D, Kahl KG, Holt RI, Moller HJ. Cardiovascular disease and diabetes in people with severe mental illness position statement from the European Psychiatric Association (EPA), supported by the European Association for the Study of Diabetes (EASD) and the European Society of Cardiology (ESC). *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists*. 2009;24(6):412-24.
59. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Archives of general psychiatry*. 2003;60(12):1187-92.
60. Sullivan PF. Schizophrenia genetics: the search for a hard lead. *Current opinion in psychiatry*. 2008;21(2):157-60.
61. McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C, Chant D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC medicine*. 2004;2:13.
62. Aleman A, Kahn RS, Selten JP. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Archives of general psychiatry*. 2003;60(6):565-71.
63. Hafner H, Riecher A, Maurer K, Loffler W, Munk-Jorgensen P, Stromgren E. How does gender influence age at first hospitalization for schizophrenia? A transnational case register study. *Psychological medicine*. 1989;19(4):903-18.
64. Hafner H, Behrens S, De Vry J, Gattaz WF. An animal model for the effects of

- estradiol on dopamine-mediated behavior: implications for sex differences in schizophrenia. *Psychiatry research*. 1991;38(2):125-34.
65. Wohl M, Gorwood P. Paternal ages below or above 35 years old are associated with a different risk of schizophrenia in the offspring. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists*. 2007;22(1):22-6.
 66. Malaspina D, Harlap S, Fennig S, Heiman D, Nahon D, Feldman D, et al. Advancing paternal age and the risk of schizophrenia. *Archives of general psychiatry*. 2001;58(4):361-7.
 67. Meli G, Ottl B, Paladini A, Cataldi L. Prenatal and perinatal risk factors of schizophrenia. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2012;25(12):2559-63.
 68. Brown AS, Susser ES. In utero infection and adult schizophrenia. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*. 2002;8(1):51-7.
 69. Brown AS. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*. 2006;32(2):200-2.
 70. Brown AS, Bottiglieri T, Schaefer CA, Quesenberry CP, Jr., Liu L, Bresnahan M, et al. Elevated prenatal homocysteine levels as a risk factor for schizophrenia. *Archives of general psychiatry*. 2007;64(1):31-9.
 71. Dealberto MJ. Why are immigrants at increased risk for psychosis? Vitamin D insufficiency, epigenetic mechanisms, or both? *Medical hypotheses*. 2007;68(2):259-67.
 72. McGrath J. Hypothesis: is low prenatal vitamin D a risk-modifying factor for schizophrenia? *Schizophrenia research*. 1999;40(3):173-7.
 73. McGrath JJ, Burne TH, Feron F, Mackay-Sim A, Eyles DW. Developmental vitamin D deficiency and risk of schizophrenia: a 10-year update. *Schizophrenia bulletin*. 2010;36(6):1073-8.
 74. Haukvik UK, Agartz I. [Do obstetric complications increase the risk of schizophrenia?]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*. 2010;130(3):270-2.

75. March D, Hatch SL, Morgan C, Kirkbride JB, Bresnahan M, Fearon P, et al. Psychosis and place. *Epidemiologic reviews*. 2008;30:84-100.
76. Pedersen CB, Mortensen PB. Evidence of a dose-response relationship between urbanicity during upbringing and schizophrenia risk. *Archives of general psychiatry*. 2001;58(11):1039-46.
77. Cantor-Graae E, Selten JP. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *The American journal of psychiatry*. 2005;162(1):12-24.
78. Selten JP, van der Ven E, Rutten BP, Cantor-Graae E. The social defeat hypothesis of schizophrenia: an update. *Schizophrenia bulletin*. 2013;39(6):1180-6.
79. Dekker N, Meijer J, Koeter M, van den Brink W, van Beveren N, Kahn RS, et al. Age at onset of non-affective psychosis in relation to cannabis use, other drug use and gender. *Psychological medicine*. 2012;42(9):1903-11.
80. Jonsson AJ, Birgisdottir H, Sigurdsson E. [Does the use of cannabis increase the risk for psychosis and the development of schizophrenia?]. *Laeknabladid*. 2014;100(9):443-51.
81. Helle S, Ringen PA, Melle I, Larsen TK, Gjestad R, Johnsen E, et al. Cannabis use is associated with 3years earlier onset of schizophrenia spectrum disorder in a naturalistic, multi-site sample (N=1119). *Schizophrenia research*. 2016;170(1):217-21.
82. Semple DM, McIntosh AM, Lawrie SM. Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*. 2005;19(2):187-94.
83. Sewell RA, Ranganathan M, D'Souza DC. Cannabinoids and psychosis. *International review of psychiatry (Abingdon, England)*. 2009;21(2):152-62.
84. Andreasen NC. Assessment issues and the cost of schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*. 1991;17(3):475-81.
85. Lieberman JA, Kane JM, Alvir J. Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology*. 1987;91(4):415-33.
86. Stahl SM. *Psicofarmacología esencial de Stahl*. 4a ed. España: UNED; 2014. p. 91.
87. Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *The American journal of psychiatry*. 1991;148(11):1474-86.

88. Howes OD, Montgomery AJ, Asselin MC, Murray RM, Valli I, Tabraham P, et al. Elevated striatal dopamine function linked to prodromal signs of schizophrenia. *Archives of general psychiatry*. 2009;66(1):13-20.
89. Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophrenia bulletin*. 2009;35(3):549-62.
90. Howes OD, Fusar-Poli P, Bloomfield M, Selvaraj S, McGuire P. From the prodrome to chronic schizophrenia: the neurobiology underlying psychotic symptoms and cognitive impairments. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(4):459-65.
91. Howes O, McCutcheon R, Stone J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*. 2015;29(2):97-115.
92. Geyer MA, Vollenweider FX. Serotonin research: contributions to understanding psychoses. *Trends in pharmacological sciences*. 2008;29(9):445-53.
93. Halberstadt AL, Geyer MA. Serotonergic hallucinogens as translational models relevant to schizophrenia. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2013;16(10):2165-80.
94. Abi-Dargham A. Alterations of serotonin transmission in schizophrenia. *International review of neurobiology*. 2007;78:133-64.
95. Kantrowitz J, Javitt DC. Glutamatergic transmission in schizophrenia: from basic research to clinical practice. *Current opinion in psychiatry*. 2012;25(2):96-102.
96. Veerman SR, Schulte PF, de Haan L. The glutamate hypothesis: a pathogenic pathway from which pharmacological interventions have emerged. *Pharmacopsychiatry*. 2014;47(4-5):121-30.
97. Moghaddam B, Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2012;37(1):4-15.
98. Gordon JA. Testing the glutamate hypothesis of schizophrenia. *Nature neuroscience*. 2010;13(1):2-4.
99. Tatard-Leitman VM, Jutzeler CR, Suh J, Saunders JA, Billingslea EN, Morita S, et al. Pyramidal cell selective ablation of N-methyl-D-aspartate receptor 1 causes increase in cellular and network excitability. *Biological psychiatry*. 2015;77(6):556-68.

100. Catts VS, Lai YL, Weickert CS, Weickert TW, Catts SV. A quantitative review of the postmortem evidence for decreased cortical N-methyl-D-aspartate receptor expression levels in schizophrenia: How can we link molecular abnormalities to mismatch negativity deficits? *Biological psychology*. 2016;116:57-67.
101. Balu DT. The NMDA Receptor and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)*. 2016;76:351-82.
102. Kim YK, Choi J, Park SC. A Novel Bio-Psychosocial-Behavioral Treatment Model in Schizophrenia. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(4).
103. Keefe RS, Silva SG, Perkins DO, Lieberman JA. The effects of atypical antipsychotic drugs on neurocognitive impairment in schizophrenia: a review and meta-analysis. *Schizophrenia bulletin*. 1999;25(2):201-22.
104. Lewis DA, Pierri JN, Volk DW, Melchitzky DS, Woo TU. Altered GABA neurotransmission and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Biological psychiatry*. 1999;46(5):616-26.
105. Fung SJ, Webster MJ, Sivagnanasundaram S, Duncan C, Elashoff M, Weickert CS. Expression of interneuron markers in the dorsolateral prefrontal cortex of the developing human and in schizophrenia. *The American journal of psychiatry*. 2010;167(12):1479-88.
106. Tse MT, Piantadosi PT, Floresco SB. Prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid transmission and cognitive function: drawing links to schizophrenia from preclinical research. *Biological psychiatry*. 2015;77(11):929-39.
107. Chakravarti A. Population genetics--making sense out of sequence. *Nature genetics*. 1999;21(1 Suppl):56-60.
108. Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science (New York, NY)*. 2008;320(5875):539-43.
109. McClellan JM, Susser E, King MC. Schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 2007;190:194-9.
110. Beckmann H, Franzek E. The genetic heterogeneity of "schizophrenia". *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of*

- Societies of Biological Psychiatry. 2000;1(1):35-41.
111. Rubinstein M. [Epigenetics 2.0: The multiple faces of the genome]. Vertex (Buenos Aires, Argentina). 2016;Xxvii(129):368-73.
 112. Millar JK, Brown J, Maule JC, Shibasaki Y, Christie S, Lawson D, et al. A long-range restriction map across 3 Mb of the chromosome 11 breakpoint region of a translocation linked to schizophrenia: localization of the breakpoint and the search for neighbouring genes. *Psychiatric genetics*. 1998;8(3):175-81.
 113. Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, et al. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Human molecular genetics*. 2000;9(9):1415-23.
 114. Maynard TM, Haskell GT, Lieberman JA, LaMantia AS. 22q11 DS: genomic mechanisms and gene function in DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2002;20(3-5):407-19.
 115. van de Leemput J, Hess JL, Glatt SJ, Tsuang MT. Genetics of Schizophrenia: Historical Insights and Prevailing Evidence. *Advances in genetics*. 2016;96:99-141.
 116. Badner JA, Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2002;7(4):405-11.
 117. Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *American journal of human genetics*. 2003;73(1):34-48.
 118. Ng MY, Levinson DF, Faraone SV, Suarez BK, DeLisi LE, Arinami T, et al. Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2009;14(8):774-85.
 119. Cariaga-Martinez A, Saiz-Ruiz J, Alelu-Paz R. From Linkage Studies to Epigenetics: What We Know and What We Need to Know in the Neurobiology of Schizophrenia. *Frontiers in neuroscience*. 2016;10:202.
 120. Hunter DJ, Kraft P. Drinking from the fire hose--statistical issues in genomewide association studies. *The New England journal of medicine*. 2007;357(5):436-9.
 121. Mah S, Nelson MR, Delisi LE, Reneland RH, Markward N, James MR, et al. Identification of the semaphorin receptor PLXNA2 as a candidate for susceptibility

- to schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2006;11(5):471-8.
122. Lencz T, Morgan TV, Athanasiou M, Dain B, Reed CR, Kane JM, et al. Converging evidence for a pseudoautosomal cytokine receptor gene locus in schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2007;12(6):572-80.
 123. O'Donovan MC, Craddock N, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskvina V, et al. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nature genetics*. 2008;40(9):1053-5.
 124. Shifman S, Johannesson M, Bronstein M, Chen SX, Collier DA, Craddock NJ, et al. Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women. *PLoS genetics*. 2008;4(2):e28.
 125. Sullivan PF, Lin D, Tzeng JY, van den Oord E, Perkins D, Stroup TS, et al. Genomewide association for schizophrenia in the CATIE study: results of stage 1. *Molecular psychiatry*. 2008;13(6):570-84.
 126. Kirov G, Zaharieva I, Georgieva L, Moskvina V, Nikolov I, Cichon S, et al. A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling. *Molecular psychiatry*. 2009;14(8):796-803.
 127. Liu Y, Chen G, Norton N, Liu W, Zhu H, Zhou P, et al. Whole genome association study in a homogenous population in Shandong peninsula of China reveals JARID2 as a susceptibility gene for schizophrenia. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2009;2009:536918.
 128. Need AC, Ge D, Weale ME, Maia J, Feng S, Heinzen EL, et al. A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia. *PLoS genetics*. 2009;5(2):e1000373.
 129. Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, Sullivan PF, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*. 2009;460(7256):748-52.
 130. Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe'er I, et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature*. 2009;460(7256):753-7.
 131. Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, et al. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*. 2009;460(7256):744-7.

132. Athanasiu L, Mattingsdal M, Kahler AK, Brown A, Gustafsson O, Agartz I, et al. Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large European cohort. *Journal of psychiatric research*. 2010;44(12):748-53.
133. Chen X, Lee G, Maher BS, Fanous AH, Chen J, Zhao Z, et al. GWA study data mining and independent replication identify cardiomyopathy-associated 5 (CMYA5) as a risk gene for schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2011;16(11):1117-29.
134. O'Dushlaine C, Kenny E, Heron E, Donohoe G, Gill M, Morris D, et al. Molecular pathways involved in neuronal cell adhesion and membrane scaffolding contribute to schizophrenia and bipolar disorder susceptibility. *Molecular psychiatry*. 2011;16(3):286-92.
135. Wang KS, Liu XF, Aragam N. A genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophrenia research*. 2010;124(1-3):192-9.
136. Ripke S ea. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nature genetics*. 2011;43(10):969-76.
137. Williams HJ, Norton N, Dwyer S, Moskvina V, Nikolov I, Carroll L, et al. Fine mapping of ZNF804A and genome-wide significant evidence for its involvement in schizophrenia and bipolar disorder. *Molecular psychiatry*. 2011;16(4):429-41.
138. Yamada K, Iwayama Y, Hattori E, Iwamoto K, Toyota T, Ohnishi T, et al. Genome-wide association study of schizophrenia in Japanese population. *PloS one*. 2011;6(6):e20468.
139. Liou YJ, Wang HH, Lee MT, Wang SC, Chiang HL, Chen CC, et al. Genome-wide association study of treatment refractory schizophrenia in Han Chinese. *PloS one*. 2012;7(3):e33598.
140. Rietschel M, Mattheisen M, Degenhardt F, Muhleisen TW, Kirsch P, Esslinger C, et al. Association between genetic variation in a region on chromosome 11 and schizophrenia in large samples from Europe. *Molecular psychiatry*. 2012;17(9):906-17.
141. Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, Moran JL, Kahler AK, Akterin S, et al. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nature*

- genetics. 2013;45(10):1150-9.
142. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet (London, England)*. 2013;381(9875):1371-9.
 143. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. 2014;511(7510):421-7.
 144. Takahashi S, Glatt SJ, Uchiyama M, Faraone SV, Tsuang MT. Meta-analysis of data from the Psychiatric Genomics Consortium and additional samples supports association of CACNA1C with risk for schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2015;168(1-2):429-33.
 145. Edwards AC, Bigdeli TB, Docherty AR, Bacanu S, Lee D, de Candia TR, et al. Meta-analysis of Positive and Negative Symptoms Reveals Schizophrenia Modifier Genes. *Schizophrenia bulletin*. 2016;42(2):279-87.
 146. Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2001;49(1-2):1-52.
 147. van Erp TG, Hibar DP, Rasmussen JM, Glahn DC, Pearlson GD, Andreassen OA, et al. Subcortical brain volume abnormalities in 2028 individuals with schizophrenia and 2540 healthy controls via the ENIGMA consortium. *Molecular psychiatry*. 2016;21(4):547-53.
 148. Adriano F, Caltagirone C, Spalletta G. Hippocampal volume reduction in first-episode and chronic schizophrenia: a review and meta-analysis. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2012;18(2):180-200.
 149. Adriano F, Spoletini I, Caltagirone C, Spalletta G. Updated meta-analyses reveal thalamus volume reduction in patients with first-episode and chronic schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2010;123(1):1-14.
 150. Prestia A, Cavedo E, Boccardi M, Muscio C, Adorni A, Geroldi C, et al. Hippocampal and amygdalar local structural differences in elderly patients with schizophrenia. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*. 2015;23(1):47-58.
 151. Bois C, Levita L, Ripp I, Owens DC, Johnstone EC, Whalley HC, et al. Hippocampal, amygdala and nucleus accumbens volume in first-episode schizophrenia patients

- and individuals at high familial risk: A cross-sectional comparison. *Schizophrenia research*. 2015;165(1):45-51.
152. Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *The American journal of psychiatry*. 2000;157(1):16-25.
 153. Shenton ME, Whitford TJ, Kubicki M. Structural neuroimaging in schizophrenia: from methods to insights to treatments. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2010;12(3):317-32.
 154. Rimol LM, Hartberg CB, Nesvag R, Fennema-Notestine C, Hagler DJ, Jr., Pung CJ, et al. Cortical thickness and subcortical volumes in schizophrenia and bipolar disorder. *Biological psychiatry*. 2010;68(1):41-50.
 155. Haukvik UK, Hartberg CB, Agartz I. Schizophrenia--what does structural MRI show? *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*. 2013;133(8):850-3.
 156. Hill K, Mann L, Laws KR, Stephenson CM, Nimmo-Smith I, McKenna PJ. Hypofrontality in schizophrenia: a meta-analysis of functional imaging studies. *Acta psychiatrica Scandinavica*. 2004;110(4):243-56.
 157. Gollub RL, Shoemaker JM, King MD, White T, Ehrlich S, Sponheim SR, et al. The MCIC collection: a shared repository of multi-modal, multi-site brain image data from a clinical investigation of schizophrenia. *Neuroinformatics*. 2013;11(3):367-88.
 158. Michael AM, Baum SA, Fries JF, Ho BC, Pierson RK, Andreasen NC, et al. A method to fuse fMRI tasks through spatial correlations: applied to schizophrenia. *Human brain mapping*. 2009;30(8):2512-29.
 159. Linden DE. [Auditory hallucinations and functional imaging]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*. 2008;76 Suppl 1:S33-9.
 160. Zubin J, Spring B. Vulnerability--a new view of schizophrenia. *Journal of abnormal psychology*. 1977;86(2):103-26.
 161. Davis J, Eyre H, Jacka FN, Dodd S, Dean O, McEwen S, et al. A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2016;65:185-94.
 162. van Os J, Rutten BP, Poulton R. Gene-environment interactions in schizophrenia:

- review of epidemiological findings and future directions. *Schizophrenia bulletin*. 2008;34(6):1066-82.
163. Pino O, Guilera G, Gomez-Benito J, Najas-Garcia A, Rufian S, Rojo E. Neurodevelopment or neurodegeneration: review of theories of schizophrenia. *Actas espanolas de psiquiatria*. 2014;42(4):185-95.
 164. Rund BR. Is schizophrenia a neurodegenerative disorder? *Nordic journal of psychiatry*. 2009;63(3):196-201.
 165. Rund BR. A review of longitudinal studies of cognitive functions in schizophrenia patients. *Schizophrenia bulletin*. 1998;24(3):425-35.
 166. Goldberg TE, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberger DR. Course of schizophrenia: neuropsychological evidence for a static encephalopathy. *Schizophrenia bulletin*. 1993;19(4):797-804.
 167. Rund BR, Sundet K, Asbjornsen A, Egeland J, Landro NI, Lund A, et al. Neuropsychological test profiles in schizophrenia and non-psychotic depression. *Acta psychiatrica Scandinavica*. 2006;113(4):350-9.
 168. Kurtz MM. Neurocognitive impairment across the lifespan in schizophrenia: an update. *Schizophrenia research*. 2005;74(1):15-26.
 169. Townsend LA, Norman RM. Course of cognitive functioning in first episode schizophrenia spectrum disorders. *Expert review of neurotherapeutics*. 2004;4(1):61-8.
 170. Hoff AL, Svetina C, Shields G, Stewart J, DeLisi LE. Ten year longitudinal study of neuropsychological functioning subsequent to a first episode of schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2005;78(1):27-34.
 171. Ojeda N, Sanchez P, Elizagarate E, Yoller AB, Ezcurra J, Ramirez I, et al. Course of cognitive symptoms in schizophrenia: a review of the literature. *Actas espanolas de psiquiatria*. 2007;35(4):263-70.
 172. Oie M, Sundet K, Rund BR. Neurocognitive decline in early-onset schizophrenia compared with ADHD and normal controls: evidence from a 13-year follow-up study. *Schizophrenia bulletin*. 2010;36(3):557-65.
 173. Arango C, Moreno C, Martinez S, Parellada M, Desco M, Moreno D, et al. Longitudinal brain changes in early-onset psychosis. *Schizophrenia bulletin*.

- 2008;34(2):341-53.
174. Reig S, Moreno C, Moreno D, Burdalo M, Janssen J, Parellada M, et al. Progression of brain volume changes in adolescent-onset psychosis. *Schizophrenia bulletin*. 2009;35(1):233-43.
 175. Lieberman J, Chakos M, Wu H, Alvir J, Hoffman E, Robinson D, et al. Longitudinal study of brain morphology in first episode schizophrenia. *Biological psychiatry*. 2001;49(6):487-99.
 176. Olabi B, Ellison-Wright I, McIntosh AM, Wood SJ, Bullmore E, Lawrie SM. Are there progressive brain changes in schizophrenia? A meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. *Biological psychiatry*. 2011;70(1):88-96.
 177. Gaur N, Gautam S, Gaur M, Sharma P, Dadheech G, Mishra S. The biochemical womb of schizophrenia: A review. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2008;23(4):307-27.
 178. Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, Gonzalez-Castaneda RE, Beas-Zarate C. [Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits]. *Neurologia (Barcelona, Spain)*. 2012;27(5):301-10.
 179. Walder DJ, Walker EF, Lewine RJ. Cognitive functioning, cortisol release, and symptom severity in patients with schizophrenia. *Biological psychiatry*. 2000;48(12):1121-32.
 180. Escamez T, Bahamonde O, Tabares-Seisdedos R, Vieta E, Martinez S, Echevarria D. Developmental dynamics of PAFAH1B subunits during mouse brain development. *The Journal of comparative neurology*. 2012;520(17):3877-94.
 181. Murray RM, Lewis SW. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *British medical journal (Clinical research ed)*. 1987;295(6600):681-2.
 182. Fatemi SH, Folsom TD. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophrenia bulletin*. 2009;35(3):528-48.
 183. Arango C, Fraguas D, Parellada M. Differential neurodevelopmental trajectories in patients with early-onset bipolar and schizophrenia disorders. *Schizophrenia bulletin*. 2014;40 Suppl 2:S138-46.
 184. Schmidt MJ, Mirnics K. Neurodevelopment, GABA system dysfunction, and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American*

- College of Neuropsychopharmacology. 2015;40(1):190-206.
185. Schmidt-Kastner R, van Os J, H WMS, Schmitz C. Gene regulation by hypoxia and the neurodevelopmental origin of schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2006;84(2-3):253-71.
 186. Brown AS, Cohen P, Greenwald S, Susser E. Nonaffective psychosis after prenatal exposure to rubella. *The American journal of psychiatry*. 2000;157(3):438-43.
 187. Brown AS. Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Developmental neurobiology*. 2012;72(10):1272-6.
 188. Mortensen PB, Pedersen CB, Westergaard T, Wohlfahrt J, Ewald H, Mors O, et al. Effects of family history and place and season of birth on the risk of schizophrenia. *The New England journal of medicine*. 1999;340(8):603-8.
 189. Avila MT, Sherr J, Valentine LE, Blaxton TA, Thaker GK. Neurodevelopmental interactions conferring risk for schizophrenia: a study of dermatoglyphic markers in patients and relatives. *Schizophrenia bulletin*. 2003;29(3):595-605.
 190. Tenyi T, Hajnal A, Halmai T, Herold R, Simon M, Tixler D, et al. [Minor physical anomalies in the relatives of schizophrenia patients. A systematic review of the literature]. *Psychiatria Hungarica : A Magyar Pszichiatriai Tarsasag tudományos folyoirata*. 2014;29(2):208-13.
 191. Xu T, Chan RC, Compton MT. Minor physical anomalies in patients with schizophrenia, unaffected first-degree relatives, and healthy controls: a meta-analysis. *PloS one*. 2011;6(9):e24129.
 192. Ambrosio-Gallardo F, Cruz-Fuentes C, Heinze-Martin G, Caraveo-Anduaga J, Cortes-Sotres J. Study of minor physical anomalies in complete nuclear Mexican families. Evidence of neurodevelopmental problems in schizophrenia. *PloS one*. 2015;10(1):e0117080.
 193. Barkus E, Stirling J, Hopkins R, Lewis S. The presence of neurological soft signs along the psychosis proneness continuum. *Schizophrenia bulletin*. 2006;32(3):573-7.
 194. Lloyd T, Dazzan P, Dean K, Park SB, Fearon P, Doody GA, et al. Minor physical anomalies in patients with first-episode psychosis: their frequency and diagnostic specificity. *Psychological medicine*. 2008;38(1):71-7.
 195. Dickson H, Laurens KR, Cullen AE, Hodgins S. Meta-analyses of cognitive and motor

- function in youth aged 16 years and younger who subsequently develop schizophrenia. *Psychological medicine*. 2012;42(4):743-55.
196. Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Molecular psychiatry*. 2005;10(1):40-68; image 5.
 197. Reiner O. LIS1 and DCX: Implications for Brain Development and Human Disease in Relation to Microtubules. *Scientifica*. 2013;2013:393975.
 198. Reiner O, Sapoznik S, Sapir T. Lissencephaly 1 linking to multiple diseases: mental retardation, neurodegeneration, schizophrenia, male sterility, and more. *Neuromolecular medicine*. 2006;8(4):547-65.
 199. Verrotti A, Spalice A, Ursitti F, Papetti L, Mariani R, Castronovo A, et al. New trends in neuronal migration disorders. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*. 2010;14(1):1-12.
 200. De Juan Romero C, Borrell V. Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia*. 2015;63(8):1303-19.
 201. Meyer G, Wahle P. The paleocortical ventricle is the origin of reelin-expressing neurons in the marginal zone of the foetal human neocortex. *The European journal of neuroscience*. 1999;11(11):3937-44.
 202. Kaas JH. Neocortex in early mammals and its subsequent variations. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1225:28-36.
 203. Dolbakyan EE, Merzhanova G. Organization of neural networks in the neocortex. *Neuroscience and behavioral physiology*. 2003;33(6):555-65.
 204. Suzuki IK, Hirata T. A common developmental plan for neocortical gene-expressing neurons in the pallium of the domestic chicken *Gallus gallus domesticus* and the Chinese softshell turtle *Pelodiscus sinensis*. *Frontiers in neuroanatomy*. 2014;8:20.
 205. Puellas L, Martínez S, Martínez M. *Neuroanatomía*. Madrid: Médica Panamericana; 2008.
 206. Defelipe J. The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Frontiers in neuroanatomy*. 2011;5:29.
 207. Kerjan G, Gleeson JG. Genetic mechanisms underlying abnormal neuronal migration in classical lissencephaly. *Trends in genetics : TIG*. 2007;23(12):623-30.

208. Rakic P. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991). 2003;13(6):541-9.
209. Marin Padilla M. [The evolution of the structure of the neocortex in mammals: a new theory of cytoarchitecture]. *Revista de neurologia*. 2001;33(9):843-53.
210. Liu JS. Molecular genetics of neuronal migration disorders. *Current neurology and neuroscience reports*. 2011;11(2):171-8.
211. Wu Q, Liu J, Fang A, Li R, Bai Y, Kriegstein AR, et al. The dynamics of neuronal migration. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;800:25-36.
212. Hippenmeyer S, Youn YH, Moon HM, Miyamichi K, Zong H, Wynshaw-Boris A, et al. Genetic mosaic dissection of *Lis1* and *Ndel1* in neuronal migration. *Neuron*. 2010;68(4):695-709.
213. Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience*. 2004;7(2):136-44.
214. Sidman RL, Rakic P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain research*. 1973;62(1):1-35.
215. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 1996;84(3):359-69.
216. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (New York, NY)*. 2003;302(5651):1704-9.
217. Caviness VS, Jr., Takahashi T, Nowakowski RS. Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends in neurosciences*. 1995;18(9):379-83.
218. Sun XZ, Takahashi S, Cui C, Zhang R, Sakata-Haga H, Sawada K, et al. Normal and abnormal neuronal migration in the developing cerebral cortex. *The journal of medical investigation : JMI*. 2002;49(3-4):97-110.
219. Marin O, Rubenstein JL. Cell migration in the forebrain. *Annual review of neuroscience*. 2003;26:441-83.
220. Valverde F. [Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex]. *Revista de neurologia*. 2002;34(8):758-80.

221. Jimenez D, Lopez-Mascaraque LM, Valverde F, De Carlos JA. Tangential migration in neocortical development. *Developmental biology*. 2002;244(1):155-69.
222. Nadarajah B, Parnavelas JG. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nature reviews Neuroscience*. 2002;3(6):423-32.
223. Rakic P, Caviness VS, Jr. Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron*. 1995;14(6):1101-4.
224. Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135(Pt 5):1348-69.
225. Rakic P. Extrinsic cytological determinants of basket and stellate cell dendritic pattern in the cerebellar molecular layer. *The Journal of comparative neurology*. 1972;146(3):335-54.
226. Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG. Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)*. 2003;13(6):607-11.
227. Parnavelas JG, Nadarajah B. Radial glial cells. are they really glia? *Neuron*. 2001;31(6):881-4.
228. Edmondson JC, Hatten ME. Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1987;7(6):1928-34.
229. Fishell G, Hatten ME. Astrotactin provides a receptor system for CNS neuronal migration. *Development (Cambridge, England)*. 1991;113(3):755-65.
230. Gasser UE, Hatten ME. Central nervous system neurons migrate on astroglial fibers from heterotypic brain regions in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(12):4543-7.
231. Gao WQ, Hatten ME. Immortalizing oncogenes subvert the establishment of granule cell identity in developing cerebellum. *Development (Cambridge, England)*. 1994;120(5):1059-70.
232. Anton ES, Kreidberg JA, Rakic P. Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron*. 1999;22(2):277-89.

233. Adams NC, Tomoda T, Cooper M, Dietz G, Hatten ME. Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration. *Development (Cambridge, England)*. 2002;129(4):965-72.
234. Schmechel DE, Rakic P. Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. *Nature*. 1979;277(5694):303-5.
235. Schmechel DE, Rakic P. A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anatomy and embryology*. 1979;156(2):115-52.
236. Jacobsen CT, Miller RH. Control of astrocyte migration in the developing cerebral cortex. *Developmental neuroscience*. 2003;25(2-4):207-16.
237. Gregory R. Circuits and bumps. *Perception*. 1998;27(12):1389-91.
238. Allendoerfer KL, Shatz CJ. The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annual review of neuroscience*. 1994;17:185-218.
239. Marin-Padilla M. [The development of the human cerebral cortex. A cytoarchitectonic theory]. *Revista de neurologia*. 1999;29(3):208-16.
240. Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee. *The Anatomical record*. 1970;166(2):257-61.
241. Paridaen JT, Huttner WB. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO reports*. 2014;15(4):351-64.
242. Cuzon VC, Yeh PW, Cheng Q, Yeh HH. Ambient GABA promotes cortical entry of tangentially migrating cells derived from the medial ganglionic eminence. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)*. 2006;16(10):1377-88.
243. Puelles L. Pallio-pallial tangential migrations and growth signaling: new scenario for cortical evolution? *Brain, behavior and evolution*. 2011;78(1):108-27.
244. Marin-Padilla M. Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends in neurosciences*. 1998;21(2):64-71.
245. Okhotin VE, Kalinichenko SG. [Layer I neurons and their significance in the neocortex embryogenesis]. *Morfologiya (Saint Petersburg, Russia)*. 2002;122(4):7-26.
246. Okhotin VE, Kalinichenko SG. Neurons of layer I and their significance in the

- embryogenesis of the neocortex. *Neuroscience and behavioral physiology*. 2004;34(1):49-66.
247. Guerrini R, Parrini E. Neuronal migration disorders. *Neurobiology of disease*. 2010;38(2):154-66.
248. Fernandez V, Llinares-Benadero C, Borrell V. Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *The EMBO journal*. 2016;35(10):1021-44.
249. Leventer RJ, Guerrini R, Dobyns WB. Malformations of cortical development and epilepsy. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2008;10(1):47-62.
250. Crome L. Pachygyria. *The Journal of pathology and bacteriology*. 1956;71(2):335-52.
251. Olson EC, Walsh CA. Smooth, rough and upside-down neocortical development. *Current opinion in genetics & development*. 2002;12(3):320-7.
252. Ferland RJ, Batiz LF, Neal J, Lian G, Bundock E, Lu J, et al. Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. *Human molecular genetics*. 2009;18(3):497-516.
253. Zhang J, Neal J, Lian G, Hu J, Lu J, Sheen V. Filamin A regulates neuronal migration through brefeldin A-inhibited guanine exchange factor 2-dependent Arf1 activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(40):15735-46.
254. Bahi-Buisson N, Guerrini R. Diffuse malformations of cortical development. *Handbook of clinical neurology*. 2013;111:653-65.
255. Guerrini R, Dobyns WB. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *The Lancet Neurology*. 2014;13(7):710-26.
256. Gressens P. Pathogenesis of migration disorders. *Current opinion in neurology*. 2006;19(2):135-40.
257. Dobyns WB, Andermann E, Andermann F, Czapansky-Beilman D, Dubeau F, Dulac O, et al. X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology*. 1996;47(2):331-9.
258. Geschwind DH, Levitt P. Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Current opinion in neurobiology*. 2007;17(1):103-11.
259. Knable MB, Torrey EF, Webster MJ, Bartko JJ. Multivariate analysis of prefrontal cortical data from the Stanley Foundation Neuropathology Consortium. *Brain research bulletin*. 2001;55(5):651-9.

260. Knable MB, Barci BM, Webster MJ, Meador-Woodruff J, Torrey EF. Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. *Molecular psychiatry*. 2004;9(6):609-20, 544.
261. Kato M, Dobyns WB. Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Human molecular genetics*. 2003;12 Spec No 1:R89-96.
262. Menascu S, Weinstock A, Farooq O, Hoffman H, Cortez MA. EEG and neuroimaging correlations in children with lissencephaly. *Seizure*. 2013;22(3):189-93.
263. Wynshaw-Boris A. Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clinical genetics*. 2007;72(4):296-304.
264. Qin P, Xu H, Laursen TM, Vestergaard M, Mortensen PB. Risk for schizophrenia and schizophrenia-like psychosis among patients with epilepsy: population based cohort study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2005;331(7507):23.
265. Foong J. Epilepsy or a family history of epilepsy increases the risk of schizophrenia or schizophrenia-like psychosis. *Evidence-based mental health*. 2006;9(1):23.
266. Clarke MC, Tanskanen A, Huttunen MO, Clancy M, Cotter DR, Cannon M. Evidence for shared susceptibility to epilepsy and psychosis: a population-based family study. *Biological psychiatry*. 2012;71(9):836-9.
267. Chang YT, Chen PC, Tsai IJ, Sung FC, Chin ZN, Kuo HT, et al. Bidirectional relation between schizophrenia and epilepsy: a population-based retrospective cohort study. *Epilepsia*. 2011;52(11):2036-42.
268. Clancy MJ, Clarke MC, Connor DJ, Cannon M, Cotter DR. The prevalence of psychosis in epilepsy; a systematic review and meta-analysis. *BMC psychiatry*. 2014;14:75.
269. Fry AE, Cushion TD, Pilz DT. The genetics of lissencephaly. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics*. 2014;166c(2):198-210.
270. Dobyns WB, Das S. LIS1-Associated Lissencephaly/Subcortical Band Heterotopia. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.

271. Friocourt G, Marcorelles P, Saugier-Veber P, Quille ML, Marret S, Laquerriere A. Role of cytoskeletal abnormalities in the neuropathology and pathophysiology of type I lissencephaly. *Acta neuropathologica*. 2011;121(2):149-70.
272. Barredo E, Miranda M, Castro P. Malformaciones primarias cerebrales. In: Verdú A, editor. *Manual de Neurología infantil*. 2a ed. Madrid: Editorial panamericana; 2014. p. 219-37.
273. Kelava I, Reillo I, Murayama AY, Kalinka AT, Stenzel D, Tomancak P, et al. Abundant occurrence of basal radial glia in the subventricular zone of embryonic neocortex of a lissencephalic primate, the common marmoset *Callithrix jacchus*. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991). 2012;22(2):469-81.
274. Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, et al. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature*. 1993;364(6439):717-21.
275. Dobyns WB, Reiner O, Carrozzo R, Ledbetter DH. Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *Jama*. 1993;270(23):2838-42.
276. McManus MF, Nasrallah IM, Pancoast MM, Wynshaw-Boris A, Golden JA. Lis1 is necessary for normal non-radial migration of inhibitory interneurons. *The American journal of pathology*. 2004;165(3):775-84.
277. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2003;40(6):643-72.
278. Bazan NG. Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. *Molecular neurobiology*. 2005;32(1):89-103.
279. Adachi T, Aoki J, Many H, Asou H, Arai H, Inoue K. PAF analogues capable of inhibiting PAF acetylhydrolase activity suppress migration of isolated rat cerebellar granule cells. *Neuroscience letters*. 1997;235(3):133-6.
280. Tabares-Seisdedos R, Mata I, Escamez T, Vieta E, Lopez-Ilundain JM, Salazar J, et al. Evidence for association between structural variants in lissencephaly-related genes and executive deficits in schizophrenia or bipolar patients from a Spanish isolate population. *Psychiatric genetics*. 2008;18(6):313-7.

281. Hippenmeyer S. Molecular pathways controlling the sequential steps of cortical projection neuron migration. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;800:1-24.
282. Efimov VP, Morris NR. The LIS1-related NUDF protein of *Aspergillus nidulans* interacts with the coiled-coil domain of the NUDE/RO11 protein. *The Journal of cell biology*. 2000;150(3):681-8.
283. Feng Y, Olson EC, Stukenberg PT, Flanagan LA, Kirschner MW, Walsh CA. LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome. *Neuron*. 2000;28(3):665-79.
284. Xiang X, Osmani AH, Osmani SA, Xin M, Morris NR. NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Molecular biology of the cell*. 1995;6(3):297-310.
285. Niethammer M, Smith DS, Ayala R, Peng J, Ko J, Lee MS, et al. NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron*. 2000;28(3):697-711.
286. McKenney RJ, Vershinin M, Kunwar A, Vallee RB, Gross SP. LIS1 and NudE induce a persistent dynein force-producing state. *Cell*. 2010;141(2):304-14.
287. Brandon NJ, Handford EJ, Schurov I, Rain JC, Pelling M, Duran-Jimeniz B, et al. Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophrenia and other major neurological disorders. *Molecular and cellular neurosciences*. 2004;25(1):42-55.
288. Hayashi MA, Felicori LF, Fresqui MA, Yonamine CM. Protein-Protein and Peptide-Protein Interactions of NudE-Like 1 (Ndel1): A Protein Involved in Schizophrenia. *Current protein & peptide science*. 2015;16(8):754-67.
289. Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, et al. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nature cell biology*. 2005;7(12):1167-78.
290. Assadi AH, Zhang G, Beffert U, McNeil RS, Renfro AL, Niu S, et al. Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nature genetics*. 2003;35(3):270-6.
291. Fatemi SH. Reelin glycoprotein: structure, biology and roles in health and disease. *Molecular psychiatry*. 2005;10(3):251-7.

292. Hirotsune S, Fleck MW, Gambello MJ, Bix GJ, Chen A, Clark GD, et al. Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nature genetics*. 1998;19(4):333-9.
293. Cahana A, Reiner O. LIS1 and platelet-activating factor acetylhydrolase (Ib) catalytic subunits, expression in the mouse oocyte and zygote. *FEBS letters*. 1999;451(2):99-102.
294. Cahana A, Escamez T, Nowakowski RS, Hayes NL, Giacobini M, von Holst A, et al. Targeted mutagenesis of Lis1 disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(11):6429-34.
295. Reiner O, Cahana A, Escamez T, Martinez S. LIS1-no more no less. *Molecular psychiatry*. 2002;7(1):12-6.
296. Gambello MJ, Darling DL, Yingling J, Tanaka T, Gleeson JG, Wynshaw-Boris A. Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(5):1719-29.
297. Valdes-Sanchez L, Escamez T, Echevarria D, Ballesta JJ, Tabares-Seisdedos R, Reiner O, et al. Postnatal alterations of the inhibitory synaptic responses recorded from cortical pyramidal neurons in the Lis1/sLis1 mutant mouse. *Molecular and cellular neurosciences*. 2007;35(2):220-9.
298. Bi W, Sapir T, Shchelochkov OA, Zhang F, Withers MA, Hunter JV, et al. Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. *Nature genetics*. 2009;41(2):168-77.
299. Garcia-Lopez R, Pombero A, Dominguez E, Geijo-Barrientos E, Martinez S. Developmental alterations of the septohippocampal cholinergic projection in a lissencephalic mouse model. *Experimental neurology*. 2015;271:215-27.
300. Bearden CE, Freimer NB. Endophenotypes for psychiatric disorders: ready for primetime? *Trends in genetics : TIG*. 2006;22(6):306-13.
301. Cannon TD, Keller MC. Endophenotypes in the genetic analyses of mental disorders. *Annual review of clinical psychology*. 2006;2:267-90.
302. Weiser M, van Os J, Davidson M. Time for a shift in focus in schizophrenia: from

- narrow phenotypes to broad endophenotypes. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 2005;187:203-5.
303. Asociación Americana De Psiquiatría. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales-DSM 5. 5a ed. Madrid: Médica Panamericana; 2014. p. 87-8.
 304. Sanjuan J, Aguilar EJ, de Frutos R. Time for a broad phenotype in schizophrenia? *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 2006;188:190.
 305. Allen P, Laroi F, McGuire PK, Aleman A. The hallucinating brain: a review of structural and functional neuroimaging studies of hallucinations. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2008;32(1):175-91.
 306. Blom JD. Auditory hallucinations. *Handbook of clinical neurology*. 2015;129:433-55.
 307. Hugdahl K, Loberg EM, Specht K, Steen VM, van Wageningen H, Jorgensen HA. Auditory hallucinations in schizophrenia: the role of cognitive, brain structural and genetic disturbances in the left temporal lobe. *Frontiers in human neuroscience*. 2007;1:6.
 308. Barta PE, Pearlson GD, Powers RE, Richards SS, Tune LE. Auditory hallucinations and smaller superior temporal gyral volume in schizophrenia. *The American journal of psychiatry*. 1990;147(11):1457-62.
 309. Andreasen NC, Flaum M, Swayze V, 2nd, O'Leary DS, Alliger R, Cohen G, et al. Intelligence and brain structure in normal individuals. *The American journal of psychiatry*. 1993;150(1):130-4.
 310. Morch-Johnsen L, Nesvag R, Jorgensen KN, Lange EH, Hartberg CB, Haukvik UK, et al. Auditory Cortex Characteristics in Schizophrenia: Associations With Auditory Hallucinations. *Schizophrenia bulletin*. 2017;43(1):75-83.
 311. Suzuki M, Yuasa S, Minabe Y, Murata M, Kurachi M. Left superior temporal blood flow increases in schizophrenic and schizophreniform patients with auditory hallucination: a longitudinal case study using 123I-IMP SPECT. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 1993;242(5):257-61.
 312. Dierks T, Linden DE, Jandl M, Formisano E, Goebel R, Lanfermann H, et al. Activation of Heschl's gyrus during auditory hallucinations. *Neuron*. 1999;22(3):615-21.
 313. Lennox BR, Park SB, Medley I, Morris PG, Jones PB. The functional anatomy of auditory hallucinations in schizophrenia. *Psychiatry research*. 2000;100(1):13-20.

314. Shergill SS, Brammer MJ, Amaro E, Williams SC, Murray RM, McGuire PK. Temporal course of auditory hallucinations. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 2004;185:516-7.
315. Jardri R, Pouchet A, Pins D, Thomas P. Cortical activations during auditory verbal hallucinations in schizophrenia: a coordinate-based meta-analysis. *The American journal of psychiatry*. 2011;168(1):73-81.
316. Kuhn S, Gallinat J. Quantitative meta-analysis on state and trait aspects of auditory verbal hallucinations in schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*. 2012;38(4):779-86.
317. Shinn AK, Baker JT, Cohen BM, Ongur D. Functional connectivity of left Heschl's gyrus in vulnerability to auditory hallucinations in schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2013;143(2-3):260-8.
318. Allen P, Modinos G, Hubl D, Shields G, Cacia A, Jardri R, et al. Neuroimaging auditory hallucinations in schizophrenia: from neuroanatomy to neurochemistry and beyond. *Schizophrenia bulletin*. 2012;38(4):695-703.
319. Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *The Journal of comparative neurology*. 2003;467(1):60-79.
320. Stiebler I, Neulist R, Fichtel I, Ehret G. The auditory cortex of the house mouse: left-right differences, tonotopic organization and quantitative analysis of frequency representation. *Journal of comparative physiology A, Sensory, neural, and behavioral physiology*. 1997;181(6):559-71.
321. del Rio JA, de Lecea L, Ferrer I, Soriano E. The development of parvalbumin-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *Brain research Developmental brain research*. 1994;81(2):247-59.
322. de Lecea L, del Rio JA, Soriano E. Developmental expression of parvalbumin mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of the rat. *Brain research Molecular brain research*. 1995;32(1):1-13.
323. Super H, Soriano E, Uylings HB. The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain research Brain research reviews*. 1998;27(1):40-64.

324. Sapir T, Elbaum M, Reiner O. Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *The EMBO journal*. 1997;16(23):6977-84.
325. Many H, Aoki J, Kato H, Ishii J, Hino S, Arai H, et al. Biochemical characterization of various catalytic complexes of the brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(45):31827-32.
326. Faulkner NE, Dujardin DL, Tai CY, Vaughan KT, O'Connell CB, Wang Y, et al. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nature cell biology*. 2000;2(11):784-91.
327. Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Progress in neurobiology*. 1996;50(2-3):83-107.
328. Kasof GM, Smeyne RJ, Curran T, Morgan JI. Developmental expression of Fos-lacZ in the brains of postnatal transgenic rats. *Brain research Developmental brain research*. 1996;93(1-2):191-7.
329. Kovacs KJ. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of neuroendocrinology*. 2008;20(6):665-72.
330. Joo JY, Schaukowitch K, Farbiak L, Kilaru G, Kim TK. Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. *Nature neuroscience*. 2016;19(1):75-83.
331. Pan H, Zhang P, Li JR, Wang H, Jin MF, Feng C, et al. c-Fos-Regulated Matrix Metalloproteinase-9 Expression is Involved in 17beta-Estradiol-Promoted Invasion of Human Endometrial Stromal Cell. *Current molecular medicine*. 2016;16(3):266-75.
332. Lipka J, Kuijpers M, Jaworski J, Hoogenraad CC. Mutations in cytoplasmic dynein and its regulators cause malformations of cortical development and neurodegenerative diseases. *Biochemical Society transactions*. 2013;41(6):1605-12.
333. Bartos M, Vida I, Jonas P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nature reviews Neuroscience*. 2007;8(1):45-56.
334. Zaitsev AV, Povysheva NV, Gonzalez-Burgos G, Rotaru D, Fish KN, Krimer LS, et al. Interneuron diversity in layers 2-3 of monkey prefrontal cortex. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)*. 2009;19(7):1597-615.
335. Kawabata I, Kashiwagi Y, Obashi K, Ohkura M, Nakai J, Wynshaw-Boris A, et al. LIS1-

- dependent retrograde translocation of excitatory synapses in developing interneuron dendrites. *Nature communications*. 2012;3:722.
336. Sudarov A, Gooden F, Tseng D, Gan WB, Ross ME. Lis1 controls dynamics of neuronal filopodia and spines to impact synaptogenesis and social behaviour. *EMBO molecular medicine*. 2013;5(4):591-607.
337. Kikuchi M, Hashimoto T, Nagasawa T, Hirosawa T, Minabe Y, Yoshimura M, et al. Frontal areas contribute to reduced global coordination of resting-state gamma activities in drug-naive patients with schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2011;130(1-3):187-94.
338. Spencer KM. Baseline gamma power during auditory steady-state stimulation in schizophrenia. *Frontiers in human neuroscience*. 2011;5:190.
339. Liu J, Corbera S, Wexler BE. Neural activation abnormalities during self-referential processing in schizophrenia: an fMRI study. *Psychiatry research*. 2014;222(3):165-71.
340. Brealy JA, Shaw A, Richardson H, Singh KD, Muthukumaraswamy SD, Keedwell PA. Increased visual gamma power in schizoaffective bipolar disorder. *Psychological medicine*. 2015;45(4):783-94.
341. Del Pino I, Garcia-Frigola C, Dehorter N, Brotons-Mas JR, Alvarez-Salvado E, Martinez de Lagran M, et al. Erbb4 deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like phenotypes. *Neuron*. 2013;79(6):1152-68.
342. Tikka SK, Nizamie SH, Das B, Katshu MZ, Goyal N. Increased spontaneous gamma power and synchrony in schizophrenia patients having higher minor physical anomalies. *Psychiatry research*. 2013;207(3):164-72.
343. Sadananda M, Wohr M, Schwarting RK. Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neuroscience letters*. 2008;435(1):17-23.
344. Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(20):11050-5.
345. Escámez MT. Análisis experimental de la expresión del ge Lis1 en el desarrollo cortical del encéfalo de mamíferos. [Tesis Doctoral]. Murcia: Murcia; 2004.

346. Hug A, Bartsch A, Gutschalk A. Voices behind the left shoulder: two patients with right-sided temporal lobe epilepsy. *Journal of the neurological sciences*. 2011;305(1-2):143-6.
347. Dyck MS, Mathiak KA, Bergert S, Sarkheil P, Koush Y, Alawi EM, et al. Targeting Treatment-Resistant Auditory Verbal Hallucinations in Schizophrenia with fMRI-Based Neurofeedback - Exploring Different Cases of Schizophrenia. *Frontiers in psychiatry*. 2016;7:37.