



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Estudio de la actividad neuronal del giro dentado en el ratón mutante *Lis1/sLis1*

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Febrero 2023

Autor: Víctor Rodríguez Lobregad

Modalidad: Trabajo Experimental

Tutor/es: Raquel García López y Ana Isabel Pombero García

ÍNDICE

- 1. RESUMEN / ABSTRACT**
- 2. INTRODUCCIÓN**
 - 2.1 GEN LIS 1: LIENCEFALIA**
 - 2.2 ESQUIZOFRENIA**
 - 2.3 GIRO DENTADO**
 - 2.3.1 LOCALIZACIÓN NEUROANATÓMICA Y FUNCIONALIDAD**
 - 2.3.1 TIPOS CELULARES Y CONECTIVIDAD**
 - 2.3.2 DIFERENCIAS ENTRE LAS LÁMINAS DGip Y DGsp**
- 3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**
- 4. MATERIALES Y MÉTODOS**
 - 4.1 ANIMALES**
 - 4.2 TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA**
 - 4.3 MICROSCOPIA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**
- 5. RESULTADOS**
 - 5.1 EXPRESIÓN C-FOS LIS1/sLIS1 EN COMPARACIÓN CON CONTROL**
 - 5.2 EXPRESIÓN DE C-FOS ENTRE LAS LÁMINAS SUPRA- E INFRA-PIRAMIDAL**
 - 5.3 PORCENTAJE DE INCREMENTO DE C-FOS ENTRE LAS LÁMINAS SUPRA- E INFRA-PIRAMIDAL DE RATONES CONTROL Y LIS1/sLIS1**
- 6. DISCUSIÓN**
- 7. CONCLUSIONES**
- 8. BIBLIOGRAFÍA**

1. RESUMEN

Lis1 es uno de los principales genes relacionados con la lisencefalia tipo 1, una malformación cerebral severa caracterizada por ausencia de circunvoluciones en el córtex cerebral y una migración neuronal defectuosa en la etapa embrionaria, con predisposición a sufrir enfermedades mentales. Esta malformación está relacionada con el síndrome de Miller-Dieker cuyos pacientes presentan síntomas clínicos como epilepsia, convulsiones recurrentes, retraso mental y una predisposición a desarrollar trastornos psicóticos como la esquizofrenia (SZ), ya que esta enfermedad podría estar causada por desregulaciones en el neurodesarrollo.

Estudios en ratones en los que se ha eliminado el primer exón codificante del Lis1, obteniéndose un modelo murino (*Lis1/sLis1*), revelaron un aumento de la expresión de c-Fos (proto-oncogen utilizado como marcador de actividad neuronal) en la corteza prefrontal medial (mPFC), el hipocampo y otras zonas relacionadas con el sistema límbico. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de poder utilizar este modelo como modelo de SZ en ratones.

En este proyecto se ha realizado un estudio de la actividad neuronal comparando la expresión de células c-Fos+ entre las láminas supra-piramidal (DGsp) e infra-piramidal (DGip) del giro dentado (DG) de ratones mutantes *Lis1/sLis1* y ratones control WT. Los resultados indican que la distribución de las neuronas con aumento de excitabilidad se distribuye de forma heterogénea dentro del eje transversal del DG, la heterogeneidad intrínseca en cuanto a la funcionalidad y neuroanatomía de sus láminas pueden explicar las diferencias halladas en nuestra investigación y podrían relacionar la fisiopatología de las enfermedades neurológicas como la SZ y la mutaciones producidas en el modelo *Lis1/sLis1*, sugiriendo una continuación de las líneas de investigación que incluyen el modelo *Lis/sLis1* como modelo de SZ.

Palabras clave: Lis1, esquizofrenia, c-Fos, Giro dentado, supra-piramidal, infra-piramidal

ABSTRACT

Lis1 is one of the main genes related to type 1 lissencephaly, a severe brain malformation characterized by the absence of gyri in the cerebral cortex and defective neuronal migration in the embryonic stage, with a predisposition to mental illness. This malformation is related to Miller-Dieker syndrome, whose patients present clinical symptoms such as epilepsy, recurrent seizures, mental retardation, and a predisposition to develop psychotic disorders such as schizophrenia (SZ), since this disease could be caused by neurodevelopmental dysregulation. .

Studies in mice in which the first coding exon of Lis1 has been deleted, obtaining a murine model (*Lis1/sLis1*), revealed an increase in the expression of c-Fos (proto-oncogene used as a marker of neuronal activity) in the medial prefrontal cortex (mPFC), the hippocampus and other areas related to the limbic system. These findings suggest the possibility of using this model as a mouse model of SZ.

In this project, a study of neuronal activity has been carried out comparing the expression of c-Fos⁺ cells between the supra-pyramidal (DGsp) and infra-pyramidal (DGip) layers of the dentate gyrus (DG) of *Lis1/sLis1* mutant mice and mice control w.t. The results indicate that the distribution of neurons with increased excitability is heterogeneously distributed within the transversal axis of the DG, the intrinsic heterogeneity in terms of the functionality and neuroanatomy of its sheets may explain the differences found in our research and could relate the pathophysiology of neurological diseases such as SZ and the mutations produced in the *Lis1/sLis1* model, suggesting a continuation of the lines of research that include the *Lis1/sLis1* model as a model of SZ.

Keywords: Lis1, schizophrenia, c-Fos, dentate gyrus, suprapyramidal, infrapyramidal

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Gen Lis1: Lisencefalia

El factor activador de plaquetas (PAF) acetilhidrolasa IB subunidad alfa es una enzima que en los humanos está codificada por el gen *PAFAH1B1*. La proteína es mencionada a menudo como LIS1. El complejo Lis1 es una enzima intracelular tetramérica que presenta dos subunidades catalíticas y un dímero regulador ⁽¹⁾, se encuentra en el cromosoma humano 17p.13.3 y consta de 11 exones con una región codificante de 1233 pb. El gen Lis1 codifica la subunidad no-catalítica de 45 KDa de la isoforma del activador de plaquetas (PAF) acetilhidrolasa-1 b (*PAFAH1B1*) una enzima que inactiva el PAF ⁽²⁾.

Es miembro de la familia de proteínas con secuencias conservadas de 40 aminoácidos que típicamente terminan con ácido triptófano-aspártico (proteína de repetición WD) y se sabe que está involucrada en varios procesos de interacción proteína-proteína ⁽³⁾. Lis1 interacciona de forma estrecha con proteínas motoras basadas en microtúbulos como la dineína y la tubulina, que está involucrado en la regulación de los microtúbulos. Lis1 está involucrado en la nucleocinesis citoplasmática mediada por dineína, translocación somática, motilidad celular, mitosis y segregación cromosómica. Esta proteína está conservada evolutivamente con una gran similitud entre ratones y humanos ⁽⁴⁾.

Estas interacciones reguladoras Lis1-dineína citoplasmática son clave para comprender las funciones celulares complejas desarrolladas por el gen, la interacción disminuye la velocidad promedio del motor molecular en los análisis in vitro y puede ser de gran importancia en los análisis in vivo (con mayor complejidad), ya que posee gran relevancia en el motor de alta carga, particularmente a nivel neuronal ^(5,6).

Lis1 está profundamente asociado con una alteración cerebral denominada lisencefalia tipo 1, caracterizada por una estratificación anormal de la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario, esta alteración está asociada con el síndrome Miller-Dieker, una grave malformación cortical cuyos pacientes presentan

una reducción en la circunvolución de los pliegues cerebrales. Algunos de los rasgos que definen este síndrome son microcefalia, una corteza cerebral más gruesa (10-20 mm) con mayor dispersión celular, un aumento del tamaño de los ventrículos (7), epilepsia, retraso mental y psicomotor, alteraciones cardíacas y renales, así como también una predisposición a desarrollar trastornos psicóticos como la esquizofrenia (SZ) si hablamos de fenotipos de menor gravedad (8-11).

Las alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) representan una minusvalía muy importante para los pacientes que las sufren, un 3% de los recién nacidos presenta algún tipo de malformación del SNC y dentro de este grupo un porcentaje mayor al 60% de estas alteraciones no son compatibles con la vida. De los trastornos de migración neuronal, la lisencefalia asociada al Síndrome de Miller-Dieker, tiene una incidencia de 11,7 casos por millón de neonatos pero la prevalencia de formas que representan una menor gravedad es desconocida (12).

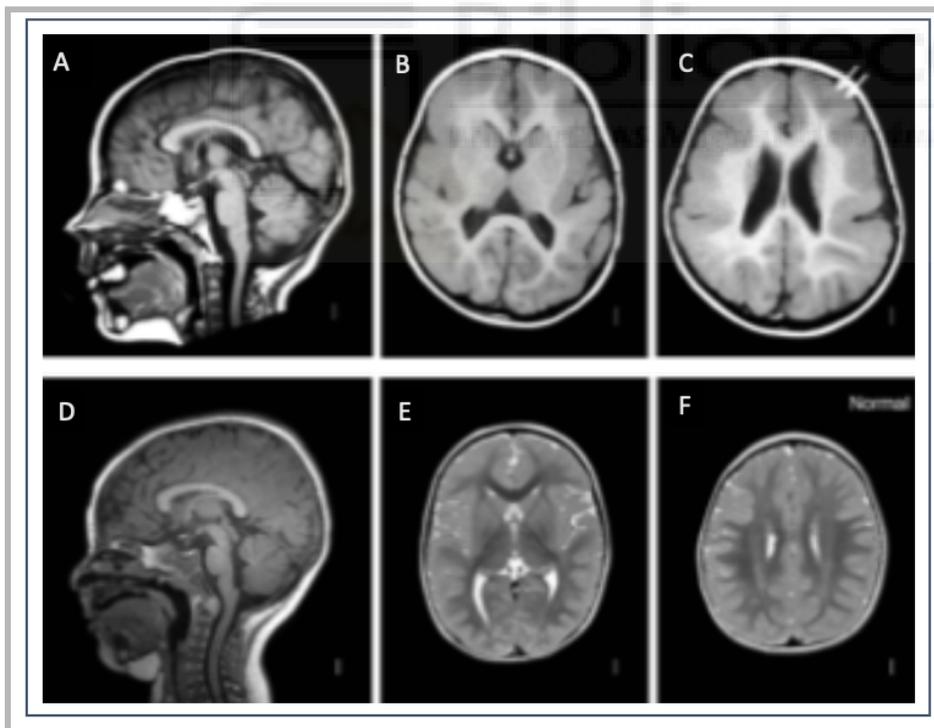


Figura 1. (A-C) Imágenes de resonancia magnética de un paciente con una malformación en forma de paquigiria provocada por lisencefalia y (D-F) un paciente normal de unos 18 meses de edad. Los patrones de giro indicados por las flechas indican anomalía en las circunvalaciones cerebrales (adaptado de Di Donato et al 2017) ⁽¹³⁾.

Lis1 fue el primer gen identificado con implicación en una enfermedad de la migración neuronal, se expresa de manera notable en la placa cortical durante la embriogénesis y en las etapas postnatales en el hipocampo, así como en diversas regiones cerebrales incluyendo el neocórtex y el cerebelo ⁽¹⁴⁾. En recientes estudios se ha corroborado la relevancia de las alteraciones funcionales relacionadas con Lis1 en la fisiopatología de la SZ y las enfermedades psiquiátricas relacionadas, observando mayores tendencias en la variación genética del complejo Lis1 en pacientes con SZ ⁽¹⁵⁾, aunque los mecanismos subyacentes todavía no se conocen en profundidad.

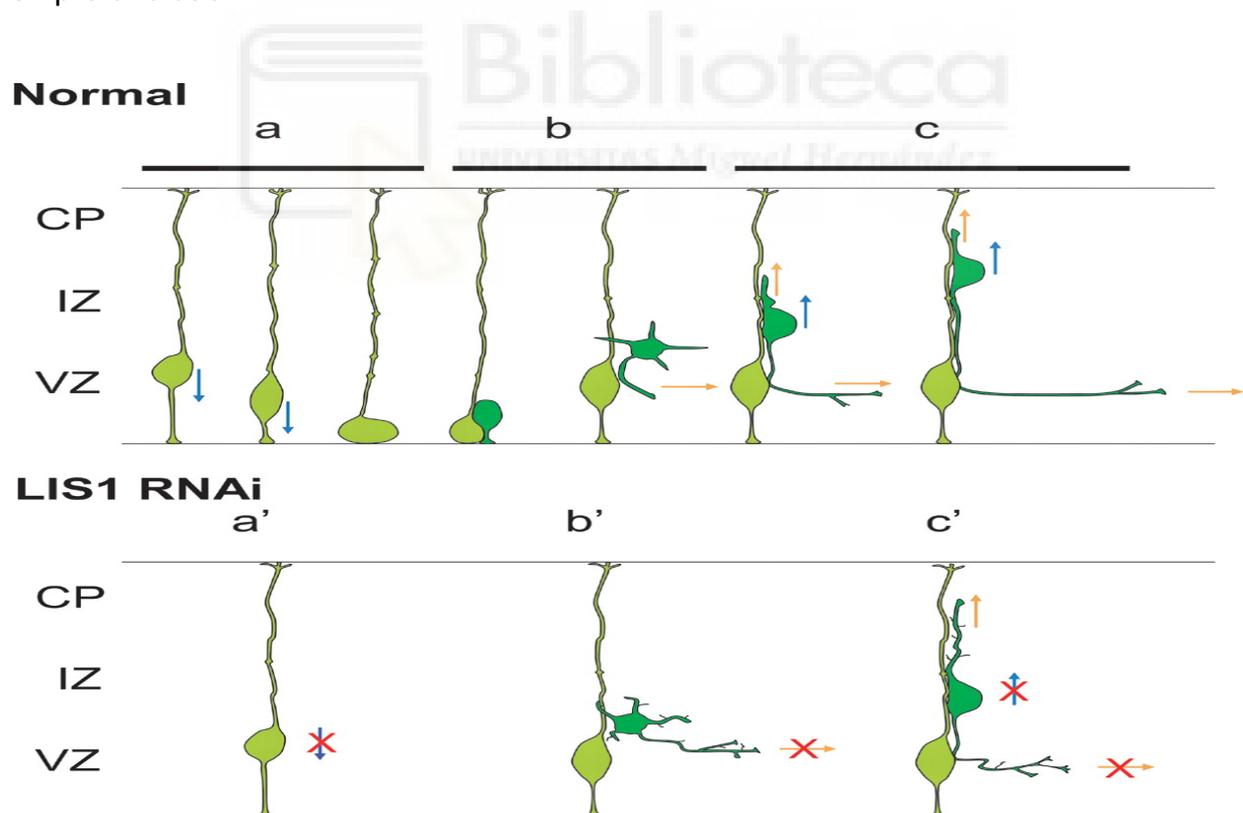


Figura 2. Patrón de migración radial en la corteza fetal normal y en ausencia de Lis1, donde el movimiento correcto de la glía radial y la división mitótica se inhibe ya que se retiene el soma en el área subventricular y evita que se desplace a las capas superiores. Las pocas células que logran alcanzar la zona intermedia tienen una morfología bipolar característica (c'), la interacción especialmente con dineína aumenta el tiempo entre el movimiento del centrómero y el núcleo provocando una migración neuronal más lenta (figura adaptada Valle RB, Tsai JW 2006) ⁽¹⁶⁾.

2.2 Esquizofrenia

La esquizofrenia (SZ) se presenta como un trastorno mental psicótico incapacitante que afecta al 1% de la población mundial. En los últimos años se han realizado avances que permiten una mayor comprensión de la fisiopatología de la SZ, progresos en imágenes cerebrales y genética molecular, así como una nueva generación de medicamentos para tratar esta patología, pero sigue siendo una enfermedad con grandes áreas todavía por comprender generando una gran carga para los pacientes que la sufren así como a sus familias y a la sociedad en general ⁽¹⁷⁾.

Los síntomas de la SZ se dividen en tres categorías; síntomas positivos, negativos y conductuales. Los síntomas positivos y negativos varían en intensidad con el tiempo y los pacientes pueden tener predominantemente un tipo u otro en un momento determinado, estos incluyen alucinaciones, delirios (que a menudo son paranoicos), déficits, incapacidad de atención, pérdida de sensación de placer, pérdida de voluntad o de impulso, la desorganización y el empobrecimiento de los pensamientos y el habla, todo ello pudiendo llevar a un profundo retraimiento social ⁽¹⁸⁾.

Los síntomas conductuales incluyen disfunción cognitiva, disminución de la capacidad para centrar la atención y deficiencias en el lenguaje verbal y no verbal a corto plazo, así como problemas en la memoria. Los síntomas generalmente comienzan en la adolescencia tardía o en la edad adulta temprana y generalmente continúan durante toda la vida ^(19,20).

Al considerar el curso clínico de la esquizofrenia, se ha notado que no hay patología degenerativa evidente, esto lleva a la hipótesis de que la enfermedad se desarrolla mucho antes de que aparezcan los síntomas clínicos, enfocándose en las etapas tempranas del desarrollo neuronal donde la migración celular y la correcta estructuración cerebral son fundamentales para la funcionalidad y conectividad cerebral adulta. Por tanto, resulta esencial estudiar las alteraciones tempranas en el desarrollo neuronal que puedan ser causantes de la esquizofrenia y cómo afectan a la estructura y función cerebral en la edad adulta ^(20,21).

La importancia del gen *LIS1* en la esquizofrenia parece residir en su acción sobre la migración neuronal y sus efectos sobre las interneuronas GABAérgicas. Como se ha mencionado la causa precisa de esta enfermedad sigue sin ser conocida en su totalidad, están involucrados tanto factores genéticos como ambientales y en los estudios realizados en cerebros humanos post mortem se ha demostrado que en pacientes con SZ existe una disminución de interneuronas parvalbúmina (PV) en la corteza prefrontal medial (mPFC) y una reducción de la enzima sintetizadora de GABA, la ácido glutámico descarboxilasa 67 (GAD67).

Además, se han observado cambios en otros subtipos de interneuronas GABAérgicas como son calbindina (CB), somatostatina, neuropéptido Y en la corteza prefrontal (PFC). Dado que la corteza prefrontal está relacionada con una variedad de funciones cognitivas, incluidos los procesos de atención, la memoria de trabajo, la flexibilidad en el comportamiento y la inhibición, se cree que los déficits en las interneuronas GABAérgicas en la PFC contribuyen a la interrupción de funciones cognitivas observadas en pacientes SZ ⁽²²⁾.

Todo ello puede estar relacionado con un fallo funcional de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) involucrados típicamente en la maduración de las interneuronas GABAérgicas ^(23,24).

Se han utilizado ampliamente modelos animales farmacológicos para imitar los cambios conductuales y neuropatológicos de la esquizofrenia. De hecho, los antagonistas de los receptores NMDA son el enfoque más utilizado para generar la sintomatología de la SZ en modelos de ratones. El uso de fármacos como la feniciclina (PCP), la cual genera por bloqueo de estos receptores síntomas

psicóticos similares a los de la SZ como hiperactividad neuronal o disfunción motora, entre otros ⁽²⁵⁾.

Además, se ha observado la inducción de la proteína c-Fos (marcador de actividad neuronal) por PCP en ciertas regiones del córtex cerebral y el hipocampo, (estas regiones se engloban dentro del sistema límbico). Esta inducción puede considerarse una relación potencial entre el aumento de c-Fos y los efectos psicóticos relacionados con los antagonistas de los receptores NMDA como la PCP ⁽²⁶⁾.

Además de estos modelos animales farmacológicos, un estudio reciente Garcia-López et al. (2021), propone que la alteración del gen *Lis1* podría causar anomalías corticales asociadas con la fisiopatología de la esquizofrenia. En estos estudios con ratones mutantes *Lis1/sLis1* observaron una reducción de la expresión de la enzima sintetizadora de GABA ácido glutámico descarboxilasa 67 (GAD67) en el hipocampo y el área cingulada anterior, así como una reducción de la expresión de células parvalbúminas en la corteza cingulada anterior en mutantes *Lis1/sLis1* en comparación con ratones control. Además observaron un aumento de la expresión de la proteína c-Fos (indicativa de actividad neuronal) en ratones *Lis1/sLis1* en las cortezas prefrontal medial (mPFC), perirrinal (PERI), entorrinal (ENT), ectorrinal (ECT) e hipocampo en comparación con ratones de control.

Esa relación implicaría que la mutación en el gen *Lis1* podría ser un factor predisponente para la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este estudio previo se utilizan en este trabajo como antesala y base del estudio experimental de la actividad neuronal del DG ⁽²⁷⁾.

2.3 El Giro Dentado

Por último en esta introducción, mencionaremos la región del hipocampo conocida como giro dentado (DG) que es el foco de atención del estudio experimental, centrándonos en la división del DG que crea un eje transversal y delimita dos láminas: la lámina supra-piramidal (DGsp) y la lámina infra-piramidal (DGip). Aunque ambas presentan un aspecto histológico similar, tienen diferencias en su estructura,

conectividad y proyección que pueden influir en la actividad de las células que las componen, por ello nos centraremos en evaluar las posibles diferencias entre estas dos láminas del DG y cómo pueden influir en la actividad neuronal.

2.3.1 Localización neuroanatómica y funcionalidad

El hipocampo es una estructura crucial para la memoria, el aprendizaje y la codificación espacial, además, es clave para la regulación emocional. Está formado por tres capas de células nerviosas y está dividido en varios subcampos; el cornu ammonis (CA) y el giro dentado (DG).

Se pueden diferenciar cuatro subregiones distintas, CA1, CA2, CA3 y DG. El CA principalmente está compuesto por células piramidales y el DG presenta variedad de tipos neuronales sin una predominancia clara de un tipo en particular ^(28,29).

El DG se encuentra justo en la entrada del hipocampo, corresponde a una banda aserrada de sustancia gris dentro del archicortex (la región más antigua filogenéticamente), se halla por debajo del borde medial del hipocampo y en su profundidad (29,30). Se extiende desde los núcleos septales rostralmente hasta la corteza temporal caudalmente y a este eje largo se le denomina eje septotemporal. El DG tiene una estructura en forma de "V" a medida que nos acercamos septalmente y en forma de "U" ventralmente. El eje perpendicular al septotemporal es llamado eje transversal. Si nos fijamos en la región CA3 del hipocampo podemos dividir el DG en dos láminas denominadas lámina infra-piramidal (DGip) (englobada por debajo de CA3) y lámina supra-piramidal (DGsp) (por encima de CA3) y la región que une ambas láminas denominada cresta y se encontraría justo en el vértice de la "V" o la "U". De este modo la láminas DGip y DGsp estarían separadas por el eje transversal (**Figura 3**).

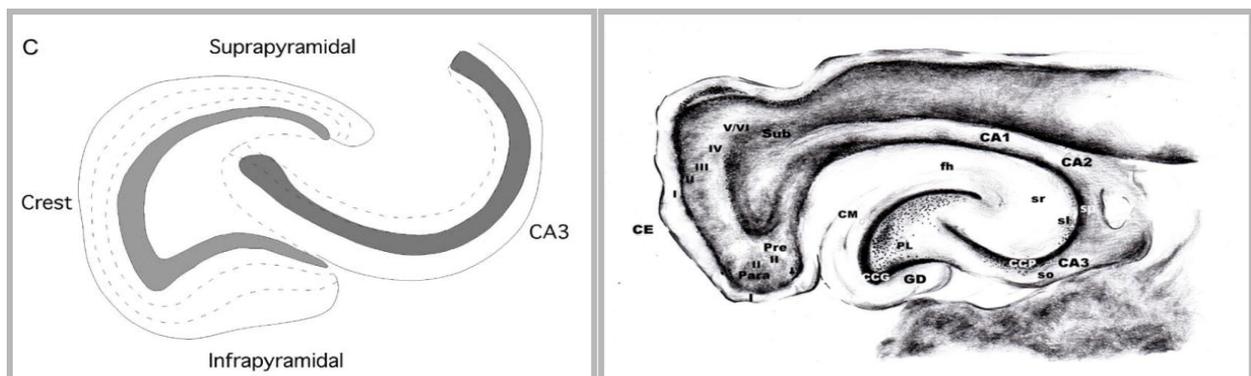


Figura 3. *La imagen de la izquierda es una representación esquemática del giro dentado en la que se muestra la posición de las láminas supra- e infra-piramidales así como de la cresta (región que une las dos hojas en el vértice) en la formación hipocámpica de la rata. La prolongación posterior y superior recibe el nombre de giro fasciolar y es el área de transición entre el DG y el indusium griseum. En la ilustración también se puede observar la región hipocámpica CA3. La imagen de la derecha es un dibujo lineal donde se puede ver la principal organización regional y laminar del DG. El DG se divide en varias capas; una capa molecular (ml), una capa granular (gcl), y una capa polimórfica (pl). La formación hipocámpica se divide a su vez en los subcampos CA1, CA2 y CA3 cada uno con sus diversos tipos celulares. Por último el resto del hipocampo se divide en el subículo (sub), presubículo (pre), parasubículo (para) y Corteza Entorrinal (EC). Las capas de las estructuras del hipocampo nombradas en último lugar se enumeran en números romanos. Imágenes adaptadas de Amaral et al. 2007 ⁽²⁹⁾.*

El DG actúa como una especie de preprocesador de la información entrante, preparando la información para su posterior procesamiento en la región CA3 del hipocampo, esto incluye convertir la entrada de la corteza entorrinal, que es relativamente poco específica en términos de campo espacial, en una actividad celular más específica hacia la región CA3. El DG produce un esquema de codificación muy escaso, en el que solo una pequeña fracción de neuronas está activa en cualquier momento dado.

El DG juega un papel esencial en la memoria, especialmente en la generación de recuerdos episódicos, que son aquellos recuerdos de eventos específicos que se generan en un momento o lugar determinados, también se cree que juega un papel en la memoria espacial, ayudando a las personas a navegar y a reconocer ambientes similares así como en la integración de emociones suscitadas por la experiencia.

En estudios con animales que habían sufrido lesiones en el DG se hallaron problemas de la memoria, además en personas con enfermedades como el Alzheimer y otras formas de demencia se observó una degeneración del DG con

problemas en la memoria y la orientación espacial, estos hallazgos nos indican que el DG es esencial en la integración y la recuperación de la memoria ⁽²⁹⁾.

En recientes descubrimientos en cuanto a la capacidad del DG en la neurogénesis adulta indica que esta posible adaptación evolutiva está involucrada en la función de separación de patrones, ya que la plasticidad le permite poder separar estímulos muy similares en estímulos menos semejantes con el fin de mejorar la capacidad de memoria episódica y espacial. El DG colabora en la integración, depósito y recuperación de memoria y actuaría en un papel de instructor “no supervisado” (ya que no recibe aferencias de hipocampo) ^(29,31,32).

2.3.2 Tipos celulares y conectividad

El DG posee 3 capas: La capa molecular compuesta principalmente por las dendritas de las células granulares dentadas, la capa de células granulares y la capa polimórfica en la que residen varios tipos celulares, aunque la más destacada es la célula musgosa.

La principal capa celular es la capa de células granulares, donde podemos encontrar este tipo de células, aunque no exclusivamente. A menudo se pueden hallar los cuerpos celulares de la célula en cesta piramidal dentada dentro de la capa celular limitando con la capa polimórfica. La capa granular se compone principalmente de células densamente empaquetadas, son una importante excepción dentro de las neuronas del SNC ya que conserva su capacidad de neurogénesis en la edad adulta, estas neuronas presentan un axón amielínico que genera las denominadas fibras musgosas cuyo enlace se halla exclusivamente en las células piramidales del hipocampo en CA3 y cuya inervación es la principal entrada de fibras musgosas en el hipocampo. En cuanto a sus dendritas apicales espinosas que forman un cono característico sus ramificaciones distales terminan en la fisura del hipocampo o en la superficie ventricular ⁽²⁹⁾.

Los diferentes tipos celulares así como sus conexiones dentro del DG y con el hipocampo se detallan a continuación brevemente.

Las principales células que componen el DG son; la célula granular dentada, la célula en cesta piramidal dentada y la célula musgosa, también podemos encontrar otros tipos de neuronas a menudo polimórficas como la célula hiliar (**Figura 4**).

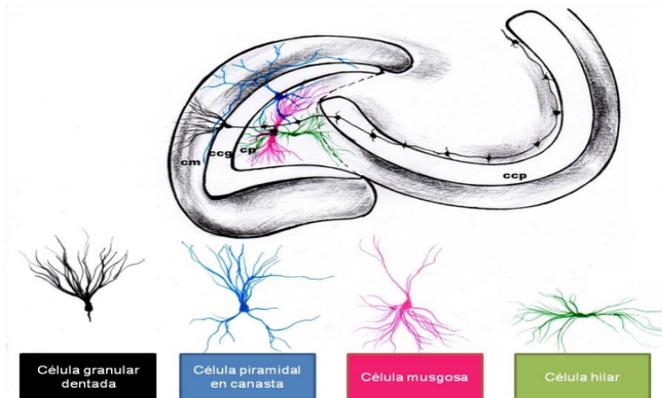


Figura 4. Ilustración esquemática de los tipos celulares presentes en el DG. Se puede observar en negro la célula granular dentada; las dendritas apicales se extienden a través de la capa de los granos para ramificarse extensamente en la capa molecular subgranular, dendritas basales típicamente inexistentes. Los axones de dichas células son las denominadas fibras musgosas y se extienden hasta llegar a la región CA3. En azul se puede observar la célula piramidal en cesta; interneurona inhibitoria GABAérgica más característica del DG. En magenta encontramos la célula musgosa con dendritas gruesas que se originan en el cuerpo celular y recorren grandes distancias a través de la capa polimórfica. Por último, en verde, se puede observar la célula hiliar, interneurona multipolar presente en el DG. Figura adaptada de Amaral 2007 ⁽²⁹⁾.

El DG tiene un marcado papel en la capacidad de memoria en el ser humano, ejerce de enlace entre la corteza entorrinal y el resto de la estructura hipocámpica, estos caminos de entrada de la información reciben el nombre de aferencias siendo la vía perforante la principal ruta de entrada al DG. Los enlaces con la corteza entorrinal son unidireccionales transmitiéndose la información hacia otras estructuras corticales como CA1 y CA3 que devolverán la información a la corteza entorrinal

cerrando así el círculo. Aunque el circuito clásico sería la transmisión de la información de la corteza entorrinal al DG y seguidamente al CA3 y CA1, las rutas de transmisión neuronal en las que está involucrado el DG presentan cierta complejidad en este circuito incluyendo proyecciones de la corteza entorrinal lateral (LEC) y la corteza entorrinal medial (MEC) directamente a CA3 y CA1 y retroproyecciones de CA3 a DG (**Figura 5**) ⁽³³⁾.

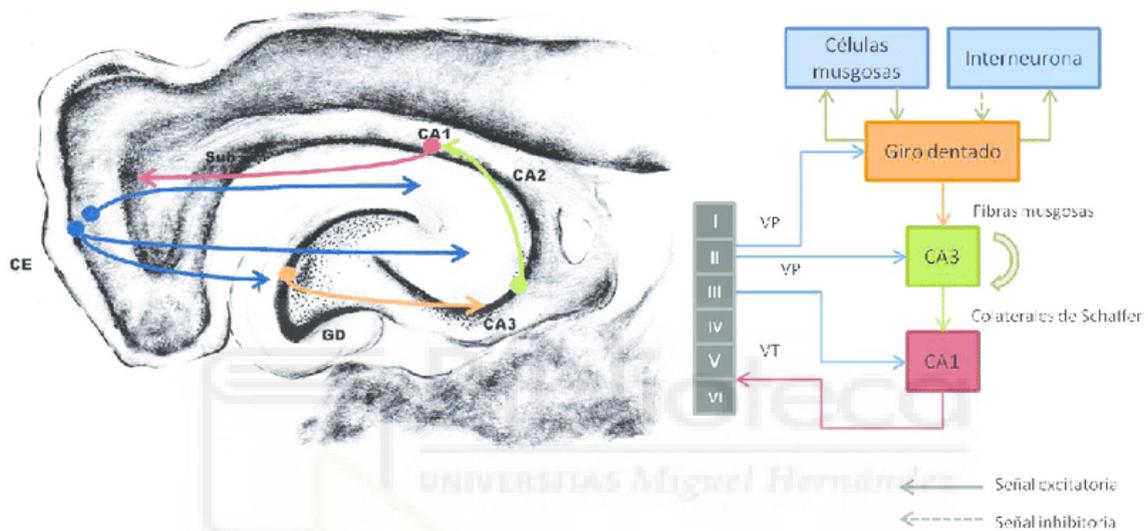


Figura 5. Esquema en el que se pueden observar los circuitos en el hipocampo adulto. Vía tradicional trisináptica excitatoria (CE-DG-CA3-CA1-CE) descrita por las flechas de colores: Líneas azules describen la vía perforante (VP), (Neuronas de la CE proyectan hacia el DG a través de la VP incluyendo la vía perforante lateral (VPL); Línea naranja vía de fibras musgosas (DG envía proyecciones a las células piramidales de CA3 a través de las fibras musgosas); Línea verde colaterales de Schaffer (Las neuronas piramidales de CA3 descargan la información a las neuronas piramidales de CA1 a través de los colaterales de Schaffer); Línea roja describe las proyecciones de CA a CE. Además, CA3 recibe proyecciones directas de la capa II de la corteza entorrinal (VP), CA1 recibe información directamente desde la capa III de la CE (Vía temporoammonica), y a su vez las células del DG proyectan a las células musgosas del hilus e interneuronas hilares que envían proyecciones

excitatorias e inhibitorias respectivamente, hacia las neuronas granulares. Abreviaturas: CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; VP: Vía perforante. Figura adaptada Amaral et al. 2007 ⁽²⁹⁾.

2.3.3 Diferencias entre las láminas DGsp y DGip

Pese a que clásicamente la región del DG se consideraba una estructura homogénea, estudios en los que se ha observado el DG dividiéndolo a través del eje transversal han demostrado que existen diferencias entre estas dos láminas del DG desde la génesis embrionaria, incluyendo diferencias a nivel morfológico, celular, de proliferación y de conectividad y función que podrían explicar los mecanismos involucrados en las funciones de generación de recuerdos, la memoria episódica y espacial, así como su implicación en los trastornos neurológicos.

A nivel anatómico diversos estudios han demostrado que la cantidad de ciertos tipos celulares así como su inervación en el DG es dispar entre ambas láminas;

Amaral et al. (2007) observó que las células Parvalbúmina positivas (PV+) del hilio se presentan en diferente proporción con respecto a las células granulares entre las láminas DGsp y DGip, dichas neuronas GABAérgicas PV+ inervan las células granulares por medio de su axón, inhibiéndolas ^(29,34). Por otra parte, la proporción de células granulares con respecto a las células en cesta piramidal es sensiblemente mayor en la hoja infra-piramidal tanto en la región ventral como en la dorsal de DGsp, en el caso de las interneuronas calretinina positivas (CR+) también se presentan en mayor proporción en la hoja supra-piramidal ⁽³⁵⁾.

Las células granulares actúan como integradores de la información aferente y es necesario tener en cuenta sus características fisiológicas para evaluar su papel en la codificación y el procesamiento de la información ⁽³⁶⁾.

Cabe destacar que en diversos estudios en los que se ha observado la inervación GABAérgica y los árboles dendríticos se ha comprobado una mayor red de espinas dendríticas con aumento de su cantidad y longitud en la lámina supra-piramidal, así como del número de neuronas inhibitorias eferentes hacia las células granulares de dicha lámina (**Figura 6**) ⁽³⁷⁾.

Las células granulares reciben casi la totalidad de impulsos excitatorios a través de esos árboles dendríticos, por consiguiente, su número y longitud indican el número aproximado de sinapsis excitatorias de todas las fuentes y las características de dichas conexiones en estas neuronas. Actúan como integradoras de la información aferente y es necesario tener en cuenta sus características fisiológicas para evaluar su papel en la codificación y el procesamiento de la información.

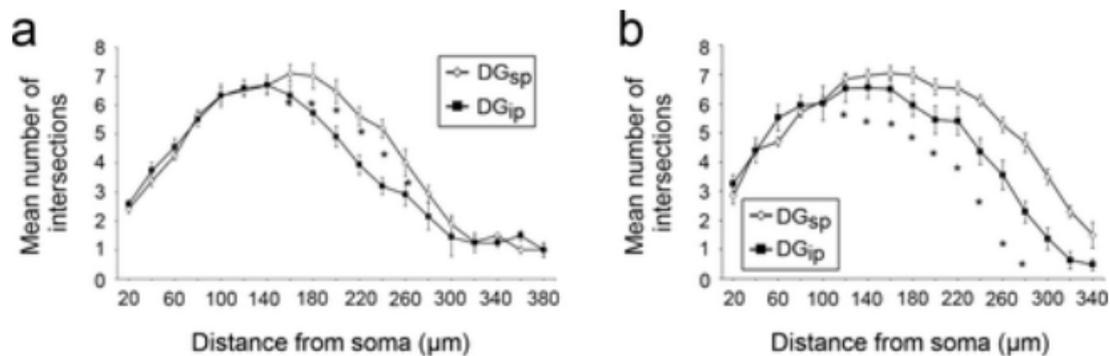


Figura 6. Ambas imágenes muestran la cuantificación de células granulares en la DG de ratas (a) y ratones (b). Se observa un aumento en el material dendrítico en DGsp en relación con el DGip en el MML (es decir, el tercio medio) de ratas y ratones, y también en el OML (el tercio externo) de ratones. Figura adaptada de Gallitano et al, 2016 ⁽³⁸⁾.

En cuanto a la proliferación en ambas regiones del DG; Angevine (1965) demostró que la estructuración y maduración de las células granulares comienza en la lámina DGsp para después continuar en DGip, estableciendo de este modo un gradiente morfogénico de DGsp a DGip, esto indica que la neurogénesis podría ser más activa en la región DGsp, principalmente en la edad temprana y adolescencia, generando un rendimiento cognitivo mayor en esta región en animales jóvenes ⁽³⁹⁾, las células apoptóticas también se encuentran mayoritariamente en DGsp y se ha demostrado que exposiciones al estrés crónico producen una menor supervivencia de las células neuronales nacidas en edad adulta así como una disminución de las neuronas granulares proliferantes en la lámina supra-piramidal ⁽⁴⁰⁾.

Otros estudios no dejan claro estos resultados e incluso presentan resultados opuestos describiendo una mayor proliferación celular y supervivencia en el DGip

generando contradicciones que invitan a un estudio más exhaustivo de las características de las láminas DGsp y DGip, muchos de estos estudios se centran en la división dorsolateral del DG no haciendo hincapié en la división transversal del DG ⁽⁴¹⁾.

Ribak y Peterson (1991) demostraron que las neuronas inhibitorias del DGsp están más densamente invadas por fibras musgosas en comparación con las invaciones del DGip, además dichas fibras musgosas recorren rutas diferentes a través de los estratos del DG, en el DGsp estas fibras atraviesan directamente el estrato radiado llegando a la parte distal del estrato lúcido, por su parte las fibras musgosas que parten del DGip atraviesan el hilio y entran en contacto con CA3, estas invaciones se han visto en estudios con ratas ^(42,43).

En cuanto a las aferencias del DG, aunque ambas láminas reciben impulsos de varias regiones subcorticales, incluido el núcleo septal, supramamilar, locus coeruleus y el núcleo de rafe, el DGsp recibe el doble de aferencias del núcleo supramamilar ⁽⁴⁴⁾, en estudios realizados en ratones y ratas en estas regiones del DG se ha visto que las proyecciones entorrinales activan más rápidamente DGsp en respuesta a un estímulo, esto se ha visto también en estudios con marcadores de activación génica temprana inmediata (IEG) (como Arc y zif268), estos genes se activan como respuesta a diversos estímulos neuronales y se relacionan con el procesamiento de la información y la plasticidad sináptica, en estos experimentos se observó que las células del DGsp tenían una mayor actividad que las del DGip ⁽³²⁾.

Se cree que existe un mecanismo recurrente que permite competir entre ambas láminas en respuesta a la estimulación aunque las aferencias comparando ambos animales presentan diferencias significativas, mostrando una mayor actividad en el ratón no solo en las tareas espaciales sino también durante las tareas no espaciales dependientes del hipocampo.

El papel que desempeña el DG en la separación de patrones hace que el registro de la actividad neuronal que lo componen sea un desafío, gracias al uso de marcadores

IEG se puede desgranar esa actividad y por consiguiente como se distribuye el procesamiento intrínseco de la información ⁽³²⁾.

En los experimentos en los que se analizó la expresión de los genes IEG (zif268 y Arc) en ratas y en los que se les expuso a entornos diferentes, tanto espaciales como locales, se observaron que la expresión de estos genes en las células granulares era similar independientemente del entorno al que estuvieron expuestas, además presentaron niveles similares entre ambos genes en la lámina DGip, es de suponer al evaluar estos resultados que las diferencias en la actividad neuronal de las regiones del DG se deben a una actividad neuronal general y no exclusivamente a un IEG exclusivo ⁽⁴⁵⁾.

En el estudio de las diferencias entre DGsp y DGip en la actividad celular, este trabajo se centra en la expresión del proto-oncogen c-Fos y la implicación de la actividad asimétrica de las láminas del DG en las enfermedades neuronales, por lo que seguidamente se van a detallar los hallazgos correspondientes a este marcador celular

Se han observado diferencias en la expresión de c-Fos entre las láminas en la exposición de modelos de ratón al estrés, observándose un aumento de células c-Fos+ en la lámina DGsp y una disminución de las mismas en DGip ⁽⁴⁶⁾. En consonancia con estos resultados, las pruebas de laberinto espacial realizadas por Snyder et al (2009) se descubrió una mayor densidad de neuronas positivas c-Fos en DGsp en comparación con DGip. La región DGsp recibe un mayor número de aferencias desde la corteza entorrinal medial, la cual, transporta la información espacial hacia el DG y concuerda con los resultados obtenidos en dichos experimentos y es de esperar que se active la región del DGsp primordialmente ante ciertos estímulos.

Las heterogeneidades descritas en este apartado se podrían traducir en diferencias en los perfiles de plasticidad en las conexiones neuronales, estas alteraciones sinápticas que se producen desde la maduración embrionaria y continuando con la neurogénesis adulta podrían alterar de forma concomitante y diferencial las propiedades neuronales intrínsecas ⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾, participando en los procesos de memoria

en los que está implicado el DG: mediando en el reclutamiento de células específicas en la formación de la memoria y en la eficacia de la recuperación de la memoria así como facilitando la separación de patrones ^(50,51).

Por último en este apartado de diferencias entre las láminas del DG se van a mencionar las relaciones entre la actividad neuronal de dichas láminas y la exposición al estrés, así como algunas diferencias encontradas frente a exposiciones farmacológicas extraídas de diversos artículos.

Como se ha mencionado anteriormente se han encontrado perfiles de supervivencia distintos entre las células del DGsp y DGip. Dichos estudios mostraron una disminución general en la generación de células neurales nacidas en adultos tras la exposición de los modelos al estrés así como, más específicamente, en la supervivencia de las neuronas nacidas en adultos en DGsp, el estrés crónico se dirige a la neurogénesis del adulto preferentemente en DGsp de la rata, afectando a la distribución de las células progenitoras en proliferación en estas subregiones del DG ⁽⁵²⁾.

Los diversos microambientes de ambas subregiones podrían favorecer la supervivencia de las células adultas del DGsp frente a DGip. La proliferación celular observada parecía similar en todas las regiones pero impactó de forma notable la supervivencia de células nacidas en adultos del DGsp. Estos resultados están en consonancia con hallazgos previos en la activación de c-Fos de las neuronas granulares del DGsp después del estrés de restricción ⁽⁴⁶⁾.

En contraste con el patrón de actividad impulsado por DGsp, la activación de DGip parece estar más relacionada con diversas patologías

Scharfman et al. (2002) reveló diferencias después del estado epiléptico y convulsiones recurrentes, en un modelo de estado epiléptico inducido por pilocarpina, se observó que las convulsiones provocaron respuestas debido a la estimulación mayores en DGip, en relación a DGsp. Los estímulos podían provocar descargas explosivas en las células granulares de DGip pero no aparecían en DGsp, esto sugirió una mayores excitabilidad de las neuronas del GDip en respuestas a descargas eléctricas por convulsiones recurrentes ⁽⁵³⁾.

En otros modelos de epilepsia se utilizó el ácido kaínico, se realizó una estimulación eléctrica de baja intensidad en el DGip y provocando también un episodio epileptico de latencia corta en células del DGsp, pero sin respuesta en las ratas no epilépticas (no tratadas con ácido kaínico). Estos estudios confirman que el DGsp de las ratas epilépticas es más excitable que el de las ratas control, las situaciones de estrés y de epilepsia afectan de forma diferencial a las capas DGsp y DGip. El estrés afecta a la proliferación y supervivencia de las células del DGsp, estas células son actividades preferencialmente y ello produce déficits en la codificación de recuerdos y relaciones sociales afectando también a la excitabilidad de las células granulares de la capa DGsp ^(54,55).

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Un estudio reciente de Garcia-López et al. (2021) en el que se analizó cómo el gen *Lis1* podría causar déficits asociados con la fisiopatología de la esquizofrenia utilizando el modelo murino *Lis1/sLis1*, que implica la eliminación del primer exón codificante del gen *Lis1* observaron una disminución de las subpoblaciones GABAérgicas en el hipocampo y en el cíngulo anterior (ACA) en ratones mutantes *Lis1/sLis1* en comparación con ratones control. Se analizó la inmunohistoquímica de la proteína c-Fos para evaluar la actividad neuronal en diferentes áreas del cerebro hallándose un mayor número de células positivas para c-Fos en en mPFC, hipocampo y otras áreas corticales en ratones mutantes *Lis1/sLis1* que habían sido expuestos a los mismos estímulos ambientales que los animales control ⁽²⁷⁾.

Estos resultados indican que las variaciones genéticas del gen *Lis1* podrían causar cambios asociados a ciertos endofenotipos de la SZ.

Los resultados obtenidos en estos análisis comparan de forma exhaustiva diversos mecanismos subyacentes a la SZ relacionados con el modelo murino mutante *Lis/sLis1*, por contraste y con el fin de no abarcar un área de conocimiento tan extensa y cuyo análisis superaría ampliamente la longitud de este trabajo nos centraremos únicamente en la expresión de c-Fos en la región cortical DG y sus láminas DGsp y DGip.

En el trabajo de Garcia-López et al. (2021) se observaron un aumento significativo de las células c-Fos+ en la capa de células granulares del DG y en la capa de células piramidales de CA1-CA3, también se observó un patrón de expresión de c-Fos diferente entre las dos láminas del DG en ratones control en contraste con los ratones mutantes *Lis1/sLis1*.

Dicho estudio sugiere que la alteración de la expresión de c-Fos en las células granulares del DG podría interrumpir los patrones de actividad en los circuitos del DG y, posteriormente provocar alteraciones cognitivas debido a las diferencias de excitabilidad dependientes de la lámina DGsp del DG.

En base a estos nuevos hallazgos y teniendo en cuenta que el aumento de células c-Fos+ ha sido observado en cerebros postmortem de pacientes esquizofrénicos y en modelos murinos con fenotipos similares a la SZ^(56,57), se planteó el análisis de la expresión de c-Fos en las láminas DGsp y DGip del DG en ratones control WT y mutantes *Lis1/sLis1*.

Este estudio y los estudios previos realizados en ratones en colaboración con el instituto de investigación sanitaria de la Universitat de València, liderado por el Dr. Rafael Tabarés Seisdedos y los hallazgos obtenidos son una pieza clave para conocer mejor las enfermedades neurológicas y los factores implicados en la predisposición a desarrollarlas con el fin de anticipar en la medida de lo posible la prevención de las mismas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales

La cepa de *Lis1/sLis1* se mantuvo en fondo genético ICR. La totalidad de los ensayos que se realizaron en el laboratorio con animales de experimentación se realizaron conforme a las leyes españolas y de la unión europea sobre el cuidado en animales de experimentación (Directiva del Consejo 86/609/CEE) y aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la universidad Miguel Hernández de Elche.

Se realizó la preparación de cerebros adultos (P60) anestesiando a los ratones con isoflurano (Zoetis, Reino Unido) que inmediatamente después, fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo del corazón con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y seguidamente se les inyectó paraformaldehído (PFA) al 4 % en solución tamponada con fosfato 0,1 M, solución salina (PBS, pH 7,4). A continuación, se procedió a la extracción de los cerebros y se post fijaron durante la noche a 4 ° C en el mismo fijador.

Durante esta fase del experimento mis funciones se redujeron a la observación de los procedimientos ya que no poseo la cualificación para manejar los animales de experimentación.

4.2 Tinción inmunohistoquímica

Los animales se procesaron para tinción inmunohistoquímica para analizar el número de neuronas que expresan c-Fos en el hipocampo.

Los cerebros se crioprotegieron sumergiendolos en soluciones de sacarosa de concentración ascendente: 10%, 20% y 30% a 4°C en PBS. A continuación, los cerebros se congelaron y se cortaron secciones coronales de 40µm de espesor mediante el uso de un criostato (HM525, Microm/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Los cortes se incubaron con peróxido de hidrógeno al 0.09% durante 30 minutos y luego se lavaron con una solución tampón de fosfato que contenía Tritón X-100 al 0.075% (PBT). Seguidamente, se incubó el tejido con suero de cabra (10%) durante 1 hora para evitar la unión inespecífica al antígeno. Posteriormente, se incubaron las secciones durante una noche a 4°C con el anticuerpo primarios diluidos en EnVision FLEX Antibody Diluent (anti-cFOS rabbit polyclonal IgG 1:400; Calbiochem). Al día siguiente, las secciones se lavaron con PBT y se incubaron con el anticuerpo secundario (goat anti-rabbit IgG 1:300; BA-9200/Vector) durante una hora. Tras varios lavados con PBT, las secciones se incubaron con Avidin-Biotin Complex durante 1 hora. Esto se hizo para mejorar la detección del antígeno específico y aumentar la señal. Posteriormente, se realizó una tinción colorimétrica

utilizando 3,39-diaminobencidina al 1%, sulfato de níquel y amonio al 0.025% hexahidratado y H₂O₂ al 0.0018% en PBS.

Por último las secciones fueron deshidratadas y montadas con Eukitt para ponerles el cubreobjetos.

4.3 Microscopía y Análisis Estadístico

Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio óptico (Leica CTR 6000), dichas imágenes fueron el objeto de estudio para la realización de los recuentos de células inmunopositivas. Para cuantificar el número de células, se contaron cuatro secciones por animal y se utilizó el software Image-J para el conteo de células. El dato utilizado para el análisis estadístico fue la media de las cuatro secciones contadas.

Nos enfocamos en la región del hipocampo, en concreto el DG, en los hemisferios derecho e izquierdo utilizando al menos cuatro secciones diferentes de cada hemisferio. Para identificar la región, se utilizó el Allen Brain Atlas como guía. En cada sección se contó el número de células inmunopositivas dentro de un área específica. El promedio de estos valores en las diferentes secciones de cada cerebro fue lo que se utilizó para el análisis estadístico. En todos los casos, los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (SE). Las diferencias estadísticas entre *los ratones Lis1/sLis1* y los compañeros de camada de control se determinaron usando la *prueba t* de Student. Cuando los datos no pasaron el test de igualdad de la varianza o el test de normalidad, se usó la prueba no paramétrica Mann-Whiney. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software Sigma Plot. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los niveles de significación se establecieron en: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

5. RESULTADOS

5.1 Expresión c-Fos en *Lis1/sLis1* en comparación con control

Realizamos un estudio para evaluar el número de neuronas activas en el giro dentado (DG) de ratones mutantes *Lis1/sLis1* y control, expuestos a los mismos estímulos ambientales.

Las proteínas codificadas por genes de expresión inmediata temprana, como c-Fos, se consideran marcadores de la actividad neuronal en la región del sistema nervioso central, por lo tanto, el uso de la inmunohistoquímica de c-Fos permite identificar y marcar las neuronas que han sido activadas polisinápticamente en una determinada región del sistema nervioso y mapear las vías funcionales en esa área ⁽⁵⁸⁾.

Para llevar a cabo este estudio, se contaron las células positivas para c-Fos en el DG de ratones jóvenes adultos (P60) utilizando el software Image-J. Se analizaron ocho hemisferios cerebrales, cuatro de ratones control y cuatro de ratones mutantes, y se analizaron cuatro secciones del DG para cada hemisferio. Cuantificamos el número total de células c-Fos+ en la capa granular del DG y encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los ratones mutantes y los control en cuanto al número de células que expresan c-Fos (**Figura 7**).

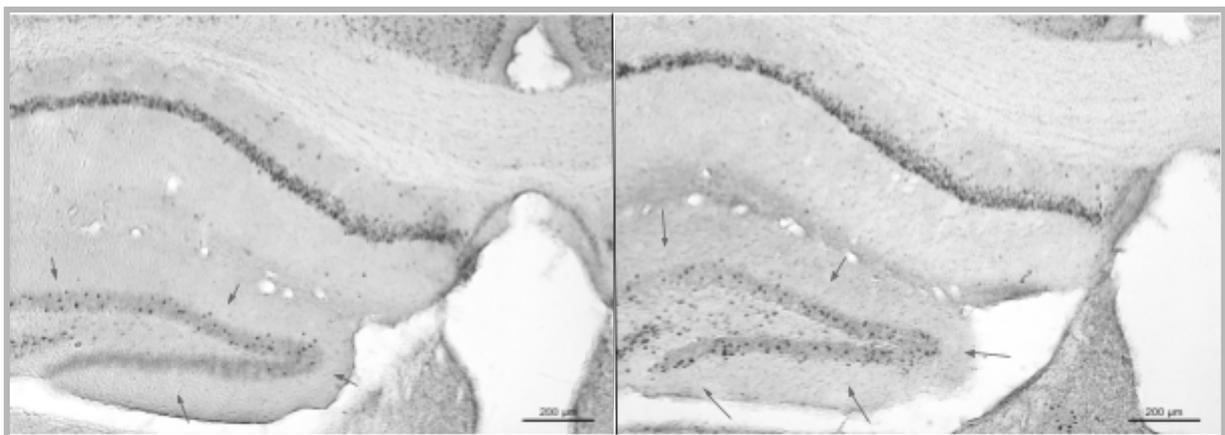


Figura 7. La imagen de la izquierda corresponde a la inmunohistoquímica contra c-Fos en el DG de un caso control, mientras que la imagen de la derecha al DG de un caso mutante *Lis1/sLis1*. La región del giro dentado se puede ver en la figura

delimitada por flechas, donde se observan diferencias en la expresión de la proteína c-Fos entre el caso control y el mutante.

Los resultados del estudio mostraron que había un mayor número de células c-Fos+ en el giro dentado (DG) de los ratones mutantes *Lis1/sLis1* en comparación con el grupo control (**Figura 8**).

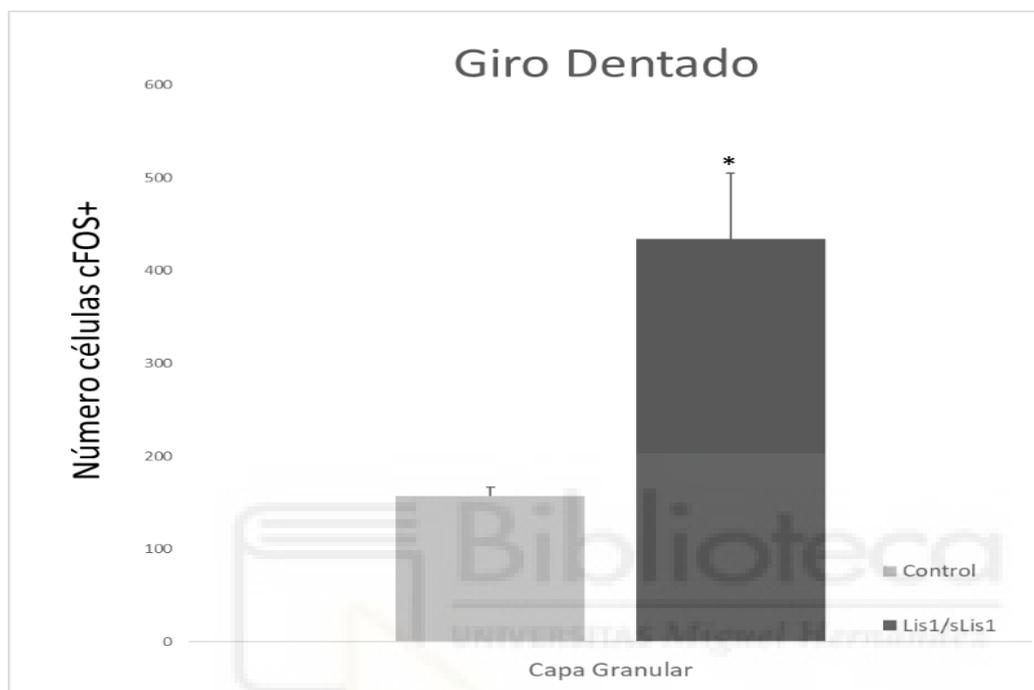


Figura 8. Estudio de proliferación de c-Fos en el giro dentado en ratones control y mutantes *Lis1/sLis1* en P60. Gráfico de barras que muestra el número promedio \pm SE cuantificado en diferentes secciones de los casos estudiados. La diferencia en el número de células c-Fos+ en el DG de ratones control y mutantes es estadísticamente significativa ($n=4$ para cada grupo; promedio de células c-Fos+ en el DG \pm SE: **controles**; $156,75 \pm 9,63$; ***Lis1/sLis1***; $434,25 \pm 70,78$). Un asterisco (*) indica un resultado de $p < 0,05$.

Los ratones mutantes mostraron un mayor número de células expresando c-Fos en la capa granular del DG, mostrando así una mayor actividad neuronal.

5.2 Expresión de c-Fos entre las láminas DGsp y DGip

Posteriormente al resultado positivo del análisis previo, llevamos a cabo un análisis cuantitativo para evaluar si existían diferencias en el número de células que expresan c-Fos entre las láminas DGsp y DGip del DG. Siguiendo el eje transversal desde la región de CA3 hasta el vértice de la capa granular del DG, dividimos dicha capa en la lámina infra-piramidal (DGip), englobada por debajo de CA3, y lámina supra-piramidal (DGsp), por encima de CA3 (**Figura 9**).

Realizamos el recuento de ambas zonas por separado para comparar el número de células c-Fos+ presentes en cada una de ellas. Con este análisis, determinamos si había diferencias en la actividad neuronal entre las dos láminas del DG.

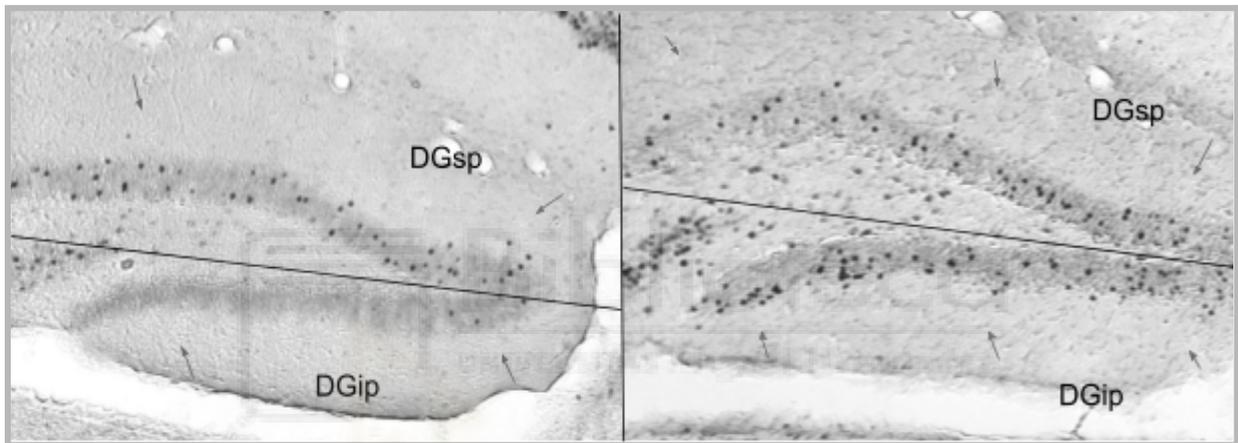


Figura 9. La imagen de la izquierda corresponde a una inmunohistoquímica contra c-Fos en el DG de un caso control y la imagen de la derecha corresponde a un caso mutante *Lis1/sLis1*. En ambas fotografías se pueden observar las láminas supra-piramidal (DGsp) e infra-piramidal (DGip) separadas por una línea transversal.

Los resultados del estudio revelaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo mutante *Lis1/sLis1* en la expresión de c-Fos en las láminas del giro dentado. En concreto, se observó un aumento en el número de las células que expresan c-Fos en el mutante *Lis1/sLis1* en comparación con el control tanto en la lámina supra-piramidal como en la lámina infra-piramidal. Además, los datos sugieren un mayor aumento de la expresión de c-Fos en la lámina infra-piramidal del mutante *Lis1/sLis1*. Estos hallazgos indican que hay diferencias en la actividad

neuronal entre el grupo control y el mutante Lis1/sLis1 en ambas láminas del giro dentado, siendo más evidentes en la lámina infra-piramidal (**Figura 10**).

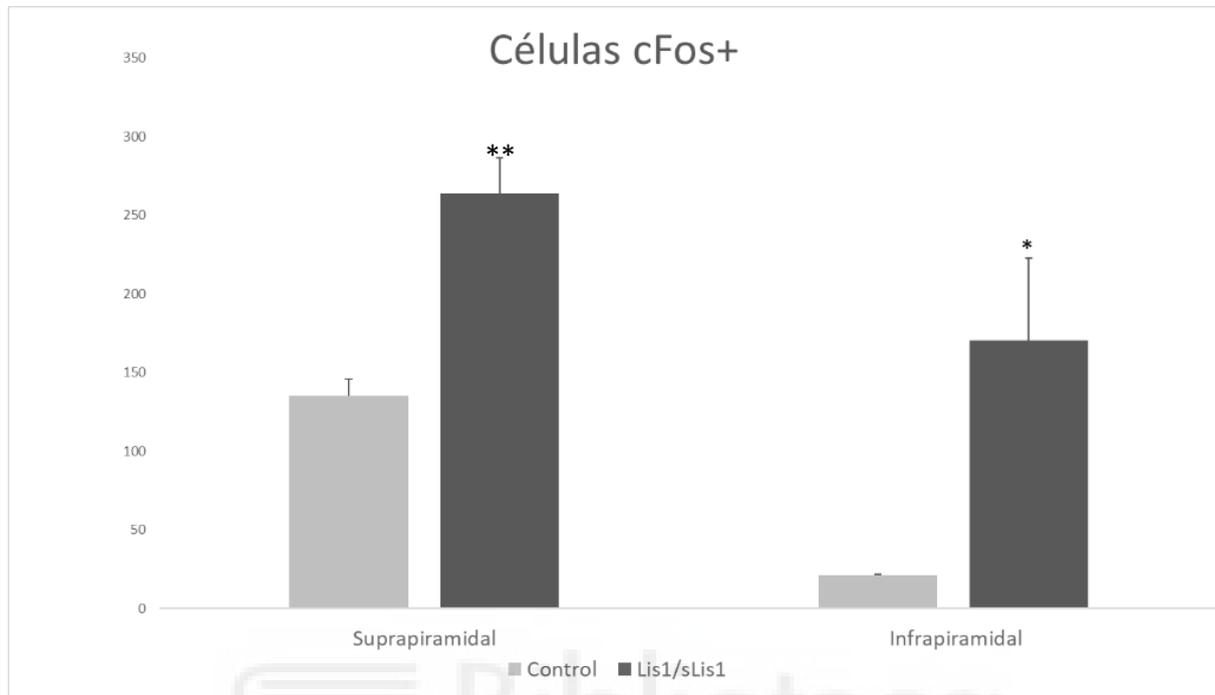


Figura 10. Estudio de proliferación de la proteína c-Fos en ratones control y mutantes Lis1/sLis1 en P60. Gráfico de barras que muestra el número promedio \pm SE de células c-Fos+ cuantificado en diferentes secciones de los dos casos estudiados: control y mutante. Las diferencias son estadísticamente significativas en la lámina suprapiramidal e infrapiramidal ($n=4$ para cada grupo; promedio de células C-Fos+ en la lámina DGsp del DG \pm SE: **controles**; 135.5 ± 10.20 ; **Lis1/sLis1**; $263,75 \pm 22.64$; promedio de células c-Fos+ en la lámina DGip del DG \pm SE: **controles**; 21.25 ± 0.63 , **Lis1/sLis1**; 170.5 ± 52.31). Un asterisco (*) indica un resultado de $p < 0,05$ y dos asteriscos indican un resultado de la prueba $p < 0,01$.

5.3 Porcentaje de incremento de la expresión de c-Fos entre las láminas DGsp y DGip de ratones control y Lis1/sLis1.

El experimento anterior mostró un aumento en el número de células c-Fos+ en el mutante *Lis1/sLis1* en las dos capas de DG. Sin embargo, el análisis en el microscopio de las secciones inmunoteñidas para c-Fos también sugería que dicho aumento era mayor en la lámina DGip en el mutante *Lis1/sLis1*. Para cuantificar esta observación analizamos el porcentaje de incremento en cada una de las capas en el mutante *Lis1/sLis1* y las comparamos entre ellas. El porcentaje de incremento de c-Fos resultó ser mucho mayor en la lámina DGip siendo un poco más del 700% mientras que el incremento en la lámina DGsp resultó ser cerca del 100%. (**Figura 11**).

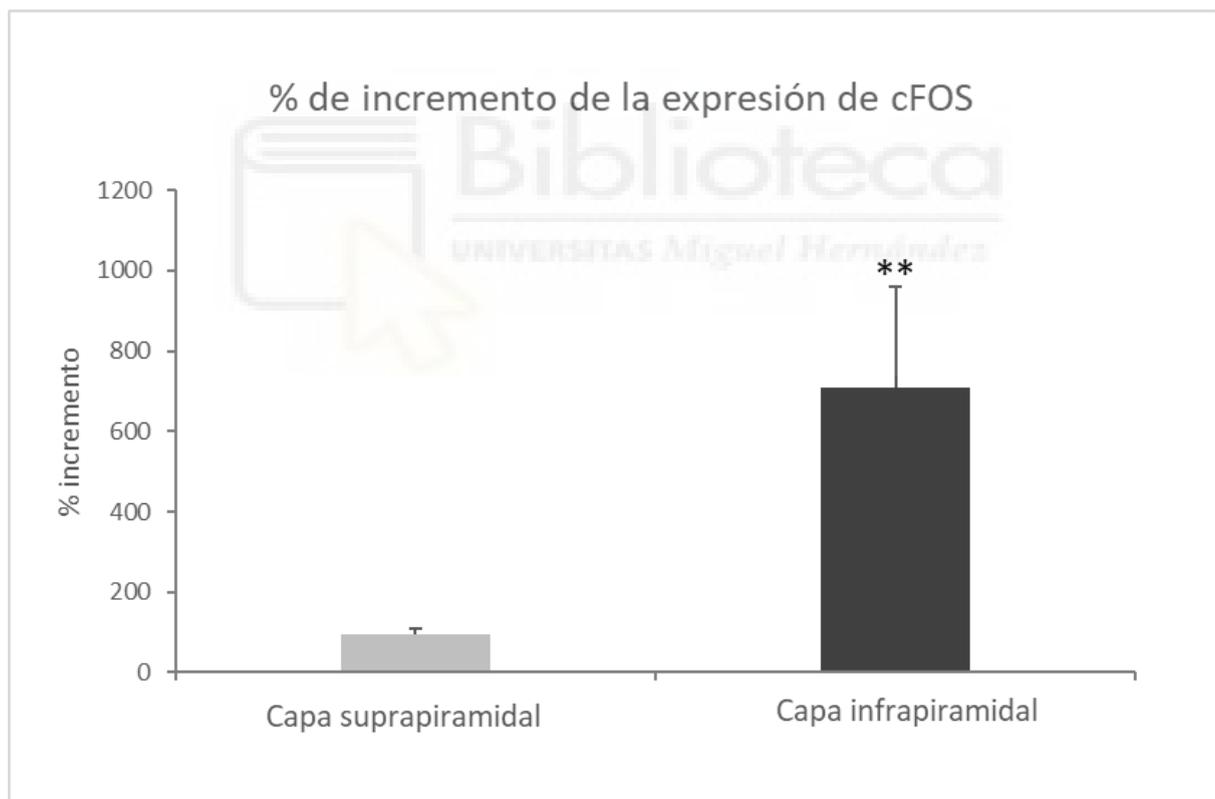


Figura 11. Estudio del porcentaje de incremento de la expresión de la proteína c-Fos entre las láminas DGsp y DGip del DG. Gráfico de barras que muestra el número promedio \pm SE de células c-Fos+ cuantificado en diferentes secciones de los dos

casos estudiados: control y mutante. La capa infrapiramidal mostró un aumento estadísticamente significativo mayor que la capa suprapiramidal ($n=4$ para cada grupo; % de incremento de c-Fos en **DGsp** comparando ratones control con ratones *Lis1/sLis1*: $95,74 \pm 13,87$; % de incremento de c-Fos en **DGip** comparando ratones control con ratones *Lis1/sLis1*: $708,22 \pm 251,36$. Un asterisco (*) indica un resultado de $p < 0,05$ y dos asteriscos indican un resultado de la prueba $p < 0,01$.

El análisis estadístico confirmó que este aumento de células expresando c-Fos era significativamente mayor en DGip comparado con DGsp. Estos resultados indican que existe una mayor alteración de la actividad neuronal en DGip que en DGsp en los ratones mutantes *Lis1/sLis1* aunque en ambas láminas hay un aumento de la actividad neuronal.

6. DISCUSIÓN

A partir de la década de 1990 la proteína c-Fos ha sido utilizada como marcador de actividad transcripcional, así mismo, utilizando la inmunohistoquímica de c-Fos podemos obtener el marcaje de neuronas estimuladas ⁽⁵⁸⁾.

Estudios previos usando modelos de ratón farmacológicos para el estudio de la SZ, se demostró que la fenciclidina (PCP) y algunos fármacos que presentaban relación con esta aumentaron los niveles de expresión de c-Fos en la región del hipocampo, así como en otras áreas corticales (59,60). Estos estudios mostraron que la inducción de la expresión de c-Fos ocurría en interneuronas GAD67+, específicamente en el hipocampo, en la corteza retrosplenial, amígdala y corteza somatosensorial.

Recientes estudios realizados con el mutante de ratón *Lis1/sLis1*, García-López et al. (2021) han mostrado una clara alteración del sistema GABAérgico que podría estar afectando al equilibrio excitación-inhibición en varias áreas corticales, incluyendo el hipocampo. En dicho trabajo analizaron la expresión de c-Fos para

comparar el grado de activación de diferentes regiones del cerebro en los ratones mutantes *Lis1/sLis1*. En dicho estudio observaron un aumento de la actividad neuronal en los ratones mutantes *Lis1/sLis1* en las mismas áreas donde el número de interneuronas había disminuido. De hecho, observaron un aumento significativo de c-FOS en el hipocampo. La activación y expresión ectópica de c-Fos ha sido propuesto como un factor clave responsable para los síntomas en la SZ.

Los estudios previos muestran gradientes supra-piramidales e infra-piramidales demostrando que el DG no presenta una funcionalidad tan homogénea como se creía anteriormente. Las láminas DGsp y DGip muestran diferentes morfologías de células granulares y tienen una actividad asimétrica, describiéndose diferencias neurogenéticas tanto en el eje longitudinal como a través del eje transversal ⁽⁶¹⁾. Después de un estímulo, DGsp se activa más rápidamente por las proyecciones entorrinales que DGip. Se cree que la activación de DGsp ocurre junto con la inhibición para permitir que la DGsp exceda DGip en respuesta a la estimulación⁽⁶²⁾ En consonancia, nuestros resultados muestran un mayor número de células inmunopositivas c-Fos en la lámina infrapiramidal del DG de los ratones mutantes *Lis1/sLis1* con respecto a los ratones control, haciendo equivalentes los niveles de actividad entre ambas láminas, DGsp y DGip, en los ratones mutantes *Lis1/sLis1*, nosotros mostramos que mientras las células granulares presentan diferentes gradientes de activación entre ambas láminas de los ratones control, estos gradientes de activación entre DGsp y DGip no están presentes en el DG de ratones mutantes *Lis1/sLis1*, lo que sugiere que puede haber una disfunción en términos de conectividad y memoria episódica.

Las diferencias anatómicas y funcionales entre las láminas DGsp y DGip son necesarias para reconocer pequeñas diferencias entre estímulos similares y desarrollar ciertos tipos de memoria episódica, todo ello, puede estar involucrado en el papel del DG en la separación de patrones ⁽³²⁾.

Estos resultados sugieren que la alteración de la expresión de c-Fos en las células granulares del DG altera los patrones de activación en los circuitos del DG y, como

consecuencia , causa alteraciones cognitivas debido a las diferencias dependientes de lámina en cuanto a la excitabilidad. El ratón mutante *Lis1/sLis1* podría ser un modelo de gran relevancia en nuevos estudios de las diferencias funcionales de cada lámina del DG en el desarrollo de la memoria episódica. Estas investigaciones podrían llevar a poder considerar el modelo murino *Lis1/sLis1* como nuevo modelo de SZ.

7. CONCLUSIONES

La neuroanatomía particular del DG ha sido modelada por la evolución para desarrollar un papel preciso y único en cómo se procesa la información en el hipocampo. Tal es la importancia de esta región, que algunas enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia se han asociado con defectos en el neurodesarrollo de las diferentes regiones del hipocampo incluyendo el DG y sus subregiones DGsp y DGip.

Nuestros hallazgos proporcionan más información sobre los efectos de la alteración de gen *Lis1* (a través del modelo murino mutante denominado *Lis1/sLis1*) en la génesis y neurodesarrollo de la región hipocampal del DG. Además, se ha visto que la alteración de este gen muestra defectos neurológicos y funcionales semejantes a los vistos en pacientes con esquizofrenia.

Las conclusiones que podemos extraer de este trabajo son las siguientes:

1. La excitabilidad neuronal mediada por el marcador c-Fos se ve alterada en los ratones mutantes *Lis1/sLis1* con respecto a los ratones control en el DG, observándose un aumento de la expresión de c-Fos en las láminas DGsp y DGip.
2. La alteración de la actividad neuronal en la región hipocampal del DG no es homogénea presentando una diferente afectación de las láminas DGsp y DGip cuando se muta el gen *Lis1*.
3. Entre ambas láminas se observa un aumento más pronunciado de la excitabilidad mediada por c-Fos en la lámina infra-piramidal del Giro Dentado.

La división anatómica y transversal del DG pone de manifiesto que las capas DGsp y DGip del DG tienen características morfológicas y celulares, así como de proyecciones y conectividad, que las hacen únicas a nivel neuroanatómico y les confieren un papel funcional destacado en el desarrollo de enfermedades como la esquizofrenia.

El estudio del del proto-oncogen c-Fos nos ha dado la oportunidad de observar las heterogeneidades intrínsecas en la actividad del DG, proporcionándonos información relevante y acercándonos al conocimiento de cómo se desarrollan y qué mecanismos llevan a la aparición de enfermedades como la esquizofrenia y que relación tienen con las características neurobiológicas del gen *Lis1*.

Precisamente, el desarrollo de este modelo murino con características fisiológicas y neuroanatómicas similares a la esquizofrenia (*Lis1/sLis1*) abre una nueva vía de investigación de las enfermedades psiquiátricas.

Finalmente, nuestros resultados abren la puerta a nuevas investigaciones que permitan explicar cuál es el significado funcional de esta mayor activación del DG en el ratón mutante *Lis1/sLis1* así como cuáles son los mecanismos celulares y moleculares del neurodesarrollo que conducen a tales alteraciones. La respuesta a estas preguntas puede proporcionar nuevas herramientas para descubrir tratamientos para las enfermedades psiquiátricas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Chao W, Olson MS. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J.* 1993 Jun 15;292 (Pt 3):617–29.
2. Mizuguchi M, Takashima S, Kakita A, Yamada M, Ikeda K. Lissencephaly gene product. Localization in the central nervous system and loss of immunoreactivity in Miller-Dieker syndrome. *Am J Pathol.* 1995 Oct;147(4):1142–51.
3. Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins [Internet]. Vol. 371, *Nature.* 1994. p. 297–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/371297a0>
4. Xiang X, Osmani AH, Osmani SA, Roghi CH, Willins DA, Beckwith S, et al. Analysis of Nuclear Migration in *Aspergillus nidulans* [Internet]. Vol. 60, *Cold*

Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1995. p. 813–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.1995.060.01.087>

5. Xiang X, Osmani AH, Osmani SA, Xin M, Morris NR. NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol Biol Cell*. 1995 Mar;6(3):297–310.
6. Sapir T, Elbaum M, Reiner O. Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J*. 1997 Dec 1;16(23):6977–84.
7. Pilz DT, Matsumoto N, Minnerath S, Mills P, Gleeson JG, Allen KM, et al. LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet*. 1998 Dec;7(13):2029–37.
8. Kato M, Dobyns WB. Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet*. 2003 Apr 1;12 Spec No 1:R89–96.
9. Tabarés-Seisdedos R, Mata I, Escámez T, Vieta E, López-Ilundain JM, Salazar J, et al. Evidence for association between structural variants in lissencephaly-related genes and executive deficits in schizophrenia or bipolar patients from a Spanish isolate population. *Psychiatr Genet*. 2008 Dec;18(6):313–7.
10. Wynshaw-Boris A. Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clin Genet*. 2007 Oct;72(4):296–304.
11. Dobyns WB. Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13 [Internet]. Vol. 270, *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1993. p. 2838–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.270.23.2838>
12. Correa J, Gómez J, Posada R. Fundamentos de pediatría Tomo V: Urgencias, neurología, oftalmología, otorrinolaringología, ortopedia. Corporación para investigaciones Biológicas CIB; 2015. 582 p.
13. Di Donato N, Chiari S, Mirzaa GM, Aldinger K, Parrini E, Olds C, et al. Lissencephaly: Expanded imaging and clinical classification. *Am J Med Genet A*. 2017 Jun;173(6):1473–88.
14. Reiner O, Albrecht U, Gordon M, Chianese KA, Wong C, Gal-Gerber O, et al. Lissencephaly gene (LIS1) expression in the CNS suggests a role in neuronal migration. *J Neurosci*. 1995 May;15(5 Pt 2):3730–8.
15. Tabarés-Seisdedos R, Escámez T, Martínez-Giménez JA, Balanzá V, Salazar J, Selva G, et al. Variations in genes regulating neuronal migration predict reduced prefrontal cognition in schizophrenia and bipolar subjects from mediterranean Spain: a preliminary study. *Neuroscience*. 2006 Mar 23;139(4):1289–300.

16. Vallee RB, Tsai JW. The cellular roles of the lissencephaly gene LIS1, and what they tell us about brain development. *Genes Dev.* 2006 Jun 1;20(11):1384–93.
17. Freedman R. Schizophrenia. *N Engl J Med.* 2003 Oct 30;349(18):1738–49.
18. Miret S, Fatjó-Vilas M, Peralta V, Fañanás L. [Basic symptoms in schizophrenia, their clinical study and relevance in research]. *Rev Psiquiatr Salud Ment.* 2016 Jan 13;9(2):111–22.
19. García-Álvarez L, Martínez-Cao C, Bobes-Bascarán T, Portilla A, Courtet P, de la Fuente-Tomás L, et al. Validation of a European Spanish-version of the Self-Evaluation of Negative Symptoms (SNS) in patients with schizophrenia. *Rev Psiquiatr Salud Ment.* 2022 Jan;15(1):14–21.
20. Schultz SH, North SW, Shields CG. Schizophrenia: a review. *Am Fam Physician.* 2007 Jun 15;75(12):1821–9.
21. Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature.* 2010 Nov 11;468(7321):187–93.
22. Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Oct;5(10):793–807.
23. Reynolds GP, Abdul-Monim Z, Neill JC, Zhang ZJ. Calcium binding protein markers of GABA deficits in schizophrenia--postmortem studies and animal models. *Neurotox Res.* 2004;6(1):57–61.
24. Woo TUW, Kim AM, Viscidi E. Disease-specific alterations in glutamatergic neurotransmission on inhibitory interneurons in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Brain Res.* 2008 Jul 7;1218:267–77.
25. Jentsch JD, Roth RH. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 1999 Mar;20(3):201–25.
26. Abdel-Naby Sayed M, Noda Y, Mahmoud Hamdy M, Mamiya T, Nagai T, Furukawa H, et al. Enhancement of immobility induced by repeated phencyclidine injection: association with c-Fos protein in the mouse brain. *Behav Brain Res.* 2001 Sep 28;124(1):71–6.
27. Garcia-Lopez R, Pombero A, Estirado A, Geijo-Barrientos E, Martinez S. Interneuron Heterotopia in the Lis1 Mutant Mouse Cortex Underlies a Structural and Functional Schizophrenia-Like Phenotype. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jul 13;9:693919.
28. Woodson W, Nitecka L, Ben-Ari Y. Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *J Comp Neurol.* 1989 Feb 8;280(2):254–71.
29. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental

- neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res.* 2007;163:3–22.
30. Jonas P, Lisman J. Structure, function, and plasticity of hippocampal dentate gyrus microcircuits. *Front Neural Circuits.* 2014 Sep 10;8:107.
 31. Aimone JB, Deng W, Gage FH. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron.* 2011 May 26;70(4):589–96.
 32. Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. *Behav Brain Res.* 2012 Jan 1;226(1):56–65.
 33. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol.* 2015 Dec 7;25(23):R1116–21.
 34. Wiera G, Mozrzymas JW. Extracellular Metalloproteinases in the Plasticity of Excitatory and Inhibitory Synapses. *Cells [Internet].* 2021 Aug 11;10(8). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10082055>
 35. Jinno S. Decline in adult neurogenesis during aging follows a topographic pattern in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol.* 2011 Feb 15;519(3):451–66.
 36. Mishra P, Narayanan R. Heterogeneities in intrinsic excitability and frequency-dependent response properties of granule cells across the blades of the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol.* 2020 Feb 1;123(2):755–72.
 37. Desmond NL, Levy WB. Granule cell dendritic spine density in the rat hippocampus varies with spine shape and location. *Neurosci Lett.* 1985 Mar 15;54(2-3):219–24.
 38. Gallitano AL, Satvat E, Gil M, Marrone DF. Distinct dendritic morphology across the blades of the rodent dentate gyrus. *Synapse.* 2016 Jul;70(7):277–82.
 39. Angevine JB. Time of neuron origin in the diencephalon of the mouse. An autoradiographic study [Internet]. Vol. 139, *The Journal of Comparative Neurology.* 1970. p. 129–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.901390202>
 40. Silva R, Lu J, Wu Y, Martins L, Almeida OFX, Sousa N. Mapping cellular gains and losses in the postnatal dentate gyrus: implications for psychiatric disorders. *Exp Neurol.* 2006 Aug;200(2):321–31.
 41. Snyder JS, Ferrante SC, Cameron HA. Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *PLoS One.* 2012 Nov 7;7(11):e48757.
 42. Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1986 Apr 22;246(4):435–58.

43. Ribak CE, Peterson GM. Intragranular mossy fibers in rats and gerbils from synapses with the somata and proximal dendrites of basket cells in the dentate gyrus [Internet]. Vol. 1, Hippocampus. 1991. p. 355–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.450010403>
44. Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM. Evidence for an input to the molecular layer and the stratum granulosum of the dentate gyrus from the supramammillary region of the hypothalamus [Internet]. Vol. 156, Anatomy and Embryology. 1979. p. 165–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00300012>
45. Satvat E, Schmidt B, Argraves M, Marrone DF, Markus EJ. Changes in task demands alter the pattern of zif268 expression in the dentate gyrus. *J Neurosci*. 2011 May 11;31(19):7163–7.
46. Fevurly RD, Spencer RL. Fos expression is selectively and differentially regulated by endogenous glucocorticoids in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the dentate gyrus. *J Neuroendocrinol*. 2004 Dec;16(12):970–9.
47. Lopez-Rojas J, Heine M, Kreutz MR. Plasticity of intrinsic excitability in mature granule cells of the dentate gyrus. *Sci Rep*. 2016 Feb 9;6:21615.
48. Stegen M, Kirchheim F, Hanuschkin A, Staszewski O, Veh RW, Wolfart J. Adaptive intrinsic plasticity in human dentate gyrus granule cells during temporal lobe epilepsy. *Cereb Cortex*. 2012 Sep;22(9):2087–101.
49. Titley HK, Brunel N, Hansel C. Toward a Neurocentric View of Learning. *Neuron*. 2017 Jul 5;95(1):19–32.
50. Guskjolen A, Kenney JW, de la Parra J, Yeung BRA, Josselyn SA, Frankland PW. Recovery of “Lost” Infant Memories in Mice. *Curr Biol*. 2018 Jul 23;28(14):2283–90.e3.
51. Pignatelli M, Ryan TJ, Roy DS, Lovett C, Smith LM, Muralidhar S, et al. Engram Cell Excitability State Determines the Efficacy of Memory Retrieval. *Neuron*. 2019 Jan 16;101(2):274–84.e5.
52. Alves ND, Correia JS, Patrício P, Mateus-Pinheiro A, Machado-Santos AR, Loureiro-Campos E, et al. Adult hippocampal neuroplasticity triggers susceptibility to recurrent depression. *Transl Psychiatry*. 2017 Mar 14;7(3):e1058.
53. Scharfman HE, Sollas AL, Smith KL, Jackson MB, Goodman JH. Structural and functional asymmetry in the normal and epileptic rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 2002 Dec 23;454(4):424–39.
54. Akers KG, Martinez-Canabal A, Restivo L, Yiu AP, De Cristofaro A, Hsiang HLL, et al. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and

- infancy. *Science*. 2014 May 9;344(6184):598–602.
55. Niu L, Cao B, Zhu H, Mei B, Wang M, Yang Y, et al. Impaired in vivo synaptic plasticity in dentate gyrus and spatial memory in juvenile rats induced by prenatal morphine exposure. *Hippocampus*. 2009 Jul;19(7):649–57.
 56. Dragunow M, Faull RL. MK-801 induces c-fos protein in thalamic and neocortical neurons of rat brain. *Neurosci Lett*. 1990 Mar 26;111(1-2):39–45.
 57. Keilhoff G, Becker A, Grecksch G, Wolf G, Bernstein HG. Repeated application of ketamine to rats induces changes in the hippocampal expression of parvalbumin, neuronal nitric oxide synthase and cFOS similar to those found in human schizophrenia. *Neuroscience*. 2004;126(3):591–8.
 58. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*. 1988 Jun 3;240(4857):1328–31.
 59. Näkki R, Sharp FR, Sagar SM, Honkaniemi J. Effects of phencyclidine on immediate early gene expression in the brain. *J Neurosci Res*. 1996 Jul 1;45(1):13–27.
 60. Castañé A, Santana N, Artigas F. PCP-based mice models of schizophrenia: differential behavioral, neurochemical and cellular effects of acute and subchronic treatments. *Psychopharmacology* . 2015 Nov;232(21-22):4085–97.
 61. Jinno S. Topographic differences in adult neurogenesis in the mouse hippocampus: a stereology-based study using endogenous markers. *Hippocampus*. 2011 May;21(5):467–80.
 62. Canning KJ, Leung LS. Lateral entorhinal, perirhinal, and amygdala-entorhinal transition projections to hippocampal CA1 and dentate gyrus in the rat: a current source density study. *Hippocampus*. 1997;7(6):643–55.



