

Discriminación mnésica e integridad del complejo hipocampal en epilepsia del lóbulo temporal: un estudio anatomofuncional

Alicia Comino García-Muñoz
Máster en Neurociencia



MÁSTERES
DE LA UAM
2019 – 2020

Facultad de Ciencias



Master en
Neurociencia
UAM



TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Discriminación mnésica e integridad del complejo
hipocampal en epilepsia del lóbulo temporal:
un estudio anatomofuncional**

Autora: **Alicia Comino García-Muñoz**

Madrid, 07 de septiembre de 2020



Master en
Neurociencia
UAM



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Discriminación mnésica e integridad del complejo hipocampal en epilepsia del lóbulo temporal: un estudio anatomofuncional

Autora: **Alicia Comino García-Muñoz**

Director: **Dr. Pablo Campo Martínez-Lage**

Afiliación: Universidad Autónoma de Madrid

Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049, Madrid.

Co-director: **Yasser Alemán Gómez**

Afiliación: Universidad de Lausanne (UNIL),

1015 Lausanne, Suiza

Madrid, 07 de septiembre de 2020



**Master en
Neurociencia
UAM**



Pablo Campo Martínez-Lage

Facultad de Psicología, Universidad Autónoma de Madrid

Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049, Madrid.

Como Director del Trabajo Fin de Máster titulado “Discriminación mnésica e integridad del complejo hipocampal en epilepsia del lóbulo temporal: un estudio anatomofuncional”, que ha realizado bajo mi supervisión Dña. Alicia Comino García-Muñoz como parte de sus trabajos para la obtención del Título de Máster en Neurociencia por la Universidad Autónoma de Madrid,

DECLARO:

- Que reúne los méritos suficientes para poder ser presentado y defendido públicamente.
- Que el uso de pacientes utilizados en este TFM está amparado por la autorización del Comité de Ética.

Madrid, 07 de septiembre de 2020

Fdo.: Pablo Campo Martínez-Lage

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	La memoria declarativa.....	1
➤	El hipocampo como base de la memoria declarativa	2
➤	Teoría de las funciones complementarias	3
1.2.	Estudio de las funciones mnemónicas.....	8
➤	Modelos animales	8
➤	Estudios en humanos	9
1.3.	Alteraciones de las funciones mnemónicas.....	11
➤	El envejecimiento	11
➤	Deterioro cognitivo leve amnésico	13
➤	Encefalitis LG1	14
➤	Epilepsia temporal medial con esclerosis del hipocampo	14
2.	Hipótesis y objetivos	18
3.	Materiales y métodos	19
3.1.	Sujetos de estudio.....	19
3.2.	Pruebas neuropsicológicas.....	19
3.3.	Pruebas conductuales.....	20
➤	Descripción de la tarea.....	20
3.4.	Adquisición de las imágenes	22
➤	Introducción a la resonancia magnética	22
➤	Parámetros de adquisición para la muestra empleada	25
3.5.	Post-procesamiento de imágenes.....	26
➤	Procesamiento de las imágenes T1w y T2w: Extracción del cerebro	26
➤	Procesamiento de las imágenes T1w y T2w: Segmentación del hipocampo.....	27
➤	Procesamiento de las imágenes ponderadas en difusión: Análisis de la microestructura del hipocampo	29
3.6.	Análisis estadístico	30
4.	RESULTADOS	32
4.1.	Análisis de los resultados de la tarea MST.....	32
4.2.	Caracterización de las alteraciones volumétricas.....	33
4.3.	Relación entre el análisis volumétrico y la tarea MST	35
➤	Condición O_N: memoria de reconocimiento	35
➤	Condición O_S: separación de patrones	36
4.4.	Caracterización de los cambios en la difusión de la microestructura.....	36

4.5.	Relación entre el estado de la microestructura y la tarea MST.....	38
➤	Condición O_N: memoria de reconocimiento	38
➤	Condición O_S: separación de patrones	40
5.	DISCUSIÓN	42
5.1.	Caracterización de los déficits mnemónicos.....	42
5.2.	Alteraciones en las subestructuras hipocampales.....	43
5.3.	Relación entre las alteraciones estructurales y de la memoria	44
5.4.	Limitaciones	47
5.5.	Perspectivas futuras.....	48
6.	CONCLUSIONES	50
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	51
8.	ANEXO	57
8.1.	Muestra del estudio.....	57
8.2.	TEST NEUROPSICOLÓGICOS.....	57
➤	Prueba de fluidez semántica y fonológica:	57
➤	Tarea de denominación de Philadelphia de 175 elementos.....	57
➤	Test de discriminación visual de objetos:	58
➤	Tarea de recuerdo verbal selectivo.....	58
8.3.	Relación entre el análisis volumétrico y la tarea MST	59
8.4.	Relación entre el estado de la microestructura y la tarea MST.....	60

RESUMEN

La separación de patrones (SP) es un proceso fundamental de la codificación mnemónica que se define como la capacidad para transformar señales de entrada similares en representaciones de memoria diferenciadas, evitando que se superpongan unas con otras al almacenarlas y recuperarlas. Evidencias experimentales con modelos animales y el estudio de otras patologías humanas han evidenciado el papel del hipocampo en la SP, en particular del giro dentado (GD) y CA3. Los pacientes de epilepsia temporal medial con esclerosis de hipocampo (ETM-EH) presentan déficits mnemónicos característicos que se han asociado a fallos en la SP. Sin embargo, la asociación entre estos déficits y la integridad de las diferentes subestructuras hipocampales no ha sido aún caracterizada en esta enfermedad. El objetivo de este proyecto es explorar la asociación entre la funcionalidad mnemónica y la integridad de las subestructuras hipocampales CA1, CA3 y GD en pacientes con ETM-EH unilateral. Para la consecución de este objetivo se evaluó el estado mnémico de los pacientes con una prueba de discriminación mnemónica adaptada. Posteriormente, para determinar la integridad del complejo hipocampal se emplearon datos de volumetría y difusión de la microestructura obtenidos con resonancia magnética de 3T. Nuestros datos indican que los pacientes con ETM-EH unilateral presentan más dificultades para la realización de tareas de mnemónicas que analizan la función de SP, especialmente en condiciones de interferencia alta. Estos déficits mnemónicos específicos correlacionan con el estado de las fibras de sustancia blanca de las subregiones GD y CA3 contralaterales al foco epiléptico y por tanto al daño esclerótico principal.

Palabras clave: memoria episódica, separación de patrones, epilepsia del lóbulo temporal, hipocampo, resonancia magnética.

ABSTRACT

Pattern separation (PS) is a fundamental aspect of memory creation that defines the ability to transform similar memory representations into distinct ones, so they do not overlap when storing and retrieving them. Experimental evidence in animal models and the study of other human pathologies have demonstrated the role of the hippocampus in PS, in particular of the dentate gyrus (DG) and CA3. Patients with mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis (mTLE-HE) commonly report mnemonic deficits that have been associated with failures in PS. However, the link between these impairments and the integrity of the hippocampal subfields in these patients has not yet been determined. The aim of this project is to explore the association between the ability to perform mnemonic functions and the integrity of hippocampal CA1, CA3, DG in patients with unilateral mTLE-HE. To reach this goal we evaluated the memory of the patients with an improved object mnemonic similarity test. We then analyzed the hippocampal complex integrity with structural and microstructural diffusion data from high resolution 3T MRI. Our data indicate that patients with unilateral mTLE-HE present more difficulties in the mnemonic discrimination test that target PS, especially in conditions with higher interference. These specific mnemonic deficits would correlate with the integrity of white matter tracts in the subregions DG and CA3 contralateral to the seizure focus and therefore to the main sclerotic damage.

Keywords: episodic memory, pattern separation, temporal lobe epilepsy, hippocampus, magnetic resonance.

ABREVIATURAS

AI	Ángulo de inclinación (<i>flip angle</i>)
CA	<i>Cornus ammonis</i>
CE	Corteza entorrinal
CEL	Corteza entorrinal lateral
CEM	Corteza entorrinal medial
CP	Compleción de patrones
C-Pr	Corteza perirrinal
C-Pa	Corteza parahipocampal
DCLa	Deterioro cognitivo leve amnésico
DM	Difusión media
DMEXTRA	Difusión media del espacio extra-neurita
DWI	Imagen ponderada por difusión (<i>diffusion weighted image</i>)
EA	Enfermedad de Alzheimer
EEG	Electroencefalografía
EH	Esclerosis hipocampal
EPI	Secuencia eco planar (<i>Echo planar imaging</i>)
ETM	Epilepsia temporal medial
ETM-EH	Epilepsia temporal medial con esclerosis hipocampal
EXTRA	Espacio extra-neurita
FA	Fracción de anisotropía
FOV	Volumen de interés (<i>field of view</i>)
fMRI	Imagen de resonancia magnética funcional
GD	Giro dentado
ILAE	Liga Internacional Contra la Epilepsia (<i>International League Against Epilepsy</i>)
INTRA	Espacio intra-neurita
IT	Tiempo de inversión (<i>inversion time</i>)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LTM	Lóbulo temporal medial
MST	Tarea de similitud mnemónica (<i>Mnemonic Similarity Task</i>)
O_N	Condición viejo frente a nuevo (<i>old vs new</i>)
O_S	Condición viejo frente a distractor (<i>old vs similar</i>)
RM	Resonancia magnética

SB	Sustancia blanca
SG	Sustancia gris
SMT	<i>Spherical Mean Technique</i>
SP	Separación de patrones
T1w	Imagen ponderada en T1 (<i>T1 weighted image</i>)
T2w	Imagen ponderada en T2 (<i>T2 weighted image</i>)
TE	Tiempo de eco (<i>echo time</i>)
TR	Tiempo de repetición (<i>repetition time</i>)
VBM	Morfometría basada en vóxel (<i>Voxel based morphometry</i>)
VINTRA	Fracción volumétrica del espacio intra-neurita
VP	Vía perforante

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La memoria declarativa

La memoria es un proceso cognitivo que se relaciona con el procesamiento y el almacenamiento de información aprendida. En función de sus características la memoria a largo plazo se divide en dos tipos: declarativa y no declarativa (1). La memoria declarativa es aquella a la que podemos acceder de manera consciente y comunicar de manera explícita. Comprende el conocimiento de hechos, datos, palabras, su significado y relaciones entre sí (memoria semántica) y el conocimiento de acontecimientos con un contexto espacio-temporal que han sido experimentados personalmente (memoria episódica). Por otro lado, la memoria no declarativa es aquella no verbalizable ni accesible conscientemente. Incluye la memoria de habilidades (procedimental), el aprendizaje no asociativo (reflejos), la facilitación (del inglés *priming*) y el condicionamiento (2). Cada uno de los sistemas de memoria se asocia con un área cerebral determinada (3).

En la memoria declarativa se observa un conflicto entre dos mecanismos: la generalización, que es la capacidad para detectar regularidades en eventos que se repiten; y la especificidad, que permite almacenar eventos y detalles particulares (4). Estos mecanismos aparecen en todos los subtipos de memoria declarativa, ya que el conocimiento semántico puede ser general o muy detallado, sin que se tenga acceso a los eventos particulares en los que se adquirió dicha memoria. De la misma forma, una memoria episódica de una experiencia definida en el tiempo en la cual el sujeto ha participado activamente puede ser rica en detalles o poco detallada (3,5).

La generalización y la especificidad quedan representados en la división funcional de la memoria declarativa en dos procesos fundamentales: la separación de patrones (SP) y la compleción de patrones (CP) (6). La SP separa señales de entrada muy similares al codificar cada componente de memoria, eliminando interferencias; y la CP integra señales parciales con representaciones de memoria ya almacenadas, ya sea para crear nuevas memorias generalizadas (7) o para recuperar componentes de memoria ya almacenados (8). El buen funcionamiento de la memoria y de los comportamientos guiados por ésta dependen de un balance entre los dos procesos complementarios, para poder reconocer tanto lo singular como lo común en experiencias muy similares (9,10).

Durante el desarrollo de la memoria humana se evidencia la importancia del equilibrio entre las dos funciones. La CP precede en el desarrollo a la SP, la cual no se considera madura hasta bien

entrada la adolescencia. Este desequilibrio en la aparición de las dos funciones hace que la infancia se caracterice por una tendencia a la generalización (CP) sacrificando la especificidad (SP). Es decir, se adquiere mucho conocimiento del mundo y las asociaciones que se repiten, pero no se forman apenas memorias específicas (4).

El sustrato neuroanatómico principal de la memoria declarativa se encuentra en el lóbulo temporal medial (LTM) (11). En concreto, está reconocido el papel de la formación hipocampal en los procesos de SP (12) y CP (13) necesarios para dar lugar a los distintos tipos de memoria declarativa.

➤ *El hipocampo como base de la memoria declarativa*

La formación del hipocampo es una estructura del LTM compuesta del subículo, el asta de Ammón (CA) y el giro dentado (GD). El subículo se encuentra entre la corteza entorrinal del giro parahipocampal (periarquicorteza) y la región de GD y CA (arquicorteza). Según sus características citoarquitectónicas, el CA se divide en CA1, CA2, CA3 y CA4. Ésta última se localiza dentro del hilio del giro dentado (14) (*Figura 1*).

La formación del hipocampo recibe aferencias de la corteza entorrinal (CE), donde se da una disociación similar a la que ocurre con las corrientes ventral y dorsal de los sistemas visual o auditivo (15). En concreto, la CE lateral, que recibe aferencias de la corteza perirrinal (C-Pr) lleva información relativa al contenido de una experiencia. Por su parte la CE medial, conectada con la corteza parahipocampal (C-Pa), lleva información de tipo contextual (*Figura 2*) (16).

Los axones de las neuronas corticales de ambas vías de procesamiento proyectan a través de la vía perforante (VP), que atraviesa el subículo y se dirige al GD y CA3. Las células granulares del GD a su vez proyectan a CA3, que conecta con CA1 vía las colaterales de Schaffer. CA1 a su vez proyecta de nuevo al subículo y a la CE, cerrándose así el circuito hipocampal intrínseco (14). (*Figura 1*)

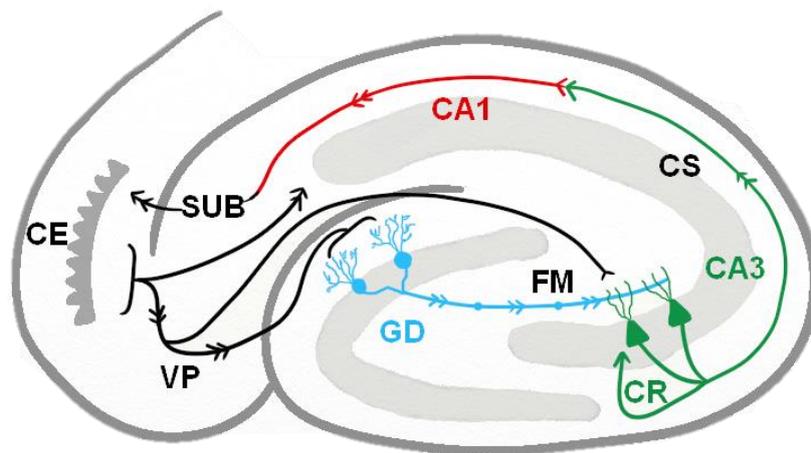


Figura 1. **Diagrama de la sección transversal de un hipocampo** con las principales regiones y conexiones que participan en la consolidación y recuperación de la memoria declarativa. En color, las áreas que conforman el circuito trisináptico que estudiaremos en este trabajo. CE = corteza entorrinal, VP = vía perforante, GD = giro dentado, FM = fibras musgosas, CR = colaterales recurrentes, CS = colaterales de Schaffer, SUB = subículo. Adaptado de Coulthard et al, 2017 (17)

En los últimos años se ha puesto en evidencia que las diferentes subestructuras del LTM participan de forma distinta en los procesos de SP y CP (6). Esto queda recogido en la teoría de las funciones complementarias (18,19).

➤ *Teoría de las funciones complementarias*

Para poder almacenar el máximo de información con la mínima interferencia, el hipocampo es capaz de separar patrones, es decir, diferenciar dos *inputs* muy similares antes de almacenarlos para que no se superpongan (20); pero también de completar patrón, relacionando pistas parciales o degradadas con memorias ya almacenadas (Figura 2) (9).

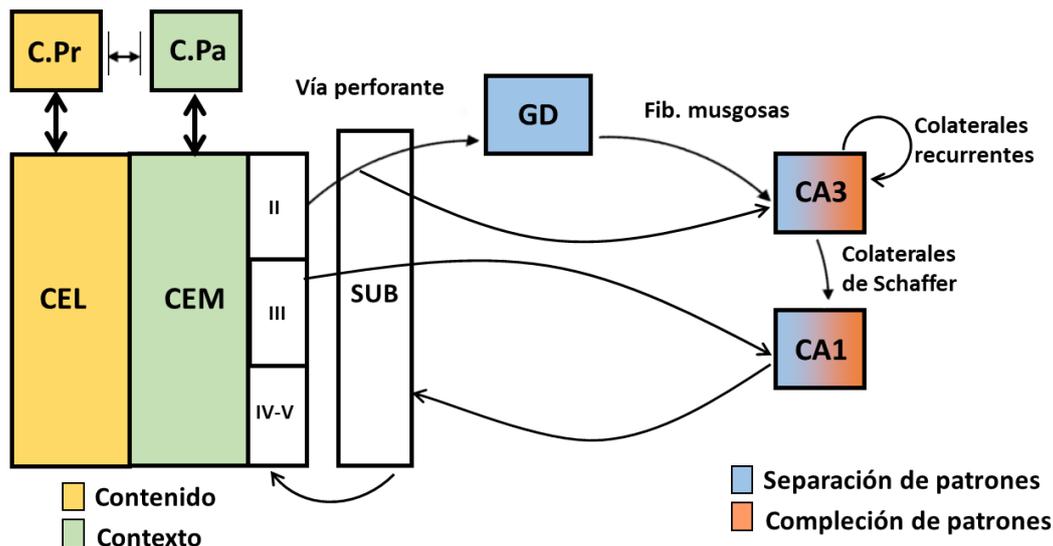


Figura 2. Representación esquemática de las **funciones complementarias de la memoria en el hipocampo**. Las cortezas entorrinal lateral (CEL) y medial (CEM) reciben aferencias procedentes de las cortezas perirrinal (C-Pr) y parahipocámpal (C-Pa) respectivamente. La información a este nivel está separada en aquella relativa al contenido y al contexto de la experiencia. La CE envía esta información al GD a través de la vía perforante que atraviesa el subículo. El GD lleva a cabo la función de SP, y transmite los contenidos neurales ya separados a CA3 y CA1, que refuerzan y transmiten esta información hacia áreas neocorticales. CA1 y CA3 también participan en la CP gracias a las aferencias que también reciben de la CE y a la potente red de colaterales recurrentes en el caso de CA3. Adaptada de Leal y Yassa, 2018 (19).

Separación de patrones

La separación de patrones es un fenómeno que se da en dos niveles diferentes. A nivel computacional es un proceso de ortogonalización en el que una neurona o grupo de neuronas transforman señales de entrada solapadas en patrones de salida diferentes entre sí. Por otro lado, a nivel comportamental, es la capacidad de discriminar entre dos estímulos similares presentados (21).

La subestructura hipocámpal responsable en su mayoría de la SP parece ser el GD (8). La principal aferencia del GD son los axones de las células de la capa II de la CE. Estas fibras atraviesan la fisura del hipocampo formando la vía perforante y sinaptan con las dendritas apicales de las células granulares del GD. En esta estructura se lleva a cabo un primer procesamiento de la señal procedente de la CE (9) y la información ya separada se proyecta hacia las células piramidales de CA3 por las fibras musgosas (18).

El GD es capaz de transformar las numerosas aferencias corticales complejas que recibe en códigos de activación neuronal en los que solo se activan unas pocas células granulares (22). Esto lo hace gracias a las propiedades intrínsecas de dichas células y a una potente red local de

inhibición. Esta propiedad distintiva le permite ejercer una doble función. Por un lado, el GD actúa de “guardián” de la entrada al hipocampo, limitando el input cortical excitatorio que llega a CA3 y a sus colaterales recurrentes. Así se evita una hiperexcitación del circuito hipocampal intrínseco que podría derivar en actividad epiléptica. Por otro lado, permite llevar a cabo la SP (23). Es capaz de detectar y destacar discrepancias en las señales de entrada para crear patrones de salida diferenciados en los que se activan pocas neuronas, evitando representaciones corticales superpuestas (24).

Otra región relevante en este proceso es por tanto CA3. La aferencia externa principal de las células piramidales de CA3 son las fibras musgosas procedentes de las células granulares del GD, por lo que recibirían la información que ya ha empezado a procesar el GD para almacenar como un componente de memoria único (mediante la SP). También recibe otras aferencias externas del área septal medial, interneuronas de CA1 y la VP desde la capa II de la CE (25).

La señal que llega a las células de CA3 a través de las fibras musgosas es una señal fuerte pero dispersa, ya que cada célula piramidal de CA3 recibe pocas aferencias procedentes de esta vía. Esto permite que señales de entrada similares puedan activar grupos muy distintos de neuronas en CA3, reforzándose la codificación en patrones separados que se da en primer lugar en el GD (18).

Por último, también se ha estudiado la posibilidad de que la SP empiece incluso antes de que la información cortical entre en el hipocampo. Las C-Pr y C-Pa, que transmiten de manera separada la información del contenido y el contexto de una experiencia, también estarían contribuyendo en un nivel más básico a la creación de memorias no solapadas (*Figura 2*). Fallos en alguna de estas vías aumenta la dificultad de las regiones GD/CA3 para llevar a cabo la SP (26).

Compleción de patrones

Las fibras musgosas no constituyen la aferencia principal de las células piramidales de CA3: casi el 95% de aferencias que recibe cada célula de CA3 proviene de los axones de otras células vecinas de CA3, denominadas colaterales recurrentes o fibras de asociación (27). Se cree que estas fibras serían las que favorecen que se lleve a cabo la CP (18) (*Figura 2*).

La aferencia directa de información desde la vía perforante, junto con las fibras recurrentes, constituirían la base neural del recuerdo (28). La señal que proviene de la CE es débil y constituiría una pequeña parte de la representación de memoria que queremos evocar (28,29). Las fibras recurrentes generan una red autoasociativa que permite evocar un patrón guardado a partir de señales de entrada parciales (30). CA3 sería responsable de la CP porque al recibir un

patrón sensorial parcial o degradado es capaz de generar un patrón de salida más parecido al patrón original almacenado y así poder generalizar y evocar un recuerdo con pocas claves (9).

CA3 es capaz de llevar a cabo la SP o la CP dependiendo del estímulo de entrada: si dos estímulos son altamente similares, CA3 tiende a completar patrón y reconocerlos como el mismo. Sin embargo, si aumenta la diferencia entre los estímulos cambia radicalmente su funcionamiento y sí que es capaz de separar sus representaciones. El cambio de realizar la CP a realizar la SP en CA3 no es lineal, sino que se da de forma abrupta a partir de un grado de similitud entre estímulos (31). Esto contrasta con el funcionamiento del GD que sí puede realizar la SP entre estímulos de entrada muy similares (24) (Figura 3).

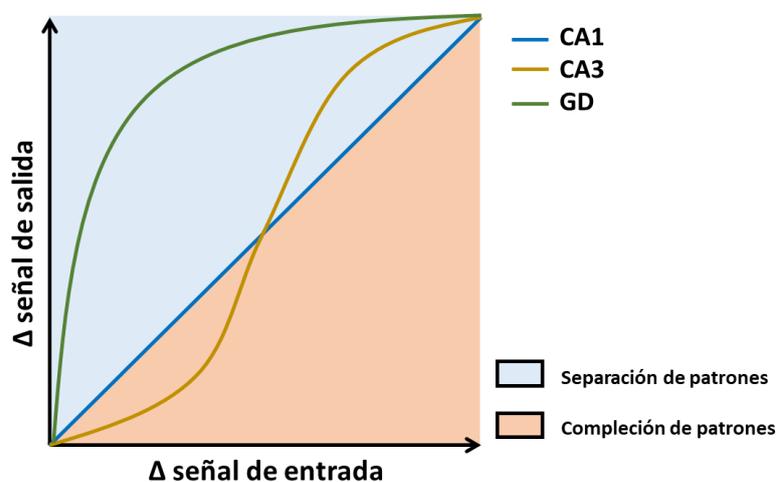


Figura 3. Representación esquemática de la actividad de las subregiones hipocampales CA1, CA3 y el GD en respuesta a señales con diferente grado de similitud. Las neuronas del GD (verde) son capaces de producir señales de salida diferenciadas incluso con inputs muy similares (SP). CA3 (amarillo) responde de manera no lineal a variaciones en el estímulo de entrada: si dos estímulos son muy similares, tiende a reconocerlos como el mismo (CP). Sin embargo, a partir de un punto, si aumenta la diferencia entre los estímulos, cambia de forma abrupta su funcionamiento y sí que es capaz de separar sus representaciones (SP). Por último, CA1 (azul) tiene una respuesta continua y lineal, produciendo patrones neurales de salida más diferenciados cuanto mayor es la diferencia entre las señales de entrada. Adaptada de Yassa y Stark, 2011 (8)

El papel de CA1 en los procesos de SP y CP no ha sido bien definido en humanos. La mayoría de los estudios hasta ahora le han atribuido un papel en la CP y la memoria de reconocimiento junto con CA3 (32), si bien su respuesta a los cambios del estímulo de entrada es más continua y lineal (Figura 3). Es decir, produce patrones de salida más separados cuanto mayor es la diferencia entre inputs en vez de hacer un salto abrupto a partir de cierto grado de diferencia como sucedía en CA3 (31,33). Sin embargo, algunos trabajos recientes han relacionado CA1 también con la SP. Esto tiene sentido dado que CA1 es la tercera estructura del circuito

trisináptico del hipocampo y la principal vía de salida desde CA3 a otras áreas neocorticales (*Figura 1*). La contribución de CA1 a la SP implicaría más la transferencia de la información ya separada en GD y CA3 hacia centros superiores que una computación neuronal propia (34).

En resumen, según los modelos computacionales y los datos de electrofisiología, el GD interviene en la creación de patrones de memoria diferenciados a partir de aferencias corticales similares, siendo responsable de la SP. Por su parte CA3 participa en la SP y la CP: recibe y refuerza las aferencias provenientes del GD (SP) y, mediante la aferencia que recibe por la vía perforante de la CE y sus propias fibras recurrentes, lleva a cabo la CP durante el recuerdo (*revisado en 23,24*). Por último, CA1 participa fundamentalmente en la CP junto con CA3, y en menor medida en la SP transmitiendo la información ya diferenciada desde las estructuras anteriores (*Figura 2*) (34).

Esta propiedad del cerebro humano de almacenar y recuperar información no sería posible sin la capacidad fundamental de olvidar. Sin ella nuestros cerebros no podrían retener únicamente la información significativa o relevante para nuestra vida, pues colapsarían con la gran cantidad de información inútil que quedaría almacenada en la memoria (35). El olvido también ayuda a la generalización (36). La presencia de muchas memorias detalladas del pasado promueve que no podemos integrar ninguna memoria nueva con otras ya almacenadas. Existe una gran cantidad de teorías que intentan explicar los mecanismos del olvido, pero la mayoría de los autores coinciden en que es un proceso que sucede por mecanismos tanto activos como pasivos (37). Uno de estos mecanismos es el denominado olvido por interferencia, por el cual la consolidación y/o recuperación de un trazo de memoria se puede ver obstaculizada por la presencia de trazos de memoria similares presentados cercanos en el tiempo de adquisición (38).

Este fenómeno de competencia entre memorias se reduce gracias a mecanismos computacionales como la SP, que permiten almacenar trazos de memoria detallados pero diferenciados unos de otros. Sin embargo memorias altamente similares pueden afectar a la eficacia de este proceso, creándose representaciones que se solapan e interfieren en la discriminación durante la recuperación (39).

1.2. Estudio de las funciones mnemónicas

➤ *Modelos animales*

Las primeras evidencias de que el GD y CA3 controlan la SP y la CP en el hipocampo provienen de estudios en ratones en los que la inactivación funcional o la lesión de las fibras musgosas, que comunican el GD con CA3, impiden la formación de nuevas memorias espaciales, pero no interfieren en la recuperación de memorias pasadas. De la misma forma al lesionar en ratas las fibras de la vía perforante que llegan a CA3 se mantiene la formación de nuevas memorias pero se impide su recuperación (40,41).

Estudios de electrofisiología en rata han podido demostrar la existencia de diferentes patrones de disparo en CA3 ante cambios en el ambiente. Cambios en el ambiente apenas perceptibles se asociaron con patrones de disparo de las piramidales de CA3 muy similares (CP). En cambio, cambios ambientales notorios se relacionaron con patrones de disparo muy distintos entre sí (SP). El cambio de un patrón de disparo a otro se producía de forma súbita a partir de un nivel de diferencia entre los estímulos (24,41).

El estudio de los mecanismos que posibilitan la SP en subestructuras hipocampales se puede abordar mediante la estimulación del hipocampo en rodajas con trenes de estímulos eléctricos que son similares entre sí, pero con ligeras diferencias. Al registrar células granulares del GD, se ha observado una correlación menor entre los trenes eléctricos de salida que la que tenían los trenes de entrada entre sí. Es decir, a nivel de células granulares individuales existe un procesamiento de señales de entrada similares, convirtiéndolas en patrones neurales de salida más diferenciados entre sí. Además, al realizar este experimento registrando células piramidales de CA3 se ha observado que, en respuesta a un input complejo desde el GD, el output de las células de CA3 son trenes de impulsos incluso menos correlacionados entre sí que los de entrada. Esto confirma además la teoría de que CA3 también participa en la SP, amplificando la realizada por el GD. Por tanto, la función de SP que llevan a cabo el GD y CA3 se puede observar incluso a nivel del procesamiento en neuronas individuales (42,43).

➤ *Estudios en humanos*

En los últimos años ha aumentado significativamente el número de investigaciones que han logrado determinar los mecanismos y estructuras involucradas en la SP en humanos (19). Esto se ha debido en gran parte a la utilización de técnicas de imagen funcional, así como al refinamiento y unificación de los paradigmas de discriminación utilizados. El más reciente es la Prueba de Similitud Mnemónica (*Mnemonic Similarity Task, MST*), diseñada para determinar el impacto comportamental de las disfunciones hipocampales, siendo especialmente sensible a la SP (44).

El aspecto fundamental de esta prueba es la presentación de elementos (imágenes de objetos, espacios, palabras, etc.) que el participante ya ha visto previamente, elementos nuevos que no ha visto y elementos muy similares a los ya vistos (*'distractores'*). Los distractores son esenciales y se presentan con varios niveles de similitud (baja, media y alta) para crear más o menos interferencias en la discriminación. A medida que la similitud aumenta, disminuye la capacidad de discriminación (45) (*ver materiales y métodos*). Para poder discriminar correctamente entre distractores y demás elementos similares se requiere de la creación de representaciones de memoria diferenciadas para cada elemento, evitando las interferencias, lo cual implica un correcto funcionamiento de la SP (45). La tarea MST permite conocer no solo el estado de la función de la SP en los sujetos (en la condición en la que se presentan los distractores muy similares), sino también el estado de la memoria de reconocimiento general (en la condición en la que se presentan imágenes nuevas de distinta categoría) (46).

También se ha utilizado el MST combinado con resonancia magnética (RM) en humanos sanos, como por ejemplo con la imagen de contraste basada en los niveles de oxígeno en sangre (*BOLD-contrast fMRI*, un indicador indirecto de actividad cerebral). Esto ha permitido demostrar que la señal de respuesta de GD/CA3 frente a los distractores es muy parecida a la señal en respuesta a imágenes nuevas, diferenciándose de la que se registra al presentar imágenes ya vistas. Por ello se confirma que GD y CA3 están implicadas en la SP, ya que se identifican los distractores correctamente como imágenes nuevas. Esta respuesta se observa incluso con variaciones muy pequeñas entre las imágenes (32).

El estudio de fMRI de Bakker y colaboradores cuenta con limitaciones anatómicas, por ejemplo, la identificación conjunta de GD y CA3 como GD/CA3 (32). Este es un problema persistente en la gran mayoría de los estudios de fMRI, debido a la proximidad entre las dos estructuras y su pequeño tamaño (17,47). Un estudio reciente sí ha logrado parcelar el GD y CA3 funcionalmente y demostrar que el GD es la región que se activa específicamente en tareas que demandan

distinguir entre estímulos muy similares. Sin embargo esto se hizo con un sistema de resonancia magnética de 7 teslas, al alcance de pocos grupos de investigación (48). En este sentido los estudios de RM estructural suponen una ventaja, ya que con secuencias de resonancia en escáneres de 3 teslas y refinamiento de las técnicas de análisis de imagen se ha logrado reducir esta limitación (17,49). Actualmente el análisis de las volumetrías de los subsegmentos hipocampales ha sido muy refinado (50) y permite estudiar la relación entre pérdida de volumen y efectos mnemónicos.

Además de los estudios funcionales y volumétricos, otra medida muy útil para determinar la integridad de una estructura cerebral es el análisis de la difusión de agua en el tejido (*diffusion weighted image* o DWI). La DWI se basa en medir *in vivo* el movimiento de las moléculas de agua en los tejidos para reconstruir de manera indirecta su estructura y determinar su integridad (51). La DWI es especialmente relevante porque se pueden detectar cambios en el tejido incluso antes de que la atrofia o la degradación neuronal sean detectables a nivel macroscópico con las técnicas de RM estructural (52). Esto se debe a que identifica alteraciones patológicas microestructurales, mientras que los cambios volumétricos solo se aprecian cuando hay una disminución significativa en los grandes componentes del tejido (51). Con la DWI se obtienen parámetros como la difusión media de agua en el tejido (DM) o la fracción de anisotropía (FA). Reducciones en la FA, indicador de la difusión en los tractos de sustancia blanca (SB), podrían implicar daños en los tractos de SB que cruzan el espacio estudiado, como desmielinización o disminución de la densidad de las fibras; y aumentos en la DM podrían implicar la presencia de muerte celular, degeneración axonal o gliosis (53). Para evitar errores en la interpretación de los datos de difusión macroscópica, es preciso recurrir a métodos que nos permitan estudiar la difusión a nivel microscópico y tengan en cuenta que en una misma región cerebral puede haber distintos tipos de tejido al mismo tiempo (54,55) (*ver materiales y métodos*).

En resumen, ha sido necesario aplicar la metodología que combina las pruebas de discriminación mnemónica del tipo MST, dirigidos en particular a la SP, junto con técnicas de RM volumétrica o DWI en los mismos sujetos para poder determinar con mayor exactitud qué estructuras están involucradas en la SP en humanos (20). Por otro lado, la SP y la CP son dos procesos que se necesitan el uno al otro, y han de ser complementarios y realizarse correctamente para el buen funcionamiento del hipocampo. Esto se pone en evidencia en aquellos procesos naturales y enfermedades en los que se ve afectada la integridad de alguna de estas subestructuras hipocampales.

1.3. Alteraciones de las funciones mnemónicas

El estudio de las funciones mnemónicas, y en especial de la SP, se ha llevado a cabo mediante el análisis de procesos tanto fisiológicos como patológicos en los que se altera la integridad de estructuras concretas del LTM. En primer lugar destaca el envejecimiento (27), en el cual se han descrito los mecanismos que se alteran y conducen a una pérdida fisiológica y progresiva de la SP. Por otro lado, las tres enfermedades en las que se han descrito de manera más exhaustiva los fallos en la SP son el deterioro cognitivo leve (20), la encefalitis LGl1 (46) y la epilepsia temporal medial (56).

➤ *El envejecimiento*

Durante el envejecimiento neurocognitivo en ratas, se produce una disminución fisiológica de la actividad eléctrica del GD y sus aferencias, en concreto de la vía perforante (57,58). En cuanto a comportamiento, tanto en animales como en humanos (59,60) se observan déficits en la discriminación de objetos, lugares o eventos muy similares y fallos en la formación de nuevas memorias sin que se vea afectada la memoria ya almacenada, excepto en caso de presencia de patologías (19).

Sorprendentemente, numerosos estudios de fMRI han descrito una hiperactividad funcional en el área GD/CA3 no consistente con los resultados de resonancia estructural y comportamiento (*revisado en* (19)). Una posible explicación se basa en que durante el envejecimiento se observa una degeneración de la vía perforante que hace que disminuya el input excitatorio sobre GD y CA3 (57). Debido a esta desconexión parcial del hipocampo, la poca información que llega al GD no es suficiente para que este lleve a cabo su función de SP y de enviar a CA3 patrones debidamente separados. Las fibras recurrentes de CA3, sin embargo, no se degeneran en el envejecimiento. De esta forma, al recibir un input parcial degradado desde la CE, sí que es capaz de activar su potente red interna de colaterales recurrentes y a llevar a cabo la CP (27).

Por otro lado, durante el envejecimiento también se da una pérdida de la modulación inhibitoria intrínseca del circuito. En concreto se afecta la inhibición hacia delante (*feedforward*) desde la CEL y la inhibición hacia atrás (*feedback*) de las interneuronas del hilio (57). Esta desinhibición afecta tanto al GD como a CA3 y sus colaterales. En el GD, la pérdida del componente tanto excitatorio como inhibitorio hace que se desaparezca el equilibrio necesario para su correcto funcionamiento (47,57). En CA3 la desinhibición de las fibras recurrentes no afectadas refuerza aún más su excitabilidad y su funcionamiento. Esta hiperfunción de CA3 es la que se observa de

El envejecimiento natural también tiene efectos sobre la difusión en las diferentes subregiones hipocampales. En concreto, la edad correlaciona con aumentos significativos de la DM en las principales subregiones hipocampales (62,64). Al analizar los resultados de la SP frente a los cambios microestructurales en el hipocampo con la edad, se encontró una correlación negativa entre la FA de la región GD/CA3 y los déficits funcionales en la SP. Una menor FA podría indicar la reducción de la integridad de las dendritas piramidales, lo cual podría contribuir a la disfunción de la actividad de GD/CA3 (65). En este caso, se pierde la SP y se refuerza la vía de la CP de CA3 (6).

➤ *Deterioro cognitivo leve amnésico*

El deterioro cognitivo leve amnésico (DCLa) es una entidad diagnóstica que suele considerarse una fase preclínica o transicional de la enfermedad de Alzheimer (EA). Uno de los síntomas principales del DCLa son los déficits mnemónicos. Estos déficits son mayores que los que se esperan debido a la edad y a la educación en su grupo poblacional, pero sin llegar a considerarse demencia (66,67).

Los pacientes de DCLa tienden a ser muy vulnerables a las interferencias y al falso reconocimiento, y tienen problemas para recordar eventos en un contexto determinado (67,68). En las tareas de tipo MST pueden diferenciar igual de bien que los controles los ejemplares nuevos, viejos y repetidos pero identifican el 63% de los distractores como viejos, apuntando a fallos en la SP (20). Es por esto que la mayoría de los estudios de déficits en la SP se han llevado a cabo en pacientes con DCLa.

En varios estudios de fMRI se ha demostrado que estos pacientes presentan de nuevo el patrón característico de hiperactividad localizada específicamente en la región GD/CA3 y una hipofunción de la corteza entorrinal (20). El DCLa produce una desconexión parcial del hipocampo similar a la observada en el envejecimiento (69). Además, la actividad anormalmente elevada no solo es un signo de un mal funcionamiento hipocampal, sino que contribuye a aumentar los fallos de la memoria. Una prueba de ello es que la reducción de esta hiperactividad mediante el uso de medicamentos antiepilépticos consigue una mejora significativa de la memoria en pacientes con DCLa (70).

Estudios de RM estructural han demostrado una clara disminución volumétrica hipocampal (20), específicamente, en toda la zona del *cornu ammonis* (CA1-CA3) y en el GD en pacientes de DCLa en comparación con controles. Esto no sucede en otras variaciones del DCL que no afectan tanto a la memoria (71,72). Reducciones mayores en el GD correlacionan con déficits mnemónicos

mayores en la SP en estos pacientes (17), lo cual supone una evidencia más del papel del GD en la SP (20).

➤ *Encefalitis LGI1*

Una alteración similar de la memoria puede observarse en pacientes con encefalitis LGI1. Este es un tipo de encefalitis autoinmune en la cual los pacientes desarrollan anticuerpos contra la proteína LGI1. El gen LGI1 tiene una expresión preferencial en el GD y CA3, por lo que esta enfermedad cursa con déficits mnemónicos y crisis epilépticas asociadas al área hipocampal (73). Debido a que las áreas afectadas son muy específicas, constituye un modelo muy bueno para el estudio de la relación entre atrofia de las subregiones hipocampales y los déficits en las funciones mnemónicas (46).

Estos pacientes presentan atrofia hipocampal bilateral, con reducciones volumétricas significativas fundamentalmente en las regiones del GD y CA3. A nivel de la integridad microestructural, se observa un aumento bilateral de la DM en el hipocampo, sin que se vea afectada de manera significativa la FA. Tanto los datos volumétricos como los microestructurales correlacionan en estos sujetos con déficits de la memoria episódica (73).

Entre los déficits observados destaca una reducción en la SP, analizada con una tarea MST clásica. Mediante regresiones lineales se determinó que el volumen del GD era el mejor predictor de los fallos en la SP, mientras que el volumen de CA1 era el mejor predictor de los fallos en la memoria de reconocimiento general. Estos resultados corroboran una vez más la especialización de las diferentes subregiones en los procesos de memoria que lleva a cabo el hipocampo (34,46).

➤ *Epilepsia temporal medial con esclerosis del hipocampo*

La epilepsia temporal medial (ETM) es la forma más común y definida de epilepsia farmacorresistente con crisis focales en adultos (74). Suele debutar entre los 4 y los 16 años y se caracteriza por crisis epilépticas que se originan en el lóbulo temporal (75). Numerosos estudios han concluido que algunos pacientes de ETM presentan una atrofia progresiva de las estructuras del LTM (76). Esta atrofia se conoce como esclerosis del hipocampo (EH), más correctamente esclerosis temporal medial, ya que también afecta a otras estructuras conectadas anatómicamente y funcionalmente con el hipocampo: cortezas entorrinal y perirrinal, amígdala, ínsula, tálamo, corteza cingular, cerebelo, etc. Cuanto más próxima está la estructura al hipocampo, mayor es la atrofia que presenta (76,77).

La afectación cognitiva más frecuente que reportan los pacientes con ETM-EH son los déficits mnemónicos. En concreto, presentan fallos en la consolidación y recuperación de nuevas memorias con detalles específicos (75).

Utilizando un modelo animal de ETM adquirida por kainato (78), se observó que los ratones presentaban déficits en la SP a nivel tanto comportamental como neuronal. Es decir, al registrar células granulares del GD después de estimular el hipocampo en rodajas se observó que la correlación de los trenes eléctricos de salida era mayor que la que tenían los de entrada con respecto a los controles. La SP estaba disminuida en estos animales en mayor medida cuanto más similares eran los estímulos entre sí (43).

Además, relacionaron estos déficits con una subpoblación de células granulares del GD que disparaba de manera patológica en forma de ráfagas. Esta actividad anormal sobreexcita CA3 y con ello al circuito de colaterales recurrentes, un potencial generador de actividad epileptiforme. La relación entre la actividad epileptogénica anormal y los déficits en SP no es causal porque los déficits mnemónicos pueden ocurrir incluso antes de que aparezcan espigas interictales propias de epilepsia en el EEG y viceversa, e incluso aparecer uno en ausencia del otro. Sin embargo, estos hallazgos sí demuestran la relación entre la subpoblación celular del GD deficiente y los fallos computacionales que derivan en la aparición de déficits en la discriminación mnemónica incluso en estadios tempranos de la enfermedad (43).

Pocos estudios han identificado hasta ahora los déficits mnemónicos de los pacientes de ETM-EH como déficits específicos en la SP, si bien tienen más fallos que su grupo control en la identificación de los distractores como elementos nuevos en las pruebas de tipo MST. Esto ocurre especialmente al introducir altos niveles de interferencia ya sea en cuanto a grados de similitud entre los distractores y las situaciones iniciales (56) o variando el número de ejemplares presentados de cada categoría (79). Sin embargo, sus resultados no difieren de los de los controles al discriminar entre elementos menos similares entre sí, así como en otras pruebas de memoria (79).

El grado de afectación de la memoria correlaciona con el grado de atrofia hipocampal general en pacientes con ETM-EH (56). Igualmente, el tipo de ETM-EH (según la clasificación de la ILAE, 82) también puede influir en la afectación de la memoria. En los pacientes con ETM-EH de tipo II, en la cual solo CA1 está afectada, no se ve condicionada la memoria de tipo declarativa. En los pacientes con ETM-EH de tipo I y III también aparece pérdida neuronal en el GD y en menor medida en CA3, lo cual contribuye a una pérdida más severa de la función mnemónica, que prácticamente desaparece si la pérdida de células granulares es de más del 60% (81).

La RM estructural es una prueba fundamental en el diagnóstico *in vivo* y la prevención de daños post cirugía de resección del foco epiléptico en este tipo de epilepsia. Con esta técnica se han logrado hallazgos muy relevantes para la caracterización de la enfermedad, como la atrofia hipocampal general (75,77). Esta atrofia suele aparecer de forma unilateral e ipsilateral a la localización del foco epiléptico caracterizado a través de EEG, y de forma más rara aparece bilateralmente.

Con la evolución de las técnicas de análisis se ha podido concretar qué subregiones hipocampales se ven afectadas. En general, se observan reducciones volumétricas en todas las subregiones hipocampales ipsilaterales al foco epileptogénico, sin verse afectadas de manera significativa las subestructuras de lado contralateral (82). En comparación tanto con controles como con pacientes con ETM sin EH, los pacientes con ETM-EH presentan menor volumen en las regiones de CA1 y GD-CA4 los pacientes con ETM-EH presentan menor volumen en las regiones de CA1 y GD-CA4 (83,84). Esto concuerda con los datos de las clasificaciones histopatológicas, dado que la ETM-EH de tipo I (en la cual hay pérdida neuronal severa en CA1 y GD-CA4) es la más frecuente (80).

Recientemente se ha asociado el grado de reducción volumétrica hipocampal que presentan los pacientes de ETM-EH, detectada con RM, con su capacidad para realizar la SP espacial cuando la similitud entre los elementos es alta. Cabe destacar que estos resultados se limitaban a aquellos pacientes con ETM-EH en el hemisferio izquierdo, lo cual sugiere diferencias entre estos y los que presentan afectación unilateral derecha. Sin embargo no hay evidencias de si esta distinción entre ambos grupos de pacientes se debe a un desarrollo diferencial de la enfermedad o al tipo de prueba utilizada (56).

La afectación hipocampal también se observa en los estudios de difusión. En concreto varios estudios han descrito un aumento general de la DM en la región del foco epileptogénico y otras zonas adyacentes, así como una reducción bilateral de la FA. Los valores de difusión alterados aparecen incluso en pacientes con ETM-EH cuyo volumen del hipocampo no está reducido (53,85). Esto sugiere que los cambios en la difusión podrían tener que ver con cambios microestructurales más que con pérdida neuronal macroscópica (86).

Hasta la actualidad no ha sido estudiada la relación entre las alteraciones de la difusión en la región hipocampal y la capacidad para realizar la SP en pacientes con ETM-EH. Además, la asociación entre la SP y las reducciones volumétricas solo se han realizado a nivel del hipocampo total, y no de las diferentes subregiones. Por tanto, no se conoce si existe una correlación entre

los cambios de la difusión y volumen en cada subregión hipocampal y los déficits de los pacientes con ETM-EH en la realización de la SP al almacenar nuevas memorias.

2. Hipótesis y objetivos

La ETM-EH es una enfermedad que presenta alteraciones mnemónicas muy características. Evidencias recientes apuntan a que estos déficits podrían estar relacionados con la capacidad de los pacientes de llevar a cabo la SP, que permite el correcto almacenamiento de nuevas memorias sin que éstas se solapen entre sí. Estudios con técnicas de neuroimagen indican que regiones concretas dentro del complejo hipocampal son las responsables de la SP. Nuestra hipótesis es que las dificultades de memoria de los pacientes de ETM-EH unilateral se deben a un mal funcionamiento de la SP y que, al igual que ocurre en otras patologías, existe una relación entre los cambios estructurales que se producen en las principales subregiones hipocampales y las alteraciones mnemónicas observadas.

Por ello, el objetivo de este trabajo de fin de máster es caracterizar la función mnemónica en pacientes con ETM-EH unilateral y determinar su relación con las alteraciones estructurales de las subregiones hipocampales CA1, CA3 y GD.

Para la consecución de este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Puesta a punto de un protocolo bioinformático de análisis de las imágenes de RM estructural a nivel de las subregiones hipocampales en pacientes con ETM-EH unilateral.
2. Caracterización de las alteraciones mnemónicas que presentan los pacientes de ETM-EH utilizando una prueba cognitiva de discriminación mnemónica adaptada de tipo MST.
3. Caracterización de los cambios a nivel volumétrico y de la microestructura de las subregiones hipocampales CA1, CA3 y GD.
4. Determinación de la relación entre los cambios estructurales de CA1, CA3 y GD y las alteraciones observadas en los diferentes procesos mnemónicos.

3. Materiales y métodos

3.1. Sujetos de estudio

Este trabajo de fin de máster supone un análisis preliminar de los primeros pacientes reclutados para el proyecto “Estudio de la función amnésica en pacientes con epilepsia temporal farmacorresistente por esclerosis del hipocampo” con la financiación de una beca de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno. Los pacientes que participan en este estudio provienen de una muestra mayor cuyo rendimiento cognitivo y mnemónico ha sido previamente caracterizado por nuestro grupo en un trabajo ya publicado (79,87).

Para la selección de la muestra se emplearon los siguientes criterios de inclusión:

- Presentar un diagnóstico previo de epilepsia temporal asociada a EH predominantemente unilateral. El diagnóstico lo llevó a cabo su médico de referencia en base a criterios radiológicos y a la localización del foco epiléptico con EEG.
- Edad comprendida entre los 20 y los 60 años
- Haber firmado un consentimiento informado para el estudio neuropsicológico y la RM cerebral

En este estudio participaron once pacientes (seis hombres y cinco mujeres) con ETM-EH reclutados en las unidades de epilepsia de los hospitales Ramón y Cajal, Ruber Internacional y Clínico San Carlos de Madrid, España (*Anexo 8.1*). De estos pacientes, cuatro presentaban esclerosis lateralizada en el hemisferio derecho y siete lateralizada en el hemisferio izquierdo. Al presentar todos nuestros sujetos esclerosis predominantemente unilateral se utilizó como control el hipocampo contralateral de cada uno, comparando a cada sujeto consigo mismo.

3.2. Pruebas neuropsicológicas

En primer lugar, se realizaron varias pruebas a los sujetos para determinar su funcionamiento cognitivo general. Estas pruebas incluían tareas de fluidez semántica y fonológica, de denominación y discriminación visual de objetos y de rendimiento mnemónico general (recuerdo verbal selectivo, recuerdo libre y recuerdo por elección múltiple). No se descartó a ningún sujeto tras realizar estas pruebas (*Anexo 8.2*).

3.3. Pruebas conductuales

Para determinar la función mnemónica específica de separación de patrones se administró una tarea de discriminación mnemónica visual adaptada a partir del *Mnemonic Similarity Task* (MST) (79).

El MST tiene su origen en unas pruebas desarrolladas en 1998 para estudiar las implicaciones comportamentales de la SP en modelos animales (88). Desde entonces ha sido adaptada en diversos estudios para estudiar la SP espacial, de reconocimiento de objetos, de caras, palabras o estímulos emocionales. Constituye una tarea muy sensible a esta función mnemónica (SP) y por tanto muy útil para estudiar la codificación y discriminación en adultos sanos, así como el impacto comportamental de todas aquellas alteraciones que afecten a la función del hipocampo (*revisado en (45)*).

Un aspecto muy importante en el MST es la manipulación de los parámetros para generar interferencias que permitan poner a prueba la SP específicamente (79). En nuestro caso la interferencia se introduce de dos maneras: aumentando la similitud entre los distractores y las imágenes ya vistas en diferentes niveles (*revisado en 26*) y variando el número de ejemplares de cada categoría que aparecen en la presentación inicial de las imágenes, dado que a medida que aumenta el número de trazos de memoria similares aumenta también el riesgo de olvidar los detalles de los mismos, y nuestro rendimiento mnemónico es peor (89). Además aumenta la demanda sobre el hipocampo en su función de SP, ya que ahora tiene que diferenciar detalles pequeños entre más de dos señales de entrada distintas (87).

➤ *Descripción de la tarea*

En primer lugar, se le presentan a los participantes 689 imágenes a color de objetos comunes de varias categorías (ejemplos de categorías: frutas, instrumentos, prendas de vestir, tipos de cámaras, etc.). Cada imagen se presenta de forma aislada sobre un fondo blanco durante 2000ms, con un intervalo variable entre estímulos de 300-500 ms. El participante puede elegir descansar unos segundos en cualquier momento. Como novedad respecto a otros estudios, se varía el número de ejemplares que se presentan en cada categoría entre 1, 4 y 8 imágenes. Así se introduce la segunda forma de interferencia mnemónica, como ya hemos mencionado (87). Dentro de esta primera presentación de imágenes se le pide al participante que presione la barra espaciadora si aparece algún objeto idéntico a otro de la lista (si ven alguna imagen ya repetida).

Transcurridos 30 minutos se le somete a una prueba de reconocimiento forzado. En esta prueba aparecen en pantalla dos imágenes sobre fondo blanco, una de la lista presentada anteriormente ('vieja') y otra adicional. Esta segunda imagen puede ser un ejemplar de distinta categoría ('nueva') o un ejemplar muy similar de la misma categoría ('distractor'). Las imágenes aparecen durante 1000 ms cada una con un intervalo de 300-550ms entre ellas.

Finalmente, tras la presentación de la pareja de imágenes, aparece una cruz roja en la pantalla durante 2500ms y se indica al participante que presione la tecla "1" si es la primera imagen la que ha visto antes, y "2" si es la segunda. Si se han presentado varias imágenes de la misma categoría en la fase inicial, en la fase de reconocimiento solo se utiliza para estudiar la discriminación mnemónica la primera imagen que haya aparecido. (*Figura 5*)

Para el análisis de esta tarea se obtienen por cada individuo porcentajes de aciertos en las dos condiciones de la fase de reconocimiento: por un lado, los ensayos en los que se presenta un elemento ya mostrado frente a uno muy diferente (variable O_N, de *old vs. new*); y por otro los ensayos en los que aparece un elemento ya mostrado frente a un distractor (variable O_S, de *old vs. similar*). Además, para cada condición hay tres niveles (1, 4 y 8), dependiendo de si el objeto ya mostrado había aparecido en la fase inicial con otros de su misma categoría. Es decir, cada sujeto tiene seis porcentajes de acierto: O_N con 1, 4 y 8 niveles de interferencia y O_S con 1, 4 y 8 niveles de interferencia.

La variable O_N supondría una medición de la memoria de reconocimiento general, mientras que la variable O_S serviría para monitorizar el buen funcionamiento de la discriminación mnemónica entre elementos muy similares, por lo que lo usamos como medida de la SP (34).

A) Fase de estudio



B) Fase de reconocimiento

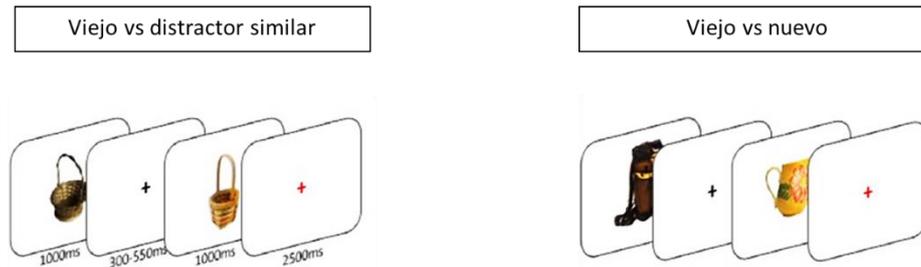


Figura 5. Esquema de la **tarea de discriminación mnemónica** adaptada utilizada. En la fase inicial (A) se presentan 689 imágenes de varias categorías con una duración de 2000ms y 300-550ms de fijación entre imágenes. Para cada categoría de imágenes se presentan 1, 4 u 8 ejemplares. Treinta minutos después, se realiza una prueba de reconocimiento forzado (B). En esta se presentan dos imágenes durante 1000ms cada una, seguidas de una cruz roja durante 2500ms, durante los cuales el participante debe indicar cuál de las dos imágenes ha visto durante la primera fase. Cada ejemplar puede aparecer con otro muy similar de la misma categoría (condición viejo vs distractor) o con otro ejemplar de una categoría distinta (condición viejo vs nuevo). Adaptado de Poch et al. 2020 (79)

3.4. Adquisición de las imágenes

➤ Introducción a la resonancia magnética

Como simplificación, la técnica de RM se basa en la aplicación de un campo magnético externo constante que permite alinear los protones de los núcleos de las moléculas de agua del tejido. Este estado se conoce como coherencia de fase. Al utilizar un pulso de radiofrecuencia, los protones se desalinean; cuando el pulso finaliza los protones tienden a volver a la coherencia de fase, emitiendo una energía proporcional al pulso de radiofrecuencia que habían recibido. El tiempo que demoran estos protones en recuperar la coherencia de fase se traduce en diferentes contrastes dentro de la imagen debido a que cada tejido posee un tiempo específico para que ocurra este fenómeno de reenfoque.

En el estudio por RM del cerebro se miden las propiedades T1 (tiempo que tardan los protones en realinearse con el campo magnético externo) y T2 (tiempo que tardan los protones en perder

la coherencia de fase unos respecto a otros tras el pulso de radiofrecuencia). Al variar el tiempo de repetición entre pulsos de energía (*TR*) y el tiempo entre pulso y medida de respuesta (*TE*) se obtienen dos tipos de imágenes. Las imágenes ponderadas en T1 (*T1w*, del inglés *T1-weighted*) presentan *TR* y *TE* cortos y el líquido cefalorraquídeo (LCR) de color oscuro. Por otra parte, con las imágenes ponderadas en T2 (*T2w*, *T2-weighted*) el LCR aparece brillante y los *TR* y *TE* son más largos. Por tanto, en las imágenes obtenidas con RM el contraste y el brillo dependerán de las propiedades T1 y T2 de cada tipo de tejido (90) (Figura 6).

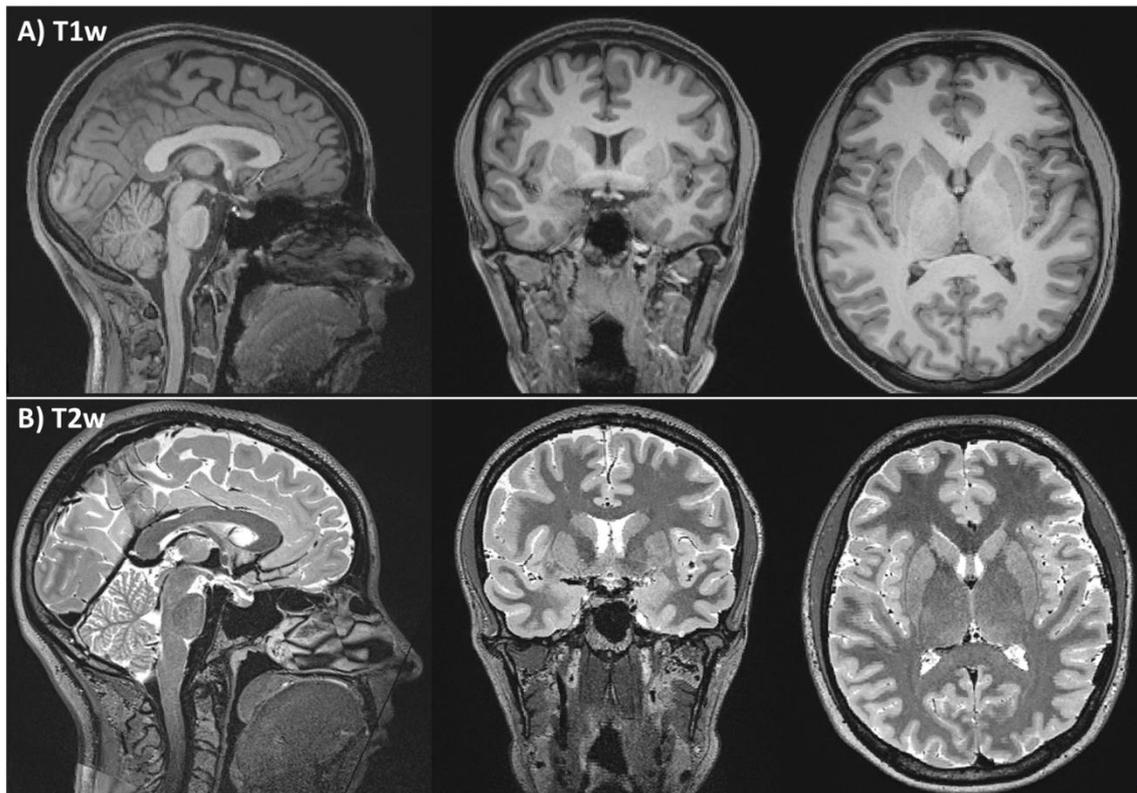


Figura 6. Imagen de **resonancia magnética estructural ponderada** en T1 (A) y T2 (B) de una paciente con epilepsia temporal medial con esclerosis hipocampal. De cada imagen aparece de manera consecutiva una vista sagital, coronal y axial.

Por otro lado, a través de las imágenes ponderadas en difusión (DWI), las cuales ofrecen información acerca del proceso de difusión de las moléculas de agua dentro de los tejidos, se puede obtener indirectamente una descripción de la estructura de los tejidos subyacentes que modulan el movimiento de dichas moléculas (91).

Estas imágenes se obtienen aplicando dos pulsos de gradiente de campo magnético a lo largo de direcciones espacialmente opuestas y con un intervalo de tiempo, llamado tiempo de difusión, entre ellos. El primer pulso induce un cambio de fase en los protones; el segundo, de 180°, revierte el cambio de fase inducido por el primero. Los protones que se encuentren en la

misma posición volverán a su estado inicial y su cambio de fase neto será cero. Sin embargo, aquellos que se hayan desplazado durante los dos pulsos sí presentan un desfase en las frecuencias de rotación de los espines que se verá reflejado en una atenuación de la señal en la imagen resultante. Cuanto mayor sea el espacio recorrido, mayor el desplazamiento de fase y por tanto menor la intensidad de la señal. La DWI que se obtiene está directamente relacionada con la dirección bajo la cual se aplicaron los pulsos de gradiente de campo magnético. Si este proceso se repite a lo largo de diferentes direcciones espaciales se puede obtener una representación tridimensional de como difunde el agua en cada uno de los puntos de cada tejido (92).

Existen varios parámetros que se calculan a partir de las DWIs que ayudan a caracterizar la difusión y por tanto la organización estructural que modula dicha difusión. Por un lado, se puede obtener la difusión media (DM, en $\mu\text{m}^2/\text{ms}$), que es la media de las difusiones de las moléculas de agua en la dirección de tres vectores perpendiculares entre sí. Esta medida es mayor cuantas menos restricciones al paso del agua haya en ese tejido. Así, los tejidos donde hay mayor difusión (LCR) aparecen más oscuros y en el parénquima, donde la difusión es más restringida, la imagen aparece más clara. De la misma manera, es mayor en tejidos dañados porque al no haber restricción de las membranas celulares aumenta la difusión libre (90,93).

Por otro lado, podemos obtener la fracción de anisotropía (FA) de ese tejido. En ausencia de restricciones las moléculas de agua tienden a moverse de manera aleatoria y en todas direcciones, de manera isotrópica. Sin embargo, en los tractos de SB el agua difunde mayormente en el sentido paralelo a los fascículos debido a las restricciones que imponen las membranas celulares de los axones. Cuando la difusión no ocurre de manera homogénea en el espacio tridimensional y existen direcciones que facilitan más que otras este proceso difusión se puede decir que existe una difusión anisotrópica (90). La FA cuantifica cómo de anisotrópica es la difusión, lo cual va a depender no solo del tamaño y densidad de los axones sino también de la orientación predominante de las fibras de cada vóxel. Es un valor escalar entre 0 y 1, siendo 0 difusión completamente isotrópica (no hay restricciones) y 1 completamente anisotrópica (axones muy alineados con una dirección de difusión preferente sobre el resto) (93).

Sin embargo, con solamente los valores de FA macroscópica no es posible interpretar completamente como se encuentra organizado el tejido subyacente (55). Una FA reducida puede significar pérdida de densidad e integridad axonal, pero también puede estar indicando simplemente que existe un cruce de fibras. En este último caso las fibras están orientadas en muchas direcciones y la difusión total tiende a ser más isotrópica. Viceversa, una FA alta puede

ser el resultado de un aumento de la densidad axonal, pero también puede indicar que las fibras que cruzan han degenerado y las que quedan dan un dato más anisotrópico por tener orientaciones parecidas. Por esto es importante determinar la FA a escala microscópica, que al no estar condicionada por la orientación de los haces de fibras, permite sacar conclusiones sobre la integridad de las fibras de SB (54).

En la última década se han desarrollado métodos para la caracterización de la microestructura de los tejidos que, a través de modelos matemáticos, intentan inferir las organizaciones estructurales reflejadas en las señales de difusión obtenidas a través de las DWIs. La mayoría de estas metodologías se basan en modelos multicompartmentales. En ellos se asume que la señal de difusión en un vóxel viene dada por la suma de señales de difusión provenientes de distintos compartimentos dentro dicho vóxel, cada uno con sus propias características microestructurales (94). Uno de los métodos de microestructura más empleados en la literatura emplea el modelo desarrollado por Kaden et. al (55). Este método se llama *Spherical Mean Technique* (SMT) y puede ser libremente descargado desde <https://github.com/ekaden/smt>. Con el método SMT la señal de difusión de cada vóxel no depende de la orientación de las neuritas en el mismo, sino que es función únicamente del proceso de difusión microscópica. Además, la técnica tiene en cuenta que a escala microscópica en cada vóxel hay varios tipos de tejido y realiza la distinción entre difusión en el compartimento intra-neurita (INTRA, las dendritas y axones, mielinizados o no) y en el extra-neurita (EXTRA, los cuerpos neuronales, células gliales y espacio extracelular).

➤ *Parámetros de adquisición para la muestra empleada*

Las imágenes de RM estructural de alta resolución se adquirieron en un escáner de resonancia magnética marca Siemens Prisma (3 teslas de intensidad de campo magnético) ubicado en el Hospital Ruber Internacional.

Para cada uno de los sujetos se adquirió una imagen ponderada en T1, una imagen ponderada en T2 y una secuencia de DWIs. Las T1w fueron adquiridas en un plano sagital utilizando una secuencia *MPRAGE* (*Magnetization-Prepared Rapid Acquisition Gradient Echo*) con tiempo de eco (TE) = 2.15 ms, tiempo de repetición (TR) = 2400 ms, tiempo de inversión (IT) = 1000 ms, ángulo de inclinación (AI) = 8° , volumen de interés (FOV) = $176 \times 240 \times 256 \text{ mm}^3$ y tamaño del vóxel = $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$. Las imágenes ponderadas en T2 fueron adquiridas también en 3D con $TE = 564 \text{ ms}$, $TR = 3200 \text{ ms}$, $AI = 120^\circ$, ancho de banda = 750 Hz, factor turbo = 314, $FOV = 176 \times 240 \times 256 \text{ mm}^3$, tamaño del vóxel = $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$.

Por su parte, las imágenes ponderadas en difusión fueron adquiridas empleando una secuencia EPI (*del inglés Echo Planar Imaging*) con excitación multibanda, TE = 67 ms, TR = 3200 ms, AI = 90° BW= 1488 Hz, factor multibanda = 2, FOV= 230 × 230 × 100 mm³, tamaño del vóxel = 1.8 × 1.8 × 1.8 mm³ y valores de b = 0, 700, 1000 y 2500 s/mm². Se adquirieron 11 imágenes sin ponderación en difusión (b = 0 s/mm²) y 179 ponderadas en difusión a lo largo de direcciones de gradientes distribuidas sobre una esfera de radio unitario (18, 58 y 103 imágenes para b = 700, 1000 y 2500 s/mm², respectivamente).

3.5. Post-procesamiento de imágenes

➤ *Procesamiento de las imágenes T1w y T2w: Extracción del cerebro*

El análisis de las imágenes cerebrales ponderadas en T1 y T2 obtenidas se realizó en varios pasos:

En primer lugar, se llevó a cabo la segmentación del cerebro en la imagen T1w. Para esto se empleó el método de segmentación de tejidos desarrollado por Ashburner et. al (95) que se encuentra implementado dentro del paquete de procesamiento de imágenes SPM8 (*Statistical Parametric Mapping v8*, <https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>). Al aplicar esta metodología se obtienen, a partir de la imagen T1w (*Figura 7A*), imágenes probabilísticas de los tejidos de SG (*Figura 7C*) o de SB (*Figura 7D*). Los valores de intensidad en estas imágenes representan la probabilidad de cada vóxel de pertenecer a uno u otro tejido basándose en la intensidad que posee el mismo dentro de la imagen T1w. Estas imágenes probabilísticas son empleadas posteriormente por el paquete de procesamiento VBM8 (Voxel Based Morphometry) para extraer la región perteneciente al cerebro del resto de la imagen T1w (*Figura 7B*).

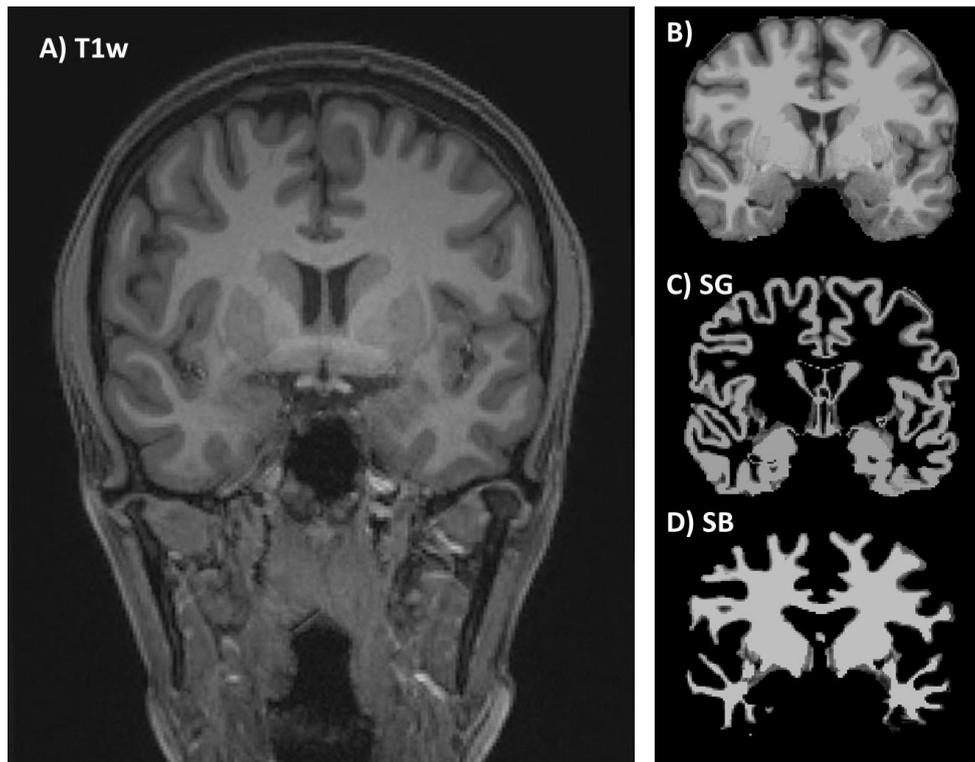


Figura 7: **Segmentación del cerebro en los tres tipos de tejido.** Ejemplo de imagen ponderada en T1 de un paciente antes de la segmentación del tejido (A) y después (B-D). La segmentación del tejido cerebral permite obtener imágenes de la masa cerebral (B), de la sustancia gris (C) y de la sustancia blanca (D) por separado.

➤ *Procesamiento de las imágenes T1w y T2w: Segmentación del hipocampo*

La T1w es también utilizada para la parcelación del hipocampo empleando el algoritmo desarrollado por Iglesias et. al (96). La implementación de esta metodología se encuentra incluida dentro de paquete de procesamiento de imágenes FreeSurfer (v.6.0.0). En la *Figura 8* se puede observar el resultado de la segmentación de los hipocampos obtenida para uno de los sujetos del estudio.

Este método utiliza un modelo generativo que se adapta muy bien a imágenes con distintos contrastes o al uso de imágenes ponderadas tanto en T1 como en T2 (97). Mediante un atlas de probabilidad de la formación hipocampal e inferencia Bayesiana se obtiene un mapa de segmentación donde las probabilidades se traducen en vóxeles con diferentes intensidades (50).

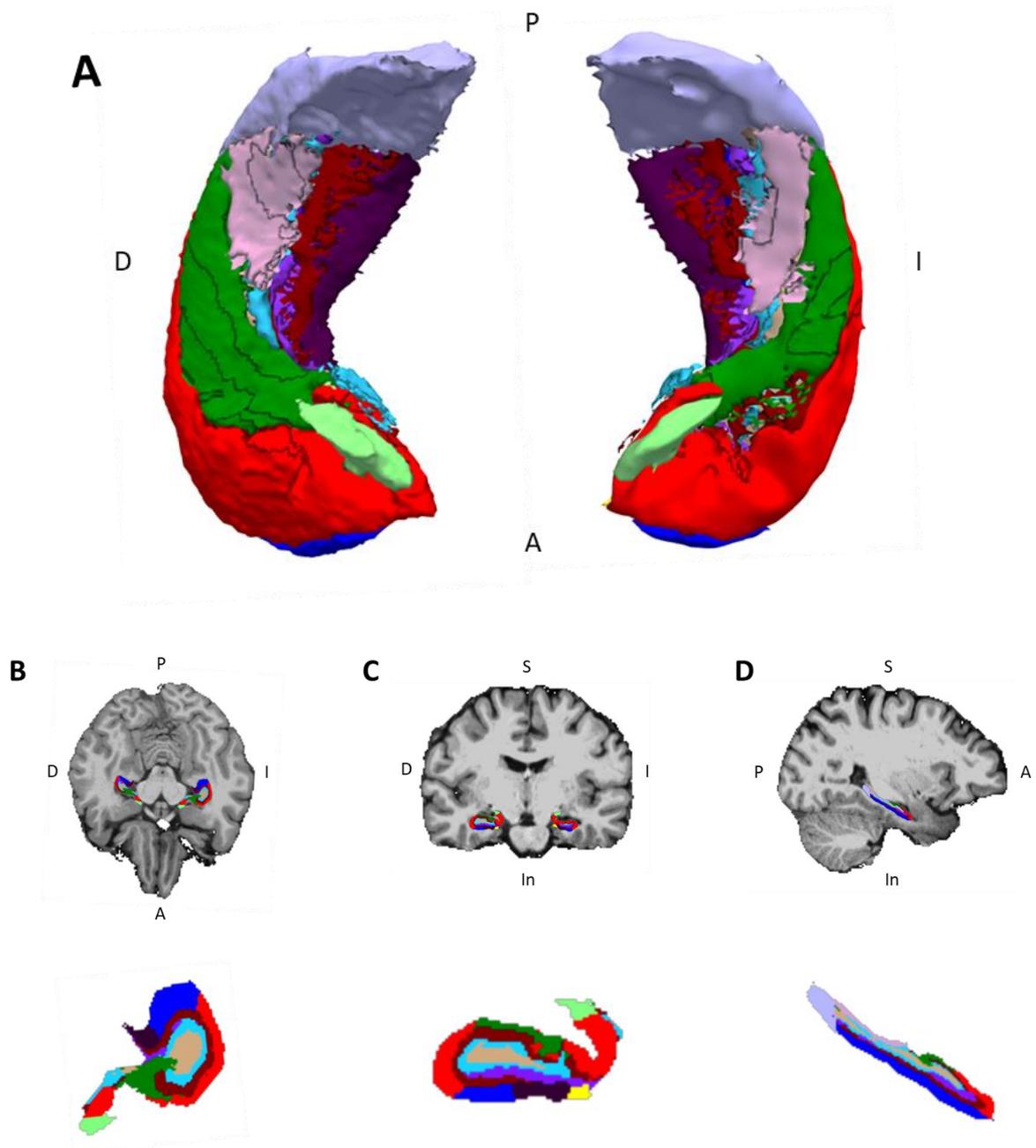


Figura 8. Segmentación de las subregiones hipocampales realizada con FreeSurfer v.6.0.0. (A). Modelo 3D de un hipocampo bilateral segmentado en vista axial; Vistas axial (B), coronal (C) y sagital (D) del cerebro de un paciente con ETM-EH, con la segmentación de las diferentes subregiones hipocampales superpuesta. Debajo de cada uno de los cortes aparece ampliada la segmentación correspondiente del hipocampo izquierdo (B, D) y derecho (C). Leyenda: subículo (■), CA1 (■), CA2/3 (■), GD (■), CA4 (■), parasubiculo (■), presubiculo (■), HATA (■), fimbria (■), capa molecular del subículo y CA (■), fisura hipocampal (■) y cola del hipocampo (■). P=posterior, A=anterior, D=derecha, I=izquierda, S=superior, In=inferior.

Las regiones resultantes al aplicar este método son: parasubículo, presubículo, subículo, CA1, CA2/3, CA4, capa granular del GD, área de transición del hipocampo y la amígdala (HATA), fimbria, capa molecular del subículo y el CA, fisura hipocampal y cola del hipocampo. En el caso del GD, FreeSurfer designa únicamente la capa de las células granulares e identifica como CA4 las capas polimórfica y molecular. Por esta razón, en nuestros análisis, lo designado como GD se refiere únicamente a la capa granular, cuyas células ha sido demostrado que realizan las computaciones neurales necesarias para la SP (42).

Las subregiones hipocampales finalmente utilizadas en el análisis fueron CA1, CA3 y GD. El volumen de cada una de estas regiones se obtuvo a partir de la parcelación obtenida para cada uno de los sujetos.

➤ *Procesamiento de las imágenes ponderadas en difusión:*

Análisis de la microestructura del hipocampo

Por último, se analizó la difusión de las moléculas de agua en cada una de las subregiones hipocampales obtenidas, mediante la combinación de DWI con la segmentación en FreeSurfer 6.0.0.

En primer lugar, las DWIs son sometidas a correcciones que permiten:

- Eliminar el ruido, con la herramienta *dwidenoise* de MRtrix3.
- Eliminar el efecto del posible movimiento del sujeto durante la adquisición de las DWIs.
- Corregir y reducir el artefacto producido por las corrientes de *eddy*. Estas corrientes las induce el propio campo magnético del equipo de resonancia y contaminan la señal de difusión. Estas dos últimas correcciones se realizan con la herramienta *eddy* de FSL.
- Corregir las distorsiones que aparecen en las imágenes adquiridas con secuencias EPI en regiones donde existen tejidos colindantes que presentan valores muy diferentes de susceptibilidad magnética. Esta corrección fue realizada empleando el registro entre la imagen deformada (una de las imágenes EPI sin ponderación en difusión, B0) y la imagen T1w. El registro entre ambas imágenes fue efectuado empleando la herramienta de registro de imágenes *antsRegistration* incluida en el paquete de procesamiento ANTs (*Advanced Normalization Tools*).

Estas imágenes corregidas fueron empleadas por SMT para calcular los mapas de fracción de volumen intra y extra-neurita para cada uno de los sujetos. Los mapas de microestructura que hemos empleado en el análisis son la difusión media total (DM), la fracción de anisotropía (FA),

la difusión media del espacio extra-neurita (DMEXTRA) y la fracción volumétrica del compartimento intra-neurita (vINTRA) (Figura 9) (55).

Por último, se mapean las subregiones hipocampales obtenidas en el paso anterior sobre el espacio de la imagen de difusión (con *antsApplyTransform* de Advanced Normalization Tools) y se calcularon los valores medios de DM, FA, DMEXTRA y vINTRA para cada una de ellas.

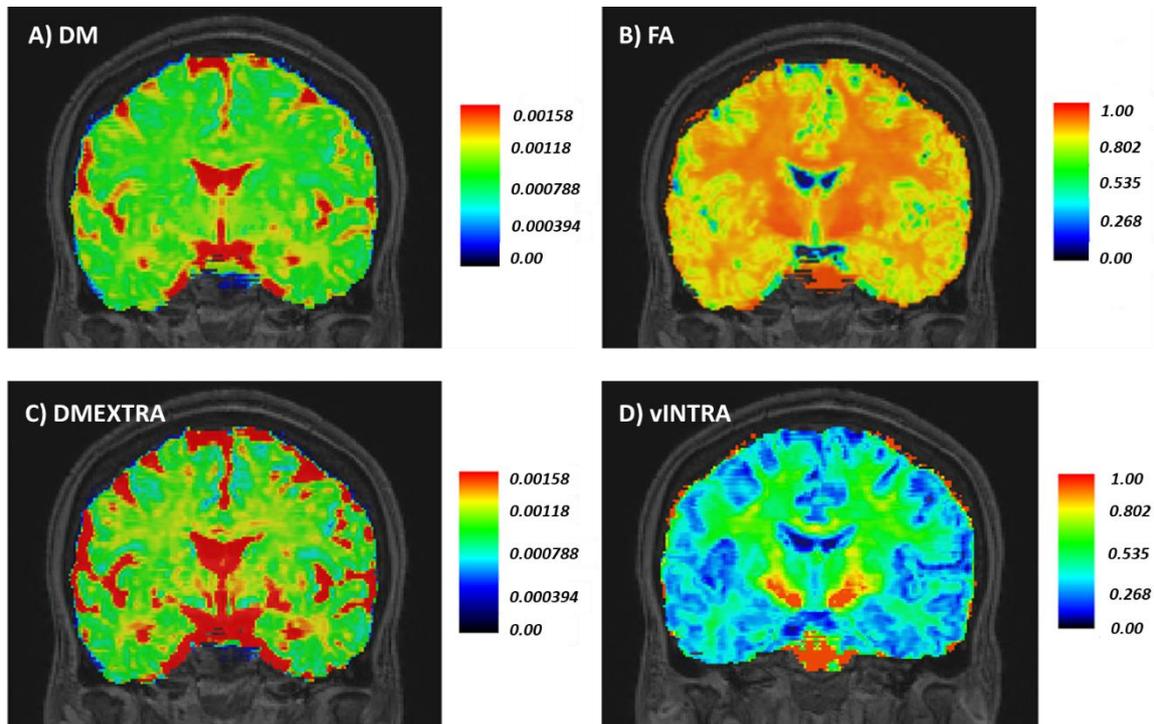


Figura 9. **Mapas de microestructura.** Ejemplo de mapas de microestructura de un paciente con ETM-EH predominantemente unilateral utilizados en este trabajo. (A) Mapa de la difusión media ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$); (B) Mapa de la fracción de anisotropía (valor escalar 0-1); (C) Mapa de la difusión media del espacio extra-neurita ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$); (D) Mapa de la fracción volumétrica del espacio intra-neurita (valor escalar 0-1).

3.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 22.0 para Windows.

En primer lugar, se analizaron los datos obtenidos de la tarea MST. Para ello se comprobó la correlación entre los resultados de la condición O_N y la condición O_S para poder descartar que pudieran deberse a una causa común. Esto se realizó con correlaciones de Spearman. Además, se analizó el cambio en el porcentaje de aciertos de cada sujeto para cada una de las condiciones de interferencia (1, 4 y 8) con pruebas de los rangos con signo de Wilcoxon, una prueba no paramétrica de muestras pareadas.

Posteriormente se analizó la variación de volumen para cada subregión hipocámpal (CA1, CA3 y GD) del hipocampo del hemisferio ipsilateral al foco epileptogénico (al que denominaremos “lesionado”) y contralateral al foco (denominado “no lesionado”) en los sujetos. Esto se realizó con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

Para analizar la variación de cada una de las variables de la difusión (DM, FA, DMEXTRA, vINTRA) entre el hemisferio lesionado frente al no lesionado se realizaron pruebas de los rangos con signo de Wilcoxon para cada una de las subregiones hipocámpales.

La caracterización de las variaciones de volumen y difusión entre los hemisferios lesionado y no lesionado se realizó por un lado para todos los pacientes en su conjunto y por otro diferenciando en dos bloques según si presentaban la lesión en el hemisferio derecho o izquierdo.

Por último, se exploró la relación entre los resultados de la tarea de discriminación mnemónica en sus dos condiciones y los volúmenes y variables de difusión de CA1, CA3 y GD en los sujetos. Para ello se realizaron correlaciones parciales y regresiones lineales múltiples, controlando en cada caso por el volumen intracraneal. Las regresiones lineales múltiples emplearon el método de análisis simultáneo o método *enter*.

Los resultados están expresados en media \pm DS o en forma de porcentaje. Para todas las pruebas estadísticas se estableció el nivel de significación en $\alpha=0.05$ ($p<0.05 = *$; $p<0.01 = **$; $p<0.001 = ***)$

4. RESULTADOS

En este apartado se exponen los datos resultantes de este estudio. En primer lugar, se presentan los resultados que obtuvieron los pacientes en cada una de las condiciones de la tarea de tipo MST utilizada. Posteriormente se describen los cambios tanto volumétricos como microestructurales que presentan en las subestructuras hipocampales CA1, CA3 y GD. Finalmente, analizamos cuál es la relación existente entre las alteraciones de las subestructuras hipocampales y los fallos mnemónicos evidenciados en la prueba de discriminación.

4.1. Análisis de los resultados de la tarea MST

En primer lugar, comprobamos la correlación entre los datos de la variable O_S (prueba específica de la SP) y O_N (prueba de memoria de reconocimiento) de la prueba MST para descartar que los déficits en O_S solo fueran secundarios a un fallo en la memoria de reconocimiento general. Los resultados (en porcentaje de aciertos) de O_S no correlacionaban de manera significativa con los de O_N en ninguno de los tres niveles de interferencia. (*Figura 10A*)

El estudio de la función de la memoria se realizó en cada paciente con respecto a sí mismo en las diferentes condiciones de la prueba MST (i.e. O_N constituyó la situación control y O_S constituyó la situación experimental). Al comparar el rendimiento de todos los sujetos para cada nivel de interferencia (1, 4 y 8), encontramos que la media de aciertos era menor en las condiciones 4_O_S ($71,4 \pm 7,2$) y 8_O_S ($65,6 \pm 12,7$) frente a los resultados de las condiciones parejas 4_O_N ($82,2 \pm 12,5$) y 8_O_N ($91,2 \pm 10,1$). Es decir, los pacientes tenían peores resultados en la parte de la prueba específica para la SP que en la que cuantifica la calidad de la memoria de reconocimiento. Esto sucede en las categorías con mayor nivel de interferencia puesto que requieren más recursos para posibilitar la SP (*Figura 10B*).

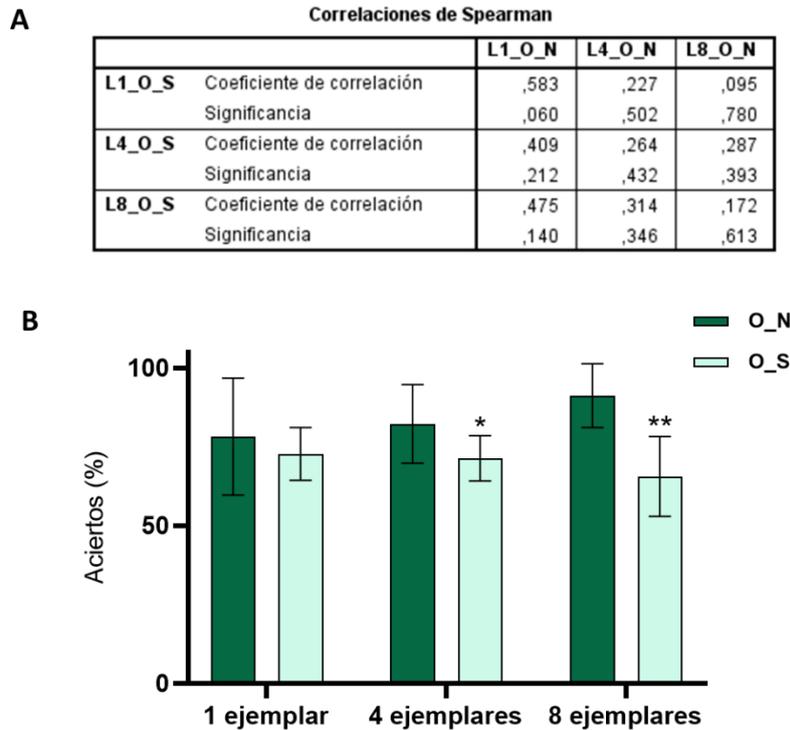


Figura 10. **Relación entre las diferentes condiciones de la tarea MST** para todos los pacientes. (A) Correlaciones entre las dos condiciones de la prueba. Observamos que no hay correlaciones significativas entre los resultados de la condición O_S (separación de patrones) y O_N (memoria de reconocimiento) para ninguno de los niveles de interferencia. (B) Comparación del rendimiento de los pacientes en las condiciones O_N y O_S para cada nivel de interferencia. Respecto a sí mismos, los pacientes presentan menor porcentaje de aciertos en O_S con 4 ($p < 0.05$) y 8 ($p < 0.01$) elementos de interferencia.

4.2. Caracterización de las alteraciones volumétricas

A continuación, comparamos el volumen de las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo lesionado frente a las del hipocampo no lesionado. Tanto individualmente como al promediar los datos de todos los pacientes, se observó menor volumen en las tres subestructuras hipocampales del hemisferio lesionado ($p < 0.05$). La reducción era mayor en la región del GD (pérdida media del 32% del volumen), mientras que CA3 era la región menos afectada (con una pérdida media del 23% de volumen) (Figura 11, Figura 12).

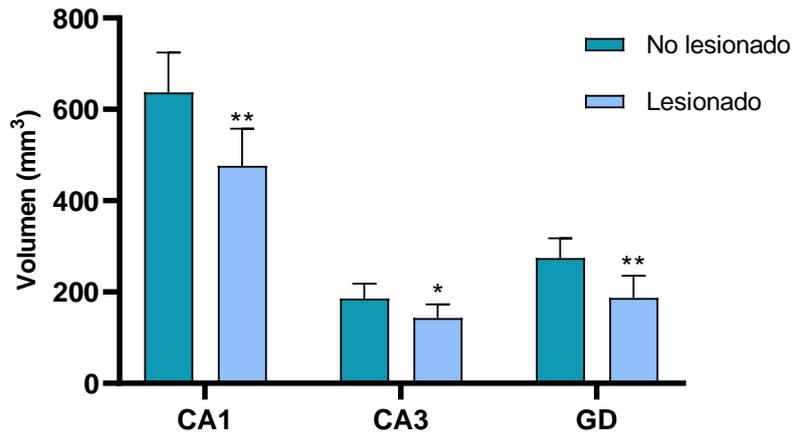


Figura 11. **Cambios volumétrico en CA1, CA3 y GD.** Análisis del volumen de las subestructuras CA1, CA3 y GD de los hipocampos lesionado y no lesionado de los pacientes con ETM-EH. Al promediar los datos de todos los pacientes se observa una reducción del volumen en el lado lesionado significativa en las tres subestructuras (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$)

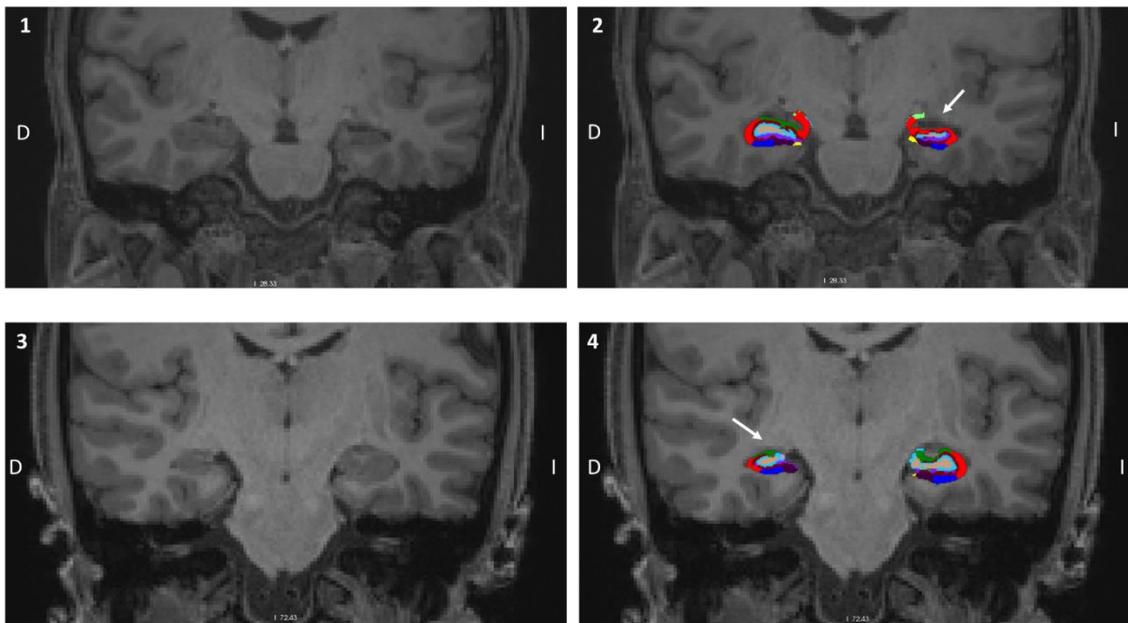


Figura 12. **Caracterización de las alteraciones volumétricas.** Vista coronal del cerebro de dos sujetos con (2, 4) y sin (1, 3) la segmentación de las subregiones hipocámpales superpuesta. La fila superior (1, 2) corresponde a un sujeto con ETM-EH con foco epileptogénico unilateral izquierdo (I) y la fila inferior (3, 4) a un sujeto con ETM-EH con foco unilateral derecho (D). En ambos casos se puede observar una reducción volumétrica en el hipocampo ipsilateral al foco (flecha blanca). (Rojo = CA1, Verde = CA3, Azul claro = GD).

4.3. Relación entre el análisis volumétrico y la tarea MST

El análisis volumétrico de las subestructuras del hipocampo lesionado puso en manifiesto una reducción de CA1, CA3 y GD, tras lo cual quisimos determinar la posible relación entre el grado de reducción volumétrica y los resultados de la prueba MST. Para ello empleamos un índice de asimetría para cada uno de los volúmenes de CA1, CA3 y el GD, calculado como:

$$\text{Índice de asimetría} = \frac{(\text{Vol. en el hipocampo no lesionado} - \text{vol. en el hipocampo lesionado})}{\text{Vol. en el hipocampo no lesionado}} \times 100$$

➤ Condición O_N: memoria de reconocimiento

El índice de asimetría de las tres subestructuras correlacionaba de manera significativa ($R = -.890$, $p < 0.01$) con el rendimiento en la condición O_N con 8 niveles de interferencia (8_O_N) (Anexo: figura A.1). La correlación era negativa, de tal manera que cuanto menor es el porcentaje de aciertos en esta condición de la tarea mayor es la asimetría observada entre los volúmenes de CA1, CA3 y GD de ambos hemisferios.

Al introducir las tres variables (asimetría de CA1, CA3 y el GD) en un modelo de regresión lineal múltiple, es la asimetría en el volumen de CA1 la que se postuló como el mejor predictor de la condición 8_O_N, explicando aproximadamente un 72% de la varianza en los resultados de la memoria de reconocimiento cuando el nivel de interferencia es alto. (Figura 13, Anexo: figura A.2.).

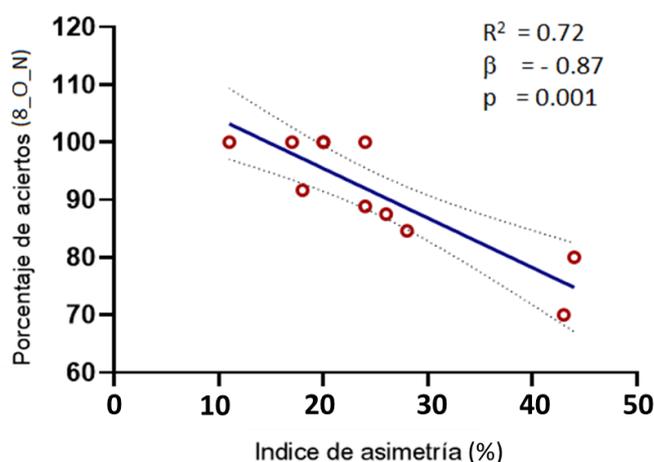


Figura 13: **Relación entre el índice de asimetría del volumen de CA1 y la tarea MST.** Encontramos una correlación negativa entre el índice de asimetría de CA1 y el porcentaje de aciertos en la condición O_N con 8 niveles de interferencia ($R = -.890$, $p < 0.01$). Es decir, cuanto menor es el porcentaje de aciertos en 8_O_N, mayor asimetría se observa en el volumen de CA1. El modelo de regresión lineal también es significativo ($R^2 = .724$, $F(1, 8) = 27.209$, $p = 0.001$, $\beta = -.867$).

➤ Condición O_S : separación de patrones

Ninguna de los índices de asimetría calculados correlacionaba de manera significativa con los resultados de la condición que evalúa la SP, por lo que no se encontró ninguna estructura cuya atrofia volumétrica macroscópica fuera un predictor claro del rendimiento en la SP.

4.4. Caracterización de los cambios en la difusión de la microestructura

Al igual que ocurre con el volumen, la difusión libre del agua se vio afectada en CA1, CA3 y GD del hipocampo lesionado con respecto al no lesionado. En concreto aumentó tanto la DM como la DMEXTRA, lo cual podría ser indicativo de daño en la SG observable a nivel de las somas neuronales y la glía. (*Figura 14A y 14C*). El aumento de la DM y la DMEXTRA fue proporcionalmente mayor en el GD (con un aumento de media del 12-13% en el GD lesionado) y menor en CA3 (con un aumento medio del 9% en CA3 lesionado), siendo las estructuras más y menos afectadas respectivamente ($p < 0.05$).

No se encontraron cambios significativos en los parámetros fraccionales de la SB en el hipocampo lesionado. La FA media aumentó en las regiones CA1, CA3 y GD del hemisferio lesionado frente a las del no lesionado ($p > 0,05$; *Figura 14B*). Respecto a v_{INTRA} , se encontró una tendencia de disminución en CA1, CA3 y el GD del lado lesionado frente al no lesionado. Estos cambios, como ya hemos mencionado, no logran la significación estadística. ($p > 0,05$; *Figura 14D*)

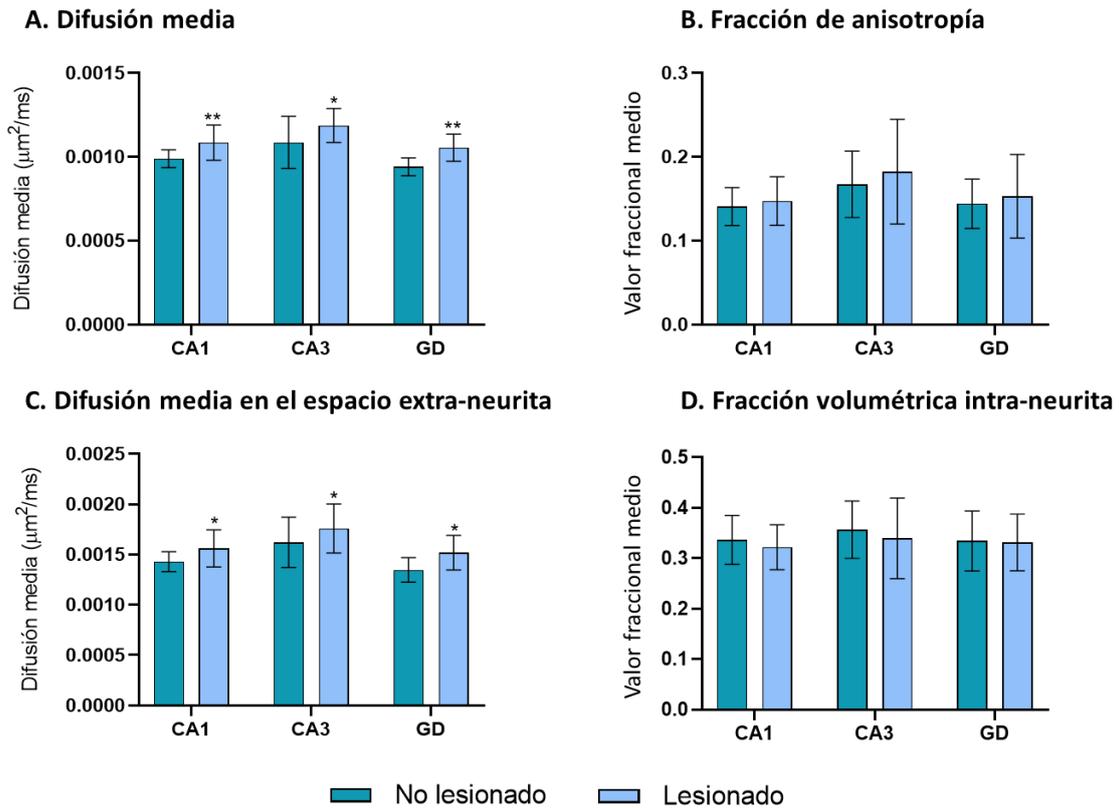


Figura 14. Cambios en la microestructura de CA1, CA3 y GD. Análisis de los parámetros de difusión de la SG y la SB para las estructuras hipocámpicas CA1, CA3 y GD contralaterales e ipsilaterales al foco epileptogénico. Se observan cambios significativos (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$) en todas las subestructuras para los parámetros difusión media (A) y difusión media en el espacio extra-neurita (C); pero no para la fracción de anisotropía (B) o la fracción de agua intra-neurita (D).

Este primer análisis compara los parámetros en ambos hemisferios sin tener en cuenta si el hemisferio lesionado es el derecho o el izquierdo. Por ello, para poder estudiar un posible efecto de lateralización en las alteraciones, se realizó un segundo análisis de los parámetros diferenciando entre los pacientes con ETM-EH con afectación del hipocampo derecho ($n=4$) o izquierdo ($n=7$). En los pacientes con afectación predominante izquierda, la VINTRA no cambia e incluso tiende a aumentar en el lado lesionado comparado con el no lesionado. Sin embargo, en pacientes con afectación derecha, se observó una tendencia no significativa de disminución de VINTRA en CA1, CA3 y el GD en el lado lesionado respecto al no lesionado, similar a la encontrada estudiando el conjunto de pacientes ($p = 0,068$; Figura 14D).

Estas diferencias entre los dos grupos de pacientes, divididos por su hemisferio lesionado, no se encontraron para el resto de los parámetros de volumetría o difusión.

4.5. Relación entre el estado de la microestructura y la tarea MST

Para determinar la relación entre la microestructura de CA1, CA3 y GD y el rendimiento en las diferentes condiciones de la prueba de memoria MST, se calculó un índice de asimetría para la DM y DMEXTRA de cada subestructura de la misma forma que la indicada en el apartado 4.3.

➤ *Condición O_N: memoria de reconocimiento*

Sustancia gris (DM, DMEXTRA)

Se encontró una correlación significativa entre el índice de asimetría de DMEXTRA de CA1 y la condición 8_O_N ($p < 0.05$, *Anexo: figura A.3*). El coeficiente de correlación es negativo, es decir, cuanto mayor es la asimetría entre la DMEXTRA en CA1 de ambos hemisferios, menor es el porcentaje de aciertos de la condición O_N de la prueba con nivel alto de interferencia. Sin embargo, ningún modelo de regresión lineal múltiple del índice de asimetría de la DMEXTRA con esta condición fue significativo, por lo que la asimetría en la DMEXTRA de CA1 no es predictor del rendimiento en la condición 8_O_N.

Considerando los parámetros de difusión en las subestructuras del hipocampo lesionado, se observó que los valores de DM y DMEXTRA de CA1, CA3 y GD correlacionaban de manera significativa ($p < 0.05$) con la condición 8_O_N, a excepción de la DMEXTRA de CA1 ($p = 0.059$; *Anexo: figura A.4*). Es decir, a nivel de la microestructura del tejido lesionado, cuanto mayor es la difusión media que se observa en las tres subregiones estudiadas, menor es el rendimiento en la condición 8_O_N de los pacientes. Al introducir los valores de DM y DMEXTRA de CA1, CA3 y GD lesionados en modelos de regresión lineal múltiple, los que corresponden al GD se postularon como mejores predictores del rendimiento (*Figura 15*). Los modelos en los que participa CA3 también fueron significativos (*Anexo: figura A.5 y A.6*) por lo que la DM de ambas estructuras estaría contribuyendo en torno a un 55% ($p = 0,017$) a la varianza del rendimiento en la condición para la memoria de reconocimiento.

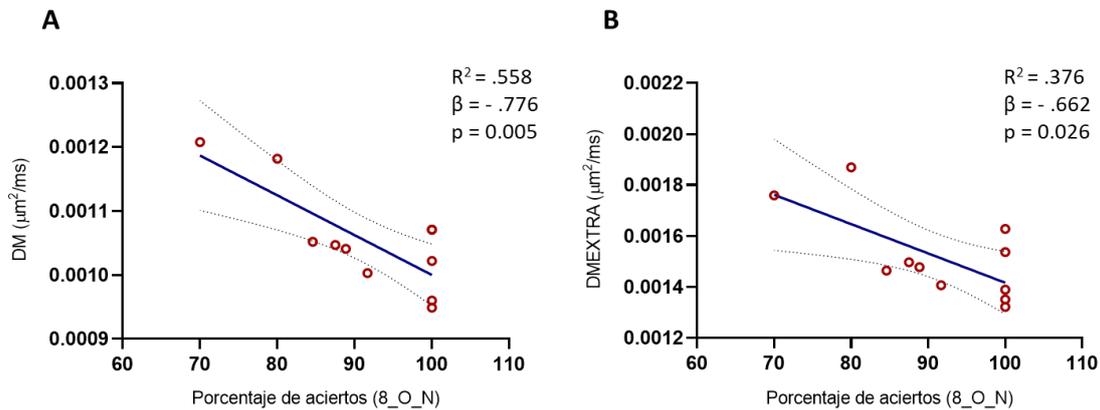


Figura 15: Relación entre la microestructura del GD en el hemisferio lesionado y la tarea MST. Encontramos correlaciones negativas entre la DM (A) y DMEXTRA (B) de la subestructura GD y el porcentaje de aciertos en la condición 8_O_N ($R = -.768$, $p < 0.05$; $R = -.698$, $p < 0.05$, respectivamente). Cuanto mayor es la DM y DMEXTRA que se observa en el GD lesionado, menor es el rendimiento en la condición 8_O_N de los pacientes. El modelo de regresión lineal es significativo en ambas: (A) $R^2 = .558$, $F(1, 8) = 13.642$, $p = 0.005$, $\beta = -.776$, y (B) $R^2 = .376$, $F(1, 8) = 7.038$, $p = 0.026$, $\beta = -.662$.

Sustancia blanca (FA, vINTRA)

Al caracterizar los parámetros referidos a la SB (FA e vINTRA) de las subestructuras del hipocampo lesionado no encontramos un patrón de cambio significativo que se mantuviera para todos los sujetos como sí sucedía con las DM, por lo que no calculamos índices de asimetría (*apartado 4.3*). Por esta razón se analizó la relación entre FA y vINTRA con el rendimiento en las diferentes condiciones de la tarea MST únicamente en las subestructuras del hemisferio lesionado. De esta manera se pudo comprobar que vINTRA de CA3 y GD correlacionaba de manera significativa con el rendimiento en la condición 4_O_N (CA3: $R = .731$, $p = 0.016$; GD: $R = .736$, $p = 0.015$).

La correlación es positiva, es decir, un menor rendimiento en la condición 4_O_N se asocia con un menor vINTRA en CA3 y el GD del hemisferio ipsilateral al foco. La vINTRA de CA3 era la que más contribuía a la varianza y por tanto la mejor predictora del rendimiento para la condición 4_O_N de la tarea. (*Figura 16, Anexo: figura A.8*)

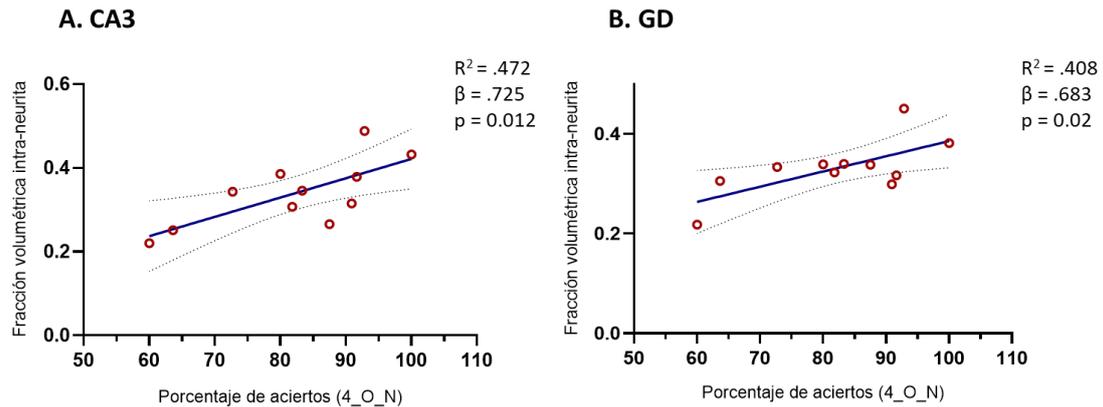


Figura 16: **Relación entre la microestructura de CA3 y GD en el hemisferio lesionado y la tarea MST.** La vINTRA de CA3 (A) y del GD (B) correlaciona de manera positiva con el porcentaje de aciertos en la condición 4_O_N ($R = .731$, $p=0.016$ y $R = .736$, $p=0.015$, respectivamente). Cuanto menor es el rendimiento en la condición 4_O_N de los pacientes, menor es la vINTRA que se observa en las dos subestructuras del hipocampo lesionado. Los modelos de regresión lineal son significativos en los dos casos, siendo el de CA3 el que mejor predice el rendimiento en esta condición (en el modelo (A): $R^2 = .472$, $F(3, 6) = 9.949$, $p = 0.012$, $\beta = .725$)

➤ Condición O_S: separación de patrones

Al igual que sucede con los volúmenes, ninguno de los índices de asimetría de la DM (apartado 4.3) correlacionaba con los resultados de la condición que evalúa la SP en pacientes con ETM-EH. Ocurría lo mismo al analizar los demás parámetros de la microestructura en las subregiones del hipocampo lesionado.

Sin embargo, al analizar el rendimiento para la condición O_S en relación con los parámetros de difusión del hipocampo no lesionado, sí que se pudo establecer una conexión. En concreto, la FA del GD no lesionado correlacionaba de manera significativa con los resultados de la condición 1_O_S y 8_O_S. Cuanto mayor es la FA de la estructura, mayor es el resultado obtenido en la tarea de SP. La FA del CA3 no lesionado también correlacionaba con la condición 8_O_S, por lo que también podría estar influyendo en el rendimiento en esa condición. (Figura 17, Anexo: figura A.9)

De las dos subestructuras, es la FA del GD no lesionado la que se postuló como mejor predictor de los resultados en la condición O_S en un modelo de regresión con estos parámetros (Anexo: figura A.10), si bien ninguno de estos modelos era significativo, por lo que no podemos confirmar que estos parámetros sean predictores de la SP. Sin embargo, se puede afirmar que el conjunto de la integridad de la SB en el GD y CA3 del hipocampo no lesionado está relacionado con el rendimiento para la SP en la tarea MST.

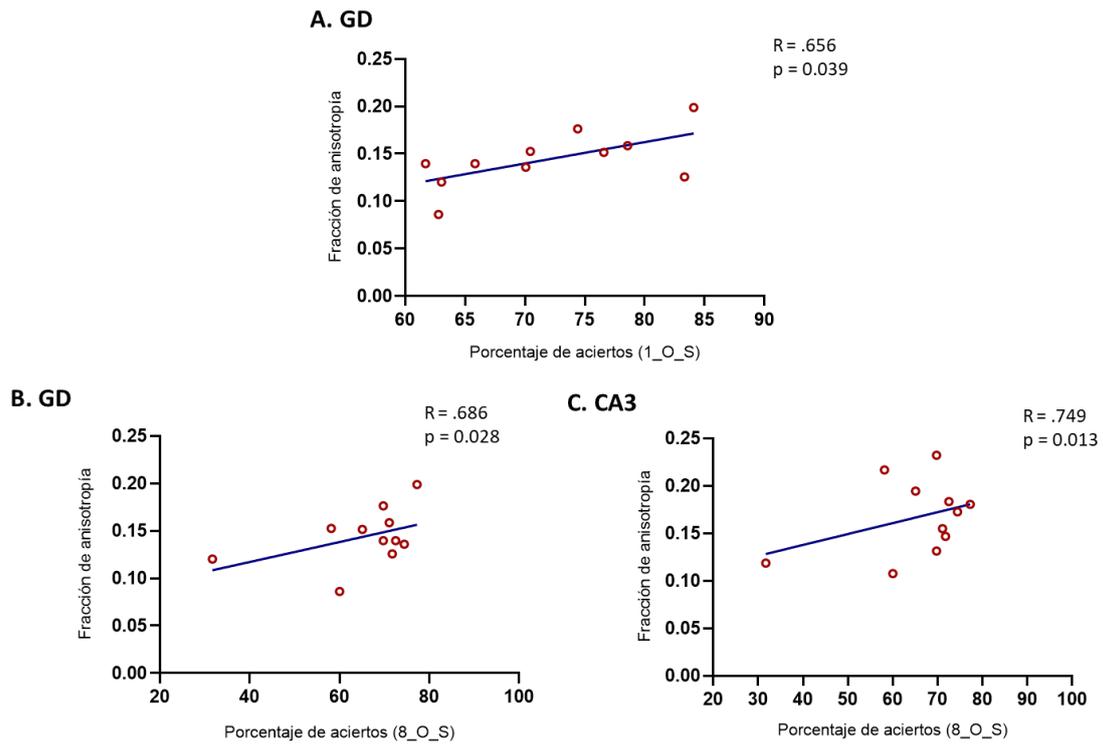


Figura 17. Relación entre el estado de la SB en el hipocampo no lesionado y el desempeño de la tarea MST. La FA del GD no lesionado correlaciona con el porcentaje de aciertos en la condición O_S con 1 (A) y 8 (B) niveles de interferencia. Sucede lo mismo con la FA de CA3 en la condición 8_O_S (C). Cuanto mayor es la FA que se observa en las dos subestructuras del hipocampo no lesionado, mayor es el rendimiento en las condiciones 1_O_S y 8_O_S. Los modelos de regresión lineal no son significativos ($p > 0.05$).

5. DISCUSIÓN

La ETM-EH es una enfermedad que se caracteriza por déficits mnemónicos muy concretos y con alteraciones estructurales en las principales subregiones del hipocampo: CA1, CA3 y el GD (56,80,84). El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar las funciones de la memoria afectadas, así como describir los cambios estructurales macroscópicos y microscópicos del hipocampo para posteriormente poder relacionarlos con el funcionamiento mnémico.

5.1. Caracterización de los déficits mnemónicos

Para poder relacionar las alteraciones descritas con la función mnemónica, los pacientes ejecutaron una versión de la tarea MST clásica (68) que había sido puesta a punto anteriormente por nuestro grupo (79). Esta versión se basa en la teoría del olvido por interferencia y añade un nivel más de profundidad al análisis de la SP variando el número de ejemplares similares que se presentan inicialmente a los sujetos. En dicho trabajo se puso de manifiesto que los pacientes con ETM-EH presentan un porcentaje de aciertos menor frente a los controles en la parte de la prueba específica para la SP (condición O_S), especialmente en las categorías de mayor nivel de interferencia (4 y 8 ejemplares presentados). En cambio, en la parte de la tarea MST que evalúa la memoria de reconocimiento general (condición O_N) no presentaban una diferencia de rendimiento con respecto a los controles.

En ausencia de controles sanos, este estudio ha podido corroborar lo siguiente. Los pacientes obtienen peores resultados en la parte de la prueba que evalúa la SP en comparación con los resultados obtenidos al reconocer dos objetos de diferentes categorías. Esto sucede en las condiciones que requieren mayor esfuerzo de SP, es decir, aquellas en las que se presentan un mayor número de distractores (*Figura 10B*).

La tarea MST nos permite obtener una doble información acerca de las funciones mnemónicas. Por un lado, la condición de identificación de un elemento ya visto frente a otro muy similar (distractor) tiene como objetivo analizar la función de SP en los sujetos. A su vez, esta tarea también evalúa la memoria de reconocimiento general en la condición de identificación del elemento presentado frente a otro que no se asemeja a él. Esto nos permite comprobar si los fallos en la condición de SP se deben a fallos generales de la memoria o a fallos específicos de la codificación de patrones diferenciados (46). Al no existir una correlación significativa entre los porcentajes de aciertos de ambas condiciones de la tarea MST (*Figura 10A*), podemos verificar

que, si bien la función de SP no está completamente separada de otros fallos mnemónicos, no es un resultado exclusivo de los mismos.

5.2. Alteraciones en las subestructuras hipocampales

A nivel macroscópico, los pacientes presentan en el hipocampo esclerótico, ipsilateral al foco epileptogénico, menor volumen en las tres subestructuras hipocampales estudiadas: CA1, CA3 y GD (*Figura 11*). De éstas, el GD y CA1 son las estructuras con mayor reducción con respecto a sus homólogas en el hipocampo contralateral. Esto concuerda con los datos del estudio histopatológico de clasificación de ETM-EH de la ILAE. Según este estudio, el tipo de ETM-EH más común es aquel que presenta pérdida neuronal severa en las regiones de CA1 y GD-CA4 (80). Asimismo, otros estudios de RM estructural también señalaron estas dos subestructuras como las más afectadas en esta enfermedad (83,84).

A nivel de la microestructura, hasta la fecha ningún estudio con RM había descrito los cambios en cada subregión hipocampal como consecuencia de la esclerosis, dado que los estudios se hacían a nivel del hipocampo en su totalidad. En nuestro trabajo, el cambio más representativo se produce a nivel de la DM. La DM es un parámetro que permite determinar la integridad tisular, ya que con la muerte celular, degeneración axonal, gliosis, etc. se rompen las barreras que retienen el agua y esta difunde con mayor libertad por el tejido (53). En concordancia con los datos macroscópicos, la DM aumenta en CA1, CA3 y el GD, lo cual sugiere un daño a nivel celular (*Figura 14A*). Este daño sería mayor en el GD, que se postula como la estructura más afectada en la ETM-EH.

Además, en este trabajo se introduce como novedad el análisis separado de dos compartimentos tisulares: el conjunto de las neuritas (dendritas y axones) por un lado y los cuerpos neuronales, la glía y el espacio extracelular por otro. Esta diferenciación permite especificar a qué nivel celular aparecen los daños que podrían observarse como una atrofia macroscópica. Al analizar los cambios en la difusión de agua en los dos compartimentos encontramos un patrón que se mantiene en CA1, CA3 y el GD. En concreto hay un aumento en la difusión de agua en el espacio extra-neurita, acompañado de una tendencia a la reducción en la fracción volumétrica de agua presente en el compartimento intra-neurita (aunque esta última no logra la significación estadística) (*Figura 14C y 14D*). Es decir, es posible que se esté produciendo un daño a nivel de las fibras de SB que ocasionaría la salida de agua hacia la SG, donde además difunde con mayor libertad. Este patrón de cambio podría indicar una alteración en la densidad axonal o ser secundario a una reducción de la vaina de mielina, lo cual favorecería

la salida de agua de las fibras (98). Para los axones poco o no mielinizados es más difícil diferenciar entre una hipomielinización y una reducción en la densidad axonal, por lo que serían necesarias otras pruebas histopatológicas para corroborar alteraciones específicas en la vaina de mielina de los axones (99).

Cabe destacar que los cambios en la fracción de agua del compartimento intra-neurita se mantienen solo en los pacientes con ETM-EH de afectación predominantemente derecha. La divergencia entre los pacientes con ETM-EH derecha e izquierda ha sido descrita a varios niveles. Las manifestaciones clínicas de la epilepsia son diferentes en ambos grupos, y los pacientes con ETM-EH unilateral derecha suelen presentar inicios más tempranos de la enfermedad y crisis más frecuentes y duraderas. Además, la pérdida de volumen de SG que muestran es mayor que en los pacientes cuya lateralización es izquierda (100). Es decir, en nuestro proyecto también hemos podido detectar diferencias según el lado de aparición de la enfermedad, que se pueden observar a nivel de la microestructura del tejido del hipocampo, en concreto de la región de las neuritas.

5.3. Relación entre las alteraciones estructurales y de la memoria

El análisis conjunto de los cambios estructurales y los resultados de la tarea de discriminación es novedoso en dos aspectos. En primer lugar, ningún estudio hasta ahora ha analizado conjuntamente parámetros macroscópicos y microscópicos a nivel de las subestructuras hipocampales frente a medidas comportamentales en los mismos pacientes con ETM-EH. Esto se debe a la dificultad para establecer un protocolo de procesamiento de imágenes a este nivel y a que los estudios no suelen hacer el análisis de las subregiones (53) o bien lo realizan pero no llevan a cabo en el mismo grupo de pacientes pruebas mnemónicas (82,83).

Por otro lado, nuestro estudio se ha realizado en ausencia de controles. Todos los estudios de este tipo comparan los pacientes con sujetos sin ETM-EH para determinar su función mnemónica. Sin embargo, nosotros hemos querido comprobar la dinámica de esta función en los propios pacientes con respecto a sí mismos y como se relaciona con las características estructurales de propio hipocampo. Esto es importante porque la epilepsia es una enfermedad de redes. En el caso de la ETM-EH esto quiere decir que aunque tenga un foco de inicio unilateral, las alteraciones morfológicas y funcionales que se observan en estos pacientes tienden a expandirse por otras regiones cerebrales, y en muchas ocasiones también llegan a afectar al hemisferio contralateral al foco (*revisado en* (101)). Además debido a la naturaleza

compensatoria del cerebro (102,103), analizar cada paciente respecto a sí mismo nos permite determinar qué regiones del hipocampo están ejerciendo primordialmente cada función estudiada y cómo se redistribuyen estas funciones en ambos hemisferios en las alteraciones estructurales presentadas. Por tanto, la selección de la muestra y su posterior análisis nos ha permitido establecer un control intrasujeto y poder observar las posibles adaptaciones de las redes neuronales como resultado del contexto patológico.

Por otra parte, para la memoria de reconocimiento general observamos discrepancias sobre qué estructuras están involucradas en función de cuáles fueran los parámetros analizados. A nivel macroscópico, las desigualdades en atrofia volumétrica entre los dos hipocampos apuntan a CA1 como la estructura más relacionada con este proceso mnemónico (*Figura 13*). Este hallazgo es consistente con estudios previos que han utilizado métodos muy similares (46). Sin embargo, al analizar a nivel microscópico el hipocampo lesionado en pacientes de ETM-EH con focos epilépticos predominantemente lateralizados, daños microestructurales en el GD y CA3 parecen influir en los fallos mnemónicos generales (*Figura 15, Figura 16*). En el análisis a ambos niveles los daños en las tres subestructuras están relacionados con el rendimiento de la memoria de reconocimiento, imponiéndose unas u otras como mejores predictores según el parámetro analizado. Esto probablemente sea debido a que la memoria de reconocimiento es un proceso mnemónico más amplio y que puede estar involucrando otros mecanismos de generalización como la familiaridad (79) que no dependen exclusivamente de una única subregión hipocampal e incluso involucren regiones parahipocampales (104). Es por eso por lo que sería necesaria la integridad de las tres principales estructuras hipocampales para un correcto reconocimiento.

Ocurre lo contrario si analizamos la condición de SP de la tarea MST. En este caso ninguno de los parámetros analizados en las tres subestructuras del hipocampo ipsilateral al foco epiléptico parece estar relacionado con esta función. Al extender el análisis al hipocampo contralateral al foco, menos afectado, sí encontramos una relación entre el rendimiento en la condición SP y la fracción de anisotropía de las regiones GD y CA3 (*Figura 17*). La SP es una función muy concreta de la memoria que, al contrario que la memoria de reconocimiento, es llevada a cabo fundamentalmente por una estructura, el GD (20). Éste es el primer y más importante relevo en el proceso de separación de experiencias muy similares en patrones de memoria diferenciados y no solapados entre sí (42). Si bien se ha comprobado que CA3 y CA1 también intervienen en el proceso, evidencias de otras enfermedades corroboran que la integridad del GD es esencial para la SP (6).

Por otro lado, se sabe por estudios histopatológicos que una pérdida de más del 60% de células granulares del GD ocasiona la pérdida de la función mnemónica en los pacientes (81). Nuestros sujetos presentan una pérdida de media del 31% del volumen de la región de células granulares del GD en el hemisferio ipsilateral a la esclerosis. Por tanto, existiría la posibilidad de que en el hipocampo más afectado, el GD haya perdido tal cantidad de células granulares que sea incapaz de realizar correctamente la función de SP. Todos los resultados de SP observados serían por tanto únicamente un reflejo de la actividad del GD del hemisferio contralateral al foco, menos afectado por la enfermedad, que aún conserva mayor integridad. Es por esto por lo que la condición O_S de la tarea solo dependería de los parámetros estructurales del hemisferio no lesionado.

En el hemisferio no lesionado, la SP se relaciona únicamente con valores de difusión microestructural del GD y CA3, lo cual puede deberse a que se estén detectando alteraciones microestructurales a nivel de las membranas celulares y la integridad de las fibras de SB antes de que estas alteraciones se manifiesten como pérdida significativa de volumen de las subestructuras (51,52). Además, el parámetro microestructural que correlaciona con la SP es la FA, que ha sido asociada con anterioridad con fallos mnemónicos de la SP en el envejecimiento fisiológico (65). Como consecuencia del envejecimiento se observa una menor FA en la región del GD/CA3 que además correlaciona con la hiperactivación observada con fMRI en esta zona, indicativo de fallos en el balance de la compleción-separación de patrones a favor de la CP. Es decir, a partir de cierto umbral de muerte celular, la capacidad de realizar la SP estaría relacionada con la integridad de las neuritas en el GD y CA3 contralaterales al hipocampo dañado predominantemente por la enfermedad.

Estos resultados concuerdan además con estudios recientes que tratan sobre la reorganización computacional de la memoria que se da en la epilepsia. En concreto se ha descrito que aquellos pacientes con ETM-EH unilateral que conservan más intactas las funciones de memoria presentan mayor activación y conectividad funcional en regiones hipocampales y del LTM contralateral al foco epileptogénico. Los déficits mnemónicos en estos pacientes no dependen únicamente del fallo de un foco funcional, sino también de la capacidad del cerebro de poner en marcha respuestas reorganizadoras que aseguren un buen funcionamiento de la memoria (103). En nuestro caso, la función mnemónica de la SP podría depender de una respuesta compensatoria llevada a cabo por el GD y CA3 contralateral, evidenciado por la mayor integridad de sus fibras de SB.

5.4. Limitaciones

Nuestro estudio presenta una serie de limitaciones, en su mayoría técnicas. La principal de ellas sería el tamaño reducido de la muestra. La dificultad de reclutamiento de los pacientes y de adquisición de RM estructurales con una resolución de 3T hace que el proceso de obtención de datos sea largo. Para paliar el efecto de la variabilidad individual y afianzar los resultados obtenidos sería indicado repetir los análisis con un mayor número de individuos.

Otra de las limitaciones existentes es la interpretación actual de los resultados de los parámetros de difusión. Si bien varios estudios han relacionado cambios similares a los descritos por nosotros con afectaciones concretas (como es el caso del aumento de difusión extra-neurita junto con una reducción de volumen de agua intra-neurita, que han sido relacionados con reducción de la vaina de mielina (98)), no es posible asegurar la naturaleza específica de estos cambios solo con datos de RM estructural. La FA, por ejemplo, es un marcador muy sensible de neuropatología de la SB pero también muy inespecífico (91). La reducción en la FA del GD y CA3 únicamente indica por tanto peor alineación de las fibras de SB. Esto puede ser debido a un gran número de causas, como desmielinización o pérdida de integridad, pero también otras alteraciones en la zona como inflamación o edema (91). Además, el hipocampo es una subestructura compuesta principalmente por SG por lo que es más difícil determinar alteraciones concretas de la SB. Al utilizar técnicas de análisis como SMT podemos determinar con mayor exactitud parámetros relacionados con la SB, presente en menor medida en el hipocampo. Sin embargo, aún es necesario un mayor refinamiento de la técnica y combinarla con otras técnicas de análisis tisular *post-mortem* o post intervención quirúrgica para confirmar la naturaleza concreta de las alteraciones.

La propia naturaleza de la ETM-EH introduce una limitación en nuestros resultados, ya que tiene un inicio unilateral muy localizado pero la esclerosis tiende a extenderse por otras regiones cerebrales tanto ipsilaterales como contralaterales (76). Además, de forma fisiológica, el hipocampo derecho suele tener mayor volumen que el izquierdo (105). Esta asimetría se observa sobre todo en el GD y CA3, y en menor medida en CA1 (106). En este estudio hemos elegido pacientes con el foco epileptogénico predominantemente unilateral para poder comparar el hemisferio más afectado con el menos afectado. Sin embargo, al no disponer de datos de su estado previo a la esclerosis no podemos asegurar que el hipocampo no lesionado esté completamente sano o que las diferencias estructurales observadas no se deban a desigualdades previas a la enfermedad. Esto puede ser un sesgo al analizar especialmente los índices de asimetría.

Por último, hemos de tener en consideración la lateralización de funciones en el hipocampo. En humanos, el hipocampo derecho se encarga en mayor medida de la codificación de memorias episódicas con un componente de navegación espacial (107); mientras que el izquierdo se encargaría de aquellas memorias episódicas con un componente más verbal (108). Esta lateralización se observa también en estudios de SP. Las tareas de SP de tipo semántica, donde el sujeto tiene que discriminar entre varias imágenes con significado, correlacionan con una mayor activación en el hipocampo izquierdo. Por su parte, las tareas de tipo SP espacial, en las cuales el sujeto tiene que diferenciar elementos con distinta localización o grado de rotación, activan más el hipocampo derecho (109). En nuestro estudio, la tarea MST utilizada es de tipo semántico. Si bien en el reclutamiento de los pacientes se ha intentado igualar el número de personas en cada grupo de afectación, esto podría estar interfiriendo en los resultados, beneficiando a aquellos pacientes cuyo foco epileptogénico está en el LTM derecho y que por tanto conservan el izquierdo más intacto.

5.5. Perspectivas futuras

Dado que este trabajo de fin de máster forma parte de un proyecto más extenso, el primer paso adecuado sería aumentar el tamaño de la muestra para afianzar los resultados preliminares. Esto se hará en un futuro próximo a medida que se vayan obteniendo las imágenes de RM estructural de los pacientes ya reclutados.

La ETM-EH es una enfermedad que tiene una aparición temprana (entre los 4 y los 16 años) pero que puede aparecer a lo largo de toda la vida. La edad de inicio y por tanto la duración de la enfermedad determinan la gravedad de los síntomas, siendo estos mayores cuando más pronto debuta (75,100). También se ha visto que en condiciones fisiológicas la relación entre la SP y las subregiones hipocampales varía de manera no lineal con la edad (110). Sería interesante por tanto estudiar si la edad de inicio de la enfermedad influye en la alteración de la SP en pacientes con ETM-EH y si la variación no lineal se mantiene también en condiciones patológicas.

Por otro lado, en otras patologías se ha podido establecer la relación entre los déficits en la SP y la hiperactivación patológica de la región de CA3 en fMRI (20,47). Esta hiperactivación introduce en la ecuación otras estructuras que podrían estar alteradas, como la vía perforante o la red inhibitoria. Ampliar este estudio con datos de fMRI de las diferentes subregiones permitiría comprobar si este fenómeno sigue ocurriendo en la ETM-EH y ayudaría concretar aún más la naturaleza de las alteraciones causadas por la enfermedad que acaban ocasionando los déficits en la memoria.

Por último, una vez aumente el tamaño de la muestra, sería interesante analizar los grupos de pacientes de ETM-EH con foco epileptogénico predominante derecho e izquierdo por separado para estudiar si el lado de afectación determina los cambios que se producen en las diferentes subestructuras, como ya se vislumbra en la caracterización de parámetros como vINTRA (*Figura 14D*). Además, repetir el estudio con una prueba de MST de tipo espacial permitirá comprobar si las diferencias entre ambos grupos de pacientes se deben únicamente al tipo de prueba utilizada o a un desarrollo diferencial de la enfermedad.

6. CONCLUSIONES

El establecimiento de un protocolo bioinformático novedoso de análisis de las imágenes de RM estructural y DWI a nivel de las subregiones hipocampales ha permitido describir en pacientes con ETM-EH predominantemente unilateral alteraciones estructurales que se relacionan e incluso pueden llegar a predecir el funcionamiento de la memoria en estos pacientes.

Los pacientes de ETM-EH predominantemente unilateral presentan déficits específicos en la función mnemónica de separación de patrones. Estos déficits son mayores en condiciones de alta interferencia, en los cuales la demanda sobre la SP es mayor.

En cuanto a los cambios estructurales en el hipocampo, estos pacientes presentan menor volumen y mayor difusión media en la microestructura de CA1, CA3 y el GD ipsilaterales al foco epileptogénico. Entre ellos, el GD aparece como la región más afectada.

Las alteraciones estructurales y el rendimiento mnemónico se relacionan de diferente manera según cuál sea la función de la memoria analizada en pacientes de ETM-EH unilateral:

Funciones más generales de la memoria, como es el reconocimiento frente a elementos muy diferentes, se relacionan con el grado de integridad que mantienen CA1, CA3 y el GD ipsilaterales al foco epiléptico, más afectado por la enfermedad.

Finalmente, cabe destacar que ningún estudio había logrado relacionar el estado mnémico específico de pacientes de ETM-EH unilateral con alteraciones a nivel de subregiones del hipocampo concretas. Nuestro trabajo ha permitido comprobar que la función de separación de patrones en pacientes de ETM-EH unilateral se relaciona con el estado de las fibras de sustancia blanca de las subregiones GD y CA3 contralaterales al foco epiléptico.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(24):13515–22.
2. Marron EM, Adrover-Roig D, Sanchez-Cubillo I, Miranda R, Periañez J. Bases neuroanatómicas del aprendizaje y la memoria. In: UOC, editor. *Fundamentos del aprendizaje y del lenguaje.* 1st ed. 2013. p. 63–94.
3. Eichenbaum H, Cohen NJ. *From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain.* Oxford University Press; 2001.
4. Keresztes A, Ngo CT, Lindenberger U, Werkle-Bergner M, Newcombe NS. Hippocampal Maturation Drives Memory from Generalization to Specificity. *Trends Cogn Sci.* 2018 Aug;22(8):676–86.
5. Renoult L, Davidson PSR, Palombo DJ, Moscovitch M, Levine B. Personal semantics: at the crossroads of semantic and episodic memory. *Trends Cogn Sci.* 2012 Nov;16(11):550–8.
6. Baker S, Vieweg P, Gao F, Gilboa A, Wolbers T, Black SE, et al. The Human Dentate Gyrus Plays a Necessary Role in Discriminating New Memories. *Curr Biol.* 2016;26(19):2629–34.
7. Zeithamova D, Preston AR. Flexible Memories: Differential Roles for Medial Temporal Lobe and Prefrontal Cortex in Cross-Episode Binding. *J Neurosci.* 2010 Nov 3;30(44):14676–84.
8. Yassa MA, Stark CEL. Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 2011 Oct;34(10):515–25.
9. Neunuebel JP, Knierim JJ. CA3 Retrieves Coherent Representations from Degraded Input: Direct Evidence for CA3 Pattern Completion and Dentate Gyrus Pattern Separation. *Neuron.* 2014 Jan;81(2):416–27.
10. Hipskind E. An investigation of memory specificity and generalization in young children and adults [Doctoral Thesis]. University of Texas; 2020.
11. Bayley PJ, Squire LR. The medial temporal lobe and declarative memory. *Int Congr Ser.* 2003 Oct;1250:245–59.
12. Rolls ET. Pattern separation, completion, and categorisation in the hippocampus and neocortex. *Neurobiol Learn Mem.* 2016 Mar;129:4–28.
13. Schlichting ML, Preston AR. The Hippocampus and Memory Integration: Building Knowledge to Navigate Future Decisions. In: *The Hippocampus from Cells to Systems.* Springer International Publishing; 2017. p. 405–37.
14. Haines D, Mihailoff GA. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications.* 4th ed. Elsevier; 2018. 528 p.
15. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science.* 5th ed. McGraw-Hill Medical; 2013.
16. Knierim JJ, Neunuebel JP, Deshmukh SS. Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: objects, path integration and local–global reference frames. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2014 Feb 5;369(1635):20130369.
17. Dillon SE, Tsivos D, Knight M, McCann B, Pennington C, Shiel AI, et al. The impact of ageing reveals distinct roles for human dentate gyrus and CA3 in pattern separation and object recognition memory. *Sci Rep.* 2017 Dec 25;7(1):14069.
18. Rolls ET. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front Syst Neurosci.* 2013;7:1–21.
19. Leal SL, Yassa MA. Integrating new findings and examining clinical applications of pattern separation. *Nat Neurosci.* 2018 Feb 25;21(2):163–73.
20. Yassa MA, Stark SM, Bakker A, Albert MS, Gallagher M, Stark CEL. High-resolution structural and functional MRI of hippocampal CA3 and dentate gyrus in patients with amnesic Mild Cognitive Impairment. *Neuroimage.* 2010 Jul;51(3):1242–52.
21. Santoro A. Reassessing pattern separation in the dentate gyrus. *Front Behav Neurosci.* 2013;7(JUL):1–4.

22. Rolls ET, Kesner RP. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog Neurobiol.* 2006 May;79(1):1–48.
23. Dengler CG, Coulter DA. Normal and epilepsy-associated pathologic function of the dentate gyrus. *Prog Brain Res.* 2016;226:155–78.
24. Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser M-B, Moser EI. Pattern Separation in the Dentate Gyrus and CA3 of the Hippocampus. *Science (80-).* 2007 Feb 16;315(5814):961–6.
25. Clark DI, Mendez MF, Boutros NN. *El cerebro y la conducta: neuroanatomía para psicólogos.* 2nd ed. El manual moderno; 2012.
26. Reagh ZM, Yassa MA. Object and spatial mnemonic interference differentially engage lateral and medial entorhinal cortex in humans. *Proc Natl Acad Sci.* 2014 Oct 7;111(40):E4264–73.
27. Wilson IA, Gallagher M, Eichenbaum H, Tanila H. Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding. *Trends Neurosci.* 2006 Dec;29(12):662–70.
28. Treves A, Rolls ET. Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus.* 1992 Apr 2;2(2):189–99.
29. Rolls ET. *Memory, Attention, and Decision-Making.* Oxford University Press; 2007.
30. Marr D. Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc London B, Biol Sci.* 1971 Jul;262(841):23–81.
31. Guzowski JF, Knierim JJ, Moser EI. Ensemble Dynamics of Hippocampal Regions CA3 and CA1. *Neuron.* 2004 Nov;44(4):581–4.
32. Bakker A, Kirwan CB, Miller M, Stark CEL. Pattern Separation in the Human Hippocampal CA3 and Dentate Gyrus. *Science (80-).* 2008 Mar 21;319(5870):1640–2.
33. Lacy JW, Yassa MA, Stark SM, Muftuler LT, Stark CEL. Distinct pattern separation related transfer functions in human CA3/dentate and CA1 revealed using high-resolution fMRI and variable mnemonic similarity. *Learn Mem.* 2010 Dec 16;18(1):15–8.
34. Hanert A, Pedersen A, Bartsch T. Transient hippocampal CA1 lesions in humans impair pattern separation performance. *Hippocampus.* 2019 Aug;29(8):736–47.
35. Purves D. *Neuroscience.* 6th ed. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, C. Hall W, LaMantia A-S, Mooney RD, et al., editors. Sinauer Associates, Oxford University Press; 2018.
36. Richards BA, Frankland PW. The Persistence and Transience of Memory. *Neuron.* 2017 Jun;94(6):1071–84.
37. Davis RL, Zhong Y. The Biology of Forgetting – A Perspective. 2017;95(3):490–503.
38. Wixted JT. The Psychology and Neuroscience of Forgetting. *Annu Rev Psychol.* 2004 Feb;55(1):235–69.
39. Chadwick MJ, Bonnici HM, Maguire EA. CA3 size predicts the precision of memory recall. *Proc Natl Acad Sci.* 2014 Jul 22;111(29):10720–5.
40. Lassalle J-M, Bataille T, Halley H. Reversible Inactivation of the Hippocampal Mossy Fiber Synapses in Mice Impairs Spatial Learning, but neither Consolidation nor Memory Retrieval, in the Morris Navigation Task. *Neurobiol Learn Mem.* 2000 May;73(3):243–57.
41. Lee I, Kesner RP. Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus.* 2004;14(1):66–76.
42. Madar AD, Ewell LA, Jones M V. Pattern separation of spiketrains in hippocampal neurons. *Sci Rep.* 2019 Dec 27;9(1):5282.
43. Madar AD, Pfammatter JA, Bordenave J, Plumley EI, Ravi S, Cowie M, et al. Deficits in Behavioral and Neuronal Pattern Separation in Temporal Lobe Epilepsy. *bioRxiv.* 2020 Jan 1;2020.02.13.948364.
44. Eliot L. Bad Science and the Unisex Brain. *Nature.* 2019;453–4.
45. Stark SM, Kirwan CB, Stark CEL. Mnemonic Similarity Task: A Tool for Assessing Hippocampal Integrity. *Trends Cogn Sci.* 2019 Nov;23(11):938–51.
46. Hanert A, Rave J, Granert O, Ziegler M, Pedersen A, Born J, et al. Hippocampal Dentate Gyrus Atrophy

- Predicts Pattern Separation Impairment in Patients with LGI1 Encephalitis. *Neuroscience*. 2019 Feb;400:120–31.
47. Bakker A, Albert MS, Krauss G, Speck CL, Gallagher M. Response of the medial temporal lobe network in amnesic mild cognitive impairment to therapeutic intervention assessed by fMRI and memory task performance. *NeuroImage Clin*. 2015;7:688–98.
 48. Berron D, Schutze H, Maass A, Cardenas-Blanco A, Kuijff HJ, Kumaran D, et al. Strong Evidence for Pattern Separation in Human Dentate Gyrus. *J Neurosci*. 2016 Jul 20;36(29):7569–79.
 49. La Joie R, Fouquet M, Mézenge F, Landeau B, Villain N, Mevel K, et al. Differential effect of age on hippocampal subfields assessed using a new high-resolution 3T MR sequence. *Neuroimage*. 2010 Nov 1;53(2):506–14.
 50. Van Leemput K, Bakkour A, Benner T, Wiggins G, Wald LL, Augustinack J, et al. Automated segmentation of hippocampal subfields from ultra-high resolution in vivo MRI. *Hippocampus*. 2009 Jun;19(6):549–57.
 51. Baliyan V, Das CJ, Sharma R, Gupta AK. Diffusion weighted imaging: Technique and applications. *World J Radiol*. 2016;8(9):785.
 52. Leh SE, Schroeder C, Chen J-K, Mallar Chakravarty M, Park MTM, Cheung B, et al. Microstructural Integrity of Hippocampal Subregions Is Impaired after Mild Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2017 Apr;34(7):1402–11.
 53. Winston GP, Vos SB, Caldaïrou B, Hong S-J, Czech M, Wood TC, et al. Microstructural imaging in temporal lobe epilepsy: Diffusion imaging changes relate to reduced neurite density. *NeuroImage Clin*. 2020;26:102231.
 54. Lawrenz M, Brassens S, Finsterbusch J. Microscopic diffusion anisotropy in the human brain: Reproducibility, normal values, and comparison with the fractional anisotropy. *Neuroimage*. 2015 Apr;109:283–97.
 55. Kaden E, Kelm ND, Carson RP, Does MD, Alexander DC. Multi-compartment microscopic diffusion imaging. *Neuroimage*. 2016 Oct;139:346–59.
 56. Reyes A, Holden HM, Chang Y-HA, Uttarwar VS, Sheppard DP, DeFord NE, et al. Impaired spatial pattern separation performance in temporal lobe epilepsy is associated with visuospatial memory deficits and hippocampal volume loss. *Neuropsychologia*. 2018 Mar;111:209–15.
 57. Tran T, Bridi M, Koh MT, Gallagher M, Kirkwood A. Reduced cognitive performance in aged rats correlates with increased excitation/inhibition ratio in the dentate gyrus in response to lateral entorhinal input. *Neurobiol Aging*. 2019 Oct;82(9):120–7.
 58. Burke SN, Barnes CA. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(1):30–40.
 59. Wilson I., Ikonen S, McMahan R., Gallagher M, Eichenbaum H, Tanila H. Place cell rigidity correlates with impaired spatial learning in aged rats. *Neurobiol Aging*. 2003 Mar;24(2):297–305.
 60. Newman MC, Kaszniak AW. Spatial Memory and Aging: Performance on a Human Analog of the Morris Water Maze. *Aging, Neuropsychol Cogn*. 2000 Jun 9;7(2):86–93.
 61. Berron D, Cardenas-Blanco A, Bittner D, Metzger CD, Spottke A, Heneka MT, et al. Higher CSF Tau Levels Are Related to Hippocampal Hyperactivity and Object Mnemonic Discrimination in Older Adults. *J Neurosci*. 2019 Oct 30;39(44):8788–97.
 62. Pereira JB, Valls-Pedret C, Ros E, Palacios E, Falcón C, Bargalló N, et al. Regional vulnerability of hippocampal subfields to aging measured by structural and diffusion MRI. *Hippocampus*. 2014 Apr;24(4):403–14.
 63. Voineskos AN, Winterburn JL, Felsky D, Pipitone J, Rajji TK, Mulsant BH, et al. Hippocampal (subfield) volume and shape in relation to cognitive performance across the adult lifespan. *Hum Brain Mapp*. 2015 Aug;36(8):3020–37.
 64. Wolf D, Fischer FU, de Flores R, Chételat G, Fellgiebel A. Differential associations of age with volume and microstructure of hippocampal subfields in healthy older adults. *Hum Brain Mapp*. 2015 Oct;36(10):3819–31.
 65. Yassa MA, Muftuler LT, Stark CEL. Ultrahigh-resolution microstructural diffusion tensor imaging reveals perforant path degradation in aged humans in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Jul 13;107(28):12687–91.

66. Petersen RC, Roberts RO, Knopman DS, Boeve BF, Geda YE, Ivnik RJ, et al. Mild Cognitive Impairment. *Arch Neurol*. 1999 Dec 1;66(12):411–24.
67. Anderson ND, Ebert PL, Jennings JM, Grady CL, Cabeza R, Graham SJ. Recollection- and familiarity-based memory in healthy aging and amnesic mild cognitive impairment. *Neuropsychology*. 2008 Mar;22(2):177–87.
68. Stark SM, Yassa M a., Lacy JW, Stark CEL. A task to assess behavioral pattern separation (BPS) in humans: Data from healthy aging and mild cognitive impairment. *Neuropsychologia*. 2013 Oct;51(12):2442–9.
69. Mufson EJ, Binder L, Counts SE, DeKosky ST, DeToledo-Morrell L, Ginsberg SD, et al. Mild cognitive impairment: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2012 Jan 19;123(1):13–30.
70. Bakker A, Krauss GL, Albert MS, Speck CL, Jones LR, Stark CE, et al. Reduction of Hippocampal Hyperactivity Improves Cognition in Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Neuron*. 2012 May;74(3):467–74.
71. Li X, Li D, Li Q, Li Y, Li K, Li S, et al. Hippocampal subfield volumetry in patients with subcortical vascular mild cognitive impairment. *Sci Rep*. 2016 Aug 15;6(1):20873.
72. Yushkevich PA, Pluta JB, Wang H, Xie L, Ding S-L, Gertje EC, et al. Automated volumetry and regional thickness analysis of hippocampal subfields and medial temporal cortical structures in mild cognitive impairment. *Hum Brain Mapp*. 2015 Jan 17;36(1):258–87.
73. Finke C, Prüss H, Heine J, Reuter S, Kopp UA, Wegner F, et al. Evaluation of Cognitive Deficits and Structural Hippocampal Damage in Encephalitis With Leucine-Rich, Glioma-Inactivated 1 Antibodies. *JAMA Neurol*. 2017 Jan 1;74(1):50.
74. NINDS. The Epilepsies and Seizures: Hope Through Research [Internet]. 15-156. 2015 [cited 2020 Apr 18]. Available from: https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Hope-Through-Research/Epilepsies-and-Seizures-Hope-Through#3109_9
75. Wieser HG. Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. *Epilepsia*. 2004 Jun;45(6):695–714.
76. Bonilha L, Martz GU, Glazier SS, Edwards JC. Subtypes of medial temporal lobe epilepsy: Influence on temporal lobectomy outcomes? *Epilepsia*. 2012 Jan;53(1):1–6.
77. Gonçalves Pereira PM, Oliveira E, Rosado P. Relative localizing value of amygdalo-hippocampal MR biometry in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 2006 May;69(2):147–64.
78. Lévesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(10):2887–99.
79. Poch C, Toledano R, García-Morales I, Prieto A, García-Barragán N, Aledo-Serrano Á, et al. Mnemonic discrimination in patients with unilateral mesial temporal lobe epilepsy relates to similarity and number of events stored in memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2020;169(February):107177.
80. Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2013 Jul;54(7):1315–29.
81. Coras R, Pauli E, Li J, Schwarz M, Rössler K, Buchfelder M, et al. Differential influence of hippocampal subfields to memory formation: insights from patients with temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2014 Jul;137(7):1945–57.
82. Granados Sánchez AM, Orejuela Zapata JF. Esclerosis hipocámpal: evaluación volumétrica de las subestructuras del hipocampo utilizando resonancia magnética. *Radiología*. 2018 Sep;60(5):404–12.
83. Santyr BG, Goubran M, Lau JC, Kwan BYM, Salehi F, Lee DH, et al. Investigation of hippocampal substructures in focal temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis at 7T. *J Magn Reson Imaging*. 2017 May;45(5):1359–70.
84. Sone D, Sato N, Maikusa N, Ota M, Sumida K, Yokoyama K, et al. Automated subfield volumetric analysis of hippocampus in temporal lobe epilepsy using high-resolution T2-weighted MR imaging. *NeuroImage Clin*. 2016 Feb;12:57–64.
85. Treit S, Little G, Steve T, Nowacki T, Schmitt L, Wheatley BM, et al. Regional hippocampal diffusion abnormalities associated with subfield-specific pathology in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia Open*. 2019 Dec 13;4(4):544–54.

86. Thivard L, Lehericy S, Krainik A, Adam C, Dormont D, Chiras J, et al. Diffusion tensor imaging in medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Neuroimage*. 2005 Nov;28(3):682–90.
87. Poch C, Prieto A, Hinojosa JA, Campo P. The impact of increasing similar interfering experiences on mnemonic discrimination: Electrophysiological evidence. *Cogn Neurosci*. 2019 Jul 3;10(3):129–38.
88. Kirwan CB, Stark CE. Overcoming interference: An fMRI investigation of pattern separation in the medial temporal lobe. *Learn Mem*. 2007;14(9):625–33.
89. Konkle T, Brady TF, Alvarez GA, Oliva A. Conceptual distinctiveness supports detailed visual long-term memory for real-world objects. *J Exp Psychol Gen*. 2010 Aug;139(3):558–78.
90. Grover VPB, Tognarelli JM, Crossey MME, Cox IJ, Taylor-Robinson SD, McPhail MJW. Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. *J Clin Exp Hepatol*. 2015 Sep;5(3):246–55.
91. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics*. 2007 Jul;4(3):316–29.
92. Hagmann P, Jonasson L, Maeder P, Thiran J-P, Wedeen VJ, Meuli R. Understanding Diffusion MR Imaging Techniques: From Scalar Diffusion-weighted Imaging to Diffusion Tensor Imaging and Beyond. *RadioGraphics*. 2006 Oct;26:S205–23.
93. Soares JM, Marques P, Alves V, Sousa N. A hitchhiker’s guide to diffusion tensor imaging. *Front Neurosci*. 2013;7(7 MAR):1–14.
94. Pierpaoli C, Jezzard P, Basser PJ, Barnett A, Di Chiro G. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology*. 1996 Dec;201(3):637–48.
95. Ashburner J, Friston KJ. Unified segmentation. *Neuroimage*. 2005 Jul;26(3):839–51.
96. Iglesias JE, Augustinack JC, Nguyen K, Player CM, Player A, Wright M, et al. A computational atlas of the hippocampal formation using ex vivo , ultra-high resolution MRI: Application to adaptive segmentation of in vivo MRI. *Neuroimage*. 2015 Jul;115:117–37.
97. Iglesias JE, Van Leemput K, Augustinack J, Insausti R, Fischl B, Reuter M. Bayesian longitudinal segmentation of hippocampal substructures in brain MRI using subject-specific atlases. *Neuroimage*. 2016 Nov;141(4):542–55.
98. Gong T, Tong Q, He H, Sun Y, Zhong J, Zhang H. MTE-NODDI: Multi-TE NODDI for disentangling non-T2-weighted signal fractions from compartment-specific T2 relaxation times. *Neuroimage*. 2020 Aug;217(May):116906.
99. Kaden E, Kruggel F, Alexander DC. Quantitative mapping of the per-axon diffusion coefficients in brain white matter. *Magn Reson Med*. 2016 Apr;75(4):1752–63.
100. Kim JS, Koo DL, Joo EY, Kim ST, Seo DW, Hong SB. Asymmetric Gray Matter Volume Changes Associated with Epilepsy Duration and Seizure Frequency in Temporal-Lobe-Epilepsy Patients with Favorable Surgical Outcome. *J Clin Neurol*. 2016;12(3):323.
101. Larivière S, Rodríguez-Cruces R, Royer J, Caligiuri ME, Gambardella A, Concha L, et al. Network-based atrophy modelling in the common epilepsies: a worldwide ENIGMA study. *bioRxiv*. 2020 Jan 1;2020.05.04.076836.
102. Hylín MJ, Kerr AL, Holden R. Understanding the Mechanisms of Recovery and/or Compensation following Injury. *Neural Plast*. 2017;2017:1–12.
103. Tracy JI, Chaudhary K, Modi S, Crow A, Kumar A, Weinstein D, et al. Computational Support, Not Primacy, Distinguishes Compensatory Memory Reorganization in Epilepsy. *bioRxiv*. 2020 Jan 1;2020.06.07.138594.
104. Aggleton JP, Vann SD, Denby C, Dix S, Mayes AR, Roberts N, et al. Sparing of the familiarity component of recognition memory in a patient with hippocampal pathology. *Neuropsychologia*. 2005 Jan;43(12):1810–23.
105. Rogers BP, Sheffield JM, Luksik AS, Heckers S. Systematic Error in Hippocampal Volume Asymmetry Measurement is Minimal with a Manual Segmentation Protocol. *Front Neurosci*. 2012;6(December):1–5.
106. Shah P, Bassett DS, Wisse LEM, Detre JA, Stein JM, Yushkevich PA, et al. Mapping the structural and functional network architecture of the medial temporal lobe using 7T MRI. *Hum Brain Mapp*. 2018 Feb 20;39(2):851–65.

107. Barkas LJ, Henderson JL, Hamilton DA, Redhead ES, Gray WP. Selective temporal resections and spatial memory impairment: Cue dependent lateralization effects. *Behav Brain Res.* 2010 Apr;208(2):535–44.
108. Martin A. Automatic activation of the medial temporal lobe during encoding: Lateralized influences of meaning and novelty. *Hippocampus.* 1999;9(1):62–70.
109. Motley SE, Kirwan CB. A Parametric Investigation of Pattern Separation Processes in the Medial Temporal Lobe. *J Neurosci.* 2012 Sep 19;32(38):13076–84.
110. Riphagen JM, Schmiedek L, Gronenschild EHB, Yassa MA, Priovoulos N, Sack AT, et al. Associations between pattern separation and hippocampal subfield structure and function vary along the lifespan: A 7 T imaging study. *Sci Rep.* 2020 Dec 5;10(1):7572.
111. Roach A, Schwartz MF, Martin N, Grewal RS, Brecher A. Philadelphia naming test: Scoring and rationale. *Clin Aphasiology.* 1996;(24):121–33.
112. Morales M, Campo P, Fernandez A, Moreno D, Yanez J, Sanudo I. Normative Data for a Six-Trial Administration of a Spanish Version of the Verbal Selective Reminding Test. *Arch Clin Neuropsychol.* 2010 Dec 1;25(8):745–61.

8. ANEXO

8.1. Muestra del estudio

Paciente	Sexo	Edad (años)	Hemisferio lesionado	Edad de inicio de la enfermedad (años)
1	M	53	Izquierdo	12
2	M	41	Izquierdo	36
3	M	28	Derecho	7
4	F	26	Derecho	24
5	M	53	Izquierdo	45
6	F	53	Izquierdo	2
7	F	58	Derecho	20
8	F	24	Derecho	6
9	M	43	Izquierdo	12
10	F	37	Izquierdo	35
11	M	20	Izquierdo	15

8.2. TEST NEUROPSICOLÓGICOS

➤ *Prueba de fluidez semántica y fonológica:*

Fluidez semántica: se pide al participante que nombre en un minuto el mayor número de ejemplares posibles de una categoría determinada (ej. Tipos de barcos, razas de perro, etc.). Los resultados de esta prueba se analizan creando una variable que incluye la suma de palabras correctas de tres categorías distintas.

Fluidez fonológica: se pide al participante que nombre en un minuto el mayor número posible de palabras que empiezan con una letra específica (ej. P, S, etc.). Los resultados de esta prueba se analizan creando una variable que incluye la suma de palabras correctas de dos letras distintas.

➤ *Tarea de denominación de Philadelphia de 175 elementos*

Tarea de denominación visual para evaluar el acceso al léxico del sujeto (111). En ella se presentan 175 imágenes de objetos conocidos y se pide al paciente que los nombre de la forma

más exacta posible. Si tras 5 segundos no ha contestado se pasa al siguiente elemento. La variable obtenida en esta tarea es el porcentaje total de aciertos.

➤ *Test de discriminación visual de objetos:*

Esta tarea se utiliza para descartar posibles problemas visuales dado que la prueba de discriminación mnemónica principal del trabajo es de tipo visual. Se presentan dos pantallas al mismo tiempo: en la primera hay una figura compleja formada por figuras simples (cuadrados, círculos y triángulos) y en la segunda cuatro figuras, una de ellas exactamente igual a la de la primera pantalla. Se le pide al participante que identifique cuál figura es exactamente igual a la de la primera pantalla, teniendo las dos delante en todo momento.

➤ *Tarea de recuerdo verbal selectivo*

Por último, se realiza una tarea de recuerdo verbal selectivo para determinar el rendimiento mnemónico general (112).

En ella se lee en voz alta al participante una lista de doce palabras sin relación entre sí y se le pide que repita todas las que pueda recordar. Posteriormente se vuelven a leer en alto solo las palabras que no ha dicho y se le pide que vuelva a nombrar las que recuerde de la lista, incluidas las que no han sido leídas esa vez. Esto se repite un máximo de 6 veces o hasta que sea capaz de nombrar todas las palabras.

Transcurridos 30 minutos se realiza una prueba de recuerdo libre y se le pide al participante que nombre todas las palabras que pueda recordar de la lista inicial. Además, se realiza una prueba de reconocimiento por elección múltiple. En éste se presentan doce tarjetas blancas, cada una con cuatro palabras. Una de esas palabras aparece en la lista inicial y el resto son distractores relacionados (fonética o semánticamente) o no con la primera. Se le pide al participante que identifique cuál de las palabras pertenece a la lista.

8.3. Relación entre el análisis volumétrico y la tarea MST

Correlaciones parciales

		1_O_N	4_O_N	8_O_N
Asy_Vol_CA1	Coefficiente de correlación	,220	,365	-,890
	Significancia	,541	,300	,001
Asy_Vol_CA3	Coefficiente de correlación	,016	,307	-,916
	Significancia	,965	,388	,000
Asy_Vol_GD	Coefficiente de correlación	,068	,363	-,802
	Significancia	,851	,302	,005

Figura A.1. Correlaciones parciales entre los índices de asimetría en volumen de CA1, CA3 y el GD y los porcentajes de aciertos de la condición O_N para los tres niveles de interferencia. Los tres índices de asimetría correlacionan negativamente ($p < 0.01$) con la condición 8_O_N. Los resultados están ponderados por el volumen intracraneal de cada sujeto.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	R2	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
1	(Constante)	111,972	4,230		,724	,001
	Asy_Vol_CA1	-82,814	15,876	-,867		
2	(Constante)	111,396	5,627		,690	,055
	Asy_Vol_CA1	-77,687	34,664	-,813		
	Asy_Vol_CA3	-3,201	18,926	-,061		
3	(Constante)	111,127	6,101		,649	,264
	Asy_Vol_CA1	-67,838	55,857	-,710		
	Asy_Vol_CA3	-3,426	20,176	-,066		
	Asy_Vol_GD	-6,922	29,464	-,109		

Figura A.2. Modelo de regresión lineal múltiple utilizado para determinar si la asimetría en volumen de CA1, CA3 y el GD de ambos hemisferios es capaz de predecir los resultados de la condición 8_O_N. La asimetría en CA1 explica el 72% de la varianza de los resultados ($p = 0,001$). El modelo está ponderado por el volumen intracraneal de cada paciente.

8.4. Relación entre el estado de la microestructura y la tarea MST

Correlaciones parciales

		L1_O_N	L4_O_N	L8_O_N
Asy_DM_CA1	Coefficiente de correlación	,520	,604	-,630
	Significancia	,123	,065	,051
Asy_DM_CA3	Coefficiente de correlación	-,436	,084	-,206
	Significancia	,208	,817	,568
Asy_DM_GD	Coefficiente de correlación	,132	,268	-,524
	Significancia	,717	,453	,120
Asy_DMEXTRA_CA1	Coefficiente de correlación	,475	,501	-,634
	Significancia	,165	,140	,049
Asy_DMEXTRA_CA3	Coefficiente de correlación	-,443	,215	-,342
	Significancia	,200	,552	,333
Asy_DMEXTRA_GD	Coefficiente de correlación	,127	,109	-,501
	Significancia	,727	,764	,140

Figura A.3. *Correlaciones parciales entre los índices de asimetría de la difusión media (Asy_DM) y la difusión media del espacio extra-neurita (Asy_DMEXTRA) de CA1, CA3 y GD, y los porcentajes de aciertos de la condición O_N para los tres niveles de interferencia. El índice de asimetría de la DMEXTRA en CA1 correlaciona de manera significativa ($p=0.049$) con la condición 8_O_N. Los resultados están ponderados por el volumen intracraneal de cada sujeto.*

Correlaciones parciales

		L1_O_N	L4_O_N	L8_O_N
DM_CA1_Les	Coefficientes de correlación	,187	,597	-,668
	Significancia	,604	,069	,035
DM_CA3_Les	Coefficientes de correlación	-,023	,440	-,800
	Significancia	,949	,203	,005
DM_GD_Les	Coefficientes de correlación	,264	,404	-,768
	Significancia	,462	,247	,009
DMEXTRA_CA1_Les	Coefficientes de correlación	,067	,722	-,615
	Significancia	,853	,018	,059
DMEXTRA_CA3_Les	Coefficientes de correlación	,035	,655	-,706
	Significancia	,924	,040	,023
DMEXTRA_GD_Les	Coefficientes de correlación	,235	,580	-,698
	Significancia	,513	,079	,025

Figura A.4. *Correlaciones entre la DM y DMEXTRA de las estructuras CA1, CA3 y GD ipsilaterales al foco epileptogénico (lesionados) y los tres niveles de la condición O_N. Encontramos correlaciones negativas ($p<0.05$) entre la DM de las tres subestructuras y la condición 8_O_N; y entre la DMEXTRA de CA3 y el GD lesionados y esta misma condición. Los resultados están ponderados por el volumen intracraneal de cada sujeto.*

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	R2	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
1	(Constante)	193,620	27,727		,558	,005
	DM_GD_Les	-96993,129	26260,219	-,776		
2	(Constante)	198,431	28,655		,546	,017
	DM_GD_Les	-70900,958	40155,647	-,567		
	DM_CA3_Les	-27145,357	31270,884	-,279		
3	(Constante)	199,816	30,807		,487	,055
	DM_GD_Les	-78519,431	49889,725	-,628		
	DM_CA3_Les	-32622,614	38072,661	-,335		
	DM_CA1_Les	12111,175	41109,484	,128		

Figura A.5. Modelo de regresión lineal múltiple utilizado para determinar si la DM de CA1, CA3 y el GD del hemisferio lesionado es capaz de predecir los resultados de la condición 8_O_N. La DM de ambas estructuras está contribuyendo en alrededor de un 55% a la varianza del rendimiento en 8_O_N en el modelo 2. El modelo está ponderado por el volumen intracraneal de cada sujeto.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	R2	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
1	(Constante)	149,080	21,842		,376	,026
	DMEXTRA_GD_Les	-37963,443	14309,817	-,662		
2	(Constante)	150,138	23,086		,312	,092
	DMEXTRA_GD_Les	-31259,051	22433,573	-,545		
	DMEXTRA_CA3_Les	-6367,174	15819,601	-,158		
3	(Constante)	148,007	25,688		,223	,209
	DMEXTRA_GD_Les	-33669,242	25344,670	-,588		
	DMEXTRA_CA3_Les	-11383,234	24528,118	-,282		
	DMEXTRA_CA1_Les	9363,633	33330,743	,176		

Figura A.6. Modelo de regresión lineal múltiple utilizado para determinar si la DMEXTRA de CA1, CA3 y el GD del hemisferio lesionado es capaz de predecir los resultados de la condición 8_O_N. La DMEXTRA del GD se postula como mejor predictor en el modelo 1, y explica el 38% de la varianza del rendimiento en 8_O_N. El modelo está ponderado por el volumen intracraneal de cada sujeto.

Correlaciones parciales

		1_O_N	4_O_N	8_O_N
vINTRA_CA1_Les	Coefficiente de correlación	-,325	,569	,051
	Significancia	,360	,086	,890
vINTRA_CA3_Les	Coefficiente de correlación	,272	,731	-,402
	Significancia	,447	,016	,249
vINTRA_GD_Les	Coefficiente de correlación	,168	,736	-,367
	Significancia	,644	,015	,296

Figura A.7. *Correlaciones entre la vINTRA de las estructuras CA1, CA3 y GD lesionados y los tres niveles de la condición O_N. Encontramos correlaciones positivas ($p < 0.05$) entre la vINTRA de CA3 y el GD y la condición 4_O_N. Los resultados están ponderados por el volumen intracraneal de cada sujeto.*

A.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	R2	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
1	(Constante)	33,783	17,772			
	vINTRA_GD_Les	148,047	52,731	,683		
2	(Constante)	38,760	18,104			
	vINTRA_GD_Les	49,361	102,853	,228		
	vINTRA_CA3_Les	81,451	73,218	,528		
3	(Constante)	20,356	21,089			
	vINTRA_GD_Les	-8,224	103,934	-,038		
	vINTRA_CA3_Les	83,570	68,501	,542		
	vINTRA_CA1_Les	113,791	77,717	,416		

B.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	R2	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
1	(Constante)	44,815	12,415			
	vINTRA_CA3_Les	111,758	35,432	,725		
2	(Constante)	38,760	18,104			
	vINTRA_CA3_Les	81,451	73,218	,528		
	vINTRA_GD_Les	49,361	102,853	,228		
3	(Constante)	20,356	21,089			
	vINTRA_CA3_Les	83,570	68,501	,542		
	vINTRA_GD_Les	-8,224	103,934	-,038		
	vINTRA_CA1_Les	113,791	77,717	,416		

Figura A.8. *Modelos de regresión lineal múltiple utilizados para determinar si la vINTRA de CA1, CA3 y el GD del hemisferio lesionado son capaces de predecir los resultados de la condición 4_O_N. los modelos (A) y (B) son significativos. El modelo (B) es el que mejor predice la varianza en 4_O_N, dado que el coeficiente β de vINTRA_CA3_Les es el más alto en todos los modelos. La vINTRA de CA3 del hemisferio lesionado explicaría un 47% de la varianza en esta condición. Los modelos están ponderados por el volumen intracraneal de cada sujeto.*

Correlaciones parciales

		L1_O_S	L4_O_S	L8_O_S
FA_CA1_NoLes	Coefficiente de correlación	,345	,418	,563
	Significancia	,330	,229	,090
FA_CA3_NoLes	Coefficiente de correlación	,492	,075	,749
	Significancia	,148	,836	,013
FA_GD_NoLes	Coefficiente de correlación	,656	,275	,686
	Significancia	,039	,442	,028

Figura A.9. *Correlaciones parciales entre la FA de las estructuras CA1, CA3 y GD no lesionados y los tres niveles de la condición O_S. Encontramos correlaciones positivas ($p < 0.05$) entre la FA de CA3 y el GD no lesionados y las condiciones 1_O_S y 8_O_S. Los resultados están ponderados por el volumen intracraneal de cada sujeto.*

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	R2	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
1 (Constante)	50,140	11,488			
FA_GD_NoLes	158,789	78,408	,560	,237	,074
2 (Constante)	51,094	12,556			
FA_CA3_NoLes	-26,501	91,050	-,120		
FA_GD_NoLes	182,765	116,746	,644	,150	,214
3 (Constante)	62,076	16,952			
FA_CA3_NoLes	-62,202	98,548	-,281		
FA_CA1_NoLes	-150,542	155,374	-,414		
FA_GD_NoLes	294,419	164,361	1,037	,144	,214

Figura A.10. *Modelo de regresión lineal múltiple utilizado para determinar si la FA de CA1, CA3 y el GD del hemisferio no lesionado es capaz de predecir los resultados de la condición 8 O_S. La FA del GD la que se postularía como mejor predictor dado que su coeficiente β es el más alto en todos los modelos. Ninguno de los modelos es significativo. El modelo está ponderado por el volumen intracraneal de cada sujeto.*

