

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO FIN DE GRADO EN MEDICINA



TÍTULO: Alteraciones de la transmisión sináptica en la corteza cerebral causadas por la inactivación del gen *LIS1* en interneuronas corticales inhibitoras.

AUTOR: Murciano López, José Martín.

TUTOR: Geijo Barrientos, Emilio Carlos.

COTUTOR: Andreu Cervera, Abraham.

DEPARTAMENTO Y ÁREA: Fisiología.

Curso académico 2022 – 2023.

Convocatoria: Febrero 2023.

ÍNDICE

1. CÓDIGO DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE (COIR).....	2
2. RESUMEN Y ABSTRACT.....	4
3. INTRODUCCIÓN.....	6
3.1. Sistema límbico, corteza cingular y retrosplenial.....	6
3.2. Gen LIS1 y su implicación en el desarrollo neuronal.....	8
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVO DEL TRABAJO.....	10
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
5.1. Modelo experimental.....	10
5.2. Modelo electrofisiológico.....	12
5.3. Análisis estadístico de los datos.....	16
6. RESULTADOS.....	16
7. DISCUSIÓN.....	21
8. CONCLUSIONES.....	23
9. BIBLIOGRAFÍA.....	23

1. CÓDIGO DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE (COIR).



INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)

Elche, a 20 de octubre del 2022

Nombre del tutor/a	Emilio Geijo Barrientos
Nombre del alumno/a	José Martín Murciano López
Tipo de actividad	Adherido a proyecto
Título del 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)	Alteraciones de la transmisión sináptica en la corteza cerebral causadas por la inactivación del gen LIS1 en interneuronas corticales inhibitoras.
Código/s GIS estancias	
Evaluación Riesgos Laborales	No procede
Evaluación Ética	No procede
Registro provisional	221020103518
Código de Investigación Responsable	TFG.GME.EGB.JMML.221020
Caducidad	2 años

Se considera que el presente proyecto carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: **Alteraciones de la transmisión sináptica en la corteza cerebral causadas por la inactivación del gen LIS1 en interneuronas corticales inhibitoras**, ha sido realizada de manera automática en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere someterse a dicha evaluación. Dicha información se adjunta en el presente informe. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, se autoriza la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Secretario del CEII
Vicerrectorado de Investigación

Domingo L. Orozco Beltrán
Presidente del CEII
Vicerrectorado de Investigación

Información adicional:

- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización de este trabajo debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de



prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.

La información descriptiva básica del presente trabajo será incorporada al repositorio público de Trabajos fin de Grado y Trabajos Fin de Máster autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández en el curso académico 2020/2021. También se puede acceder a través de <https://oir.umh.es/tfg-tfm/>



2. RESUMEN Y ABSTRACT.

La lisencefalia es una enfermedad rara que condiciona una malformación cerebral congénita grave. Se desconoce su causa, estando relacionadas en su patogénesis alteraciones en el gen *LIS1*. Este gen codifica una proteína en primates, la proteína LIS1, la cual se ha involucrado en diferentes funciones de migración neuronal y modulación sináptica. Por su parte, el sistema límbico engloba diferentes estructuras clave para la generación de memoria y sentimientos de emoción. La corteza cingular anterior y la corteza retrosplenial forman parte de este complejo sistema, estrechamente relacionadas con el resto de las estructuras límbicas. En este TFG experimental se estudiará la relación dosis – respuesta de la aparición y tamaño de descargas epileptiformes respecto a la concentración de bicuculina (un bloqueante de receptores inhibidores de tipo GABA_A) en la corteza cingular anterior y en la corteza retrosplenial. Esta investigación se realizará en modelos animales postnatales con ratones “wild-type” con ambos alelos normales para *Lis1* (*Lis1*^{+/+} - *PV*^{+/+}) y ratones mutantes con ambos alelos inactivados (*Lis1*^{Flox/Flox} - *PV*^{Cre/+}). Para estudiar la capacidad de generar actividad epileptiforme, se añadió al tejido cerebral disoluciones con bicuculina, fármaco antagonista de los receptores GABA_A. Los resultados obtenidos amplían el conocimiento acerca del papel de la proteína LIS1 en la generación de actividad epileptiforme en la corteza cerebral.

Palabras clave: Corteza cingular anterior, corteza retrosplenial, actividad epileptiforme, bicuculina, *Lis1*.

Lissencephaly is a rare disease that conditions a severe congenital brain malformation. Its cause is still unknown, being related to alterations in the *LIS1* gene. This gene encodes a protein in primates, the LIS1 protein, which has been involved in different functions of neuronal migration and synaptic modulation. In addition, the limbic system is formed by different structures which are involved in the generation of memory and emotion. The anterior cingulate cortex and the retrosplenial cortex are part of this complex limbic system, closely interrelated with the rest of the limbic structures. In this experimental TFG, the dose-response relationship of the onset and size of epileptiform discharges respect to the concentration of bicuculline (a blocker of inhibitory receptors of the GABA_A type) in the anterior cingulate cortex and in the retrosplenial cortex will be studied. This investigation will be carried out in postnatal animal models with “wild-type” mice with both normal alleles for *Lis1* (*Lis1*^{+/+} - *PV*^{+/+}) and mutant mice with both alleles inactivated (*Lis1*^{Flox/Flox} - *PV*^{Cre/+}). In order to study the ability to generate epileptiform activity, solutions containing bicuculline, a GABA_A receptor antagonist drug, were added to the brain tissue. The results obtained expand the knowledge about the role of the LIS1 protein in the generation of epileptiform activity in the cerebral cortex.

Keywords: Anterior cingulate cortex, retrosplenial cortex, epileptiform activity, bicuculline, *Lis1*.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. SISTEMA LÍMBICO, CORTEZA CINGULAR Y RETROSPLENIAL.

El concepto actual del sistema límbico fue redefinido por el médico MacLean a mediados del siglo XX, integrando las teorías previas con las más actuales. Este complejo sistema integra diferentes estructuras neuronales, como son la corteza cingular, el hipocampo, la amígdala, los cuerpos mamilares, el tálamo, el hipotálamo, el fórnix y la corteza orbitofrontal; las cuales se encuentran íntimamente relacionadas entre sí a través de diferentes conexiones. Todas estas estructuras han sido descritas en diversas funciones cerebrales, jugando un papel fundamental en el valor emocional. No obstante, la generación de emociones no es la única función del sistema límbico, viéndose este implicado en otros procesos cognitivos, como el aprendizaje y la memoria. (*Rolls., 2011; Roxo et al., 2011*)

Cabe destacar el papel de la corteza cingular anterior (ACC), la cual conforma aproximadamente un tercio del total de la corteza cingular en el ratón. Esta tiene numerosas interconexiones con el resto de áreas límbicas, destacándose su relación con la corteza orbitofrontal y la amígdala, lo que involucra a la ACC en los procesos cognitivos de la emoción y la recompensa. Más concretamente, se ha postulado a la ACC como la responsable en el aprendizaje de la acción-recompensa, ya que esta pone en práctica aquellas acciones que conlleven refuerzos positivos, evitando otras que supongan un castigo para el individuo. En consecuencia, un daño en esta zona cortical repercutiría en los procesos emocionales. (*Roxo et al., 2011*)

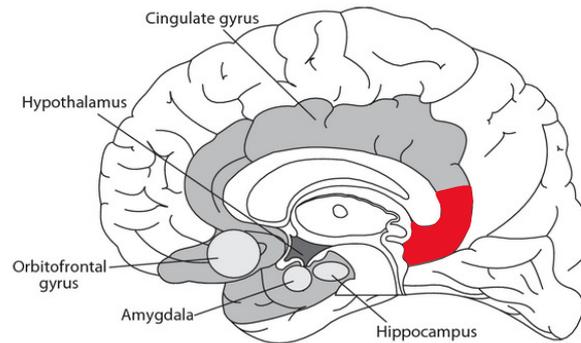


Figura 1. Corte sagital de cerebro humano. En la representación se muestran las diferentes estructuras que conforman el sistema límbico. La corteza que forma parte del giro cingular, en la parte posterior del cuerpo calloso, es la correspondiente a la corteza retrosplenial (en rojo). (*Figura tomada de Roxo et al., 2011*)

Por otro lado, la corteza retrosplenial (RSC) en primates se encuentra dividida arquitectónicamente en una capa granular y otra disgranular. Constituye parte de la corteza cingular posterior junto a las áreas 23 y 31 de Brodmann, ubicada en la parte posterior del esplenio del cuerpo calloso. No obstante, se debe resaltar una diferencia sustancial respecto al cerebro del ratón, el cual no presenta las áreas 23 y 31; por ello, toda la región cingular posterior es denominada como corteza retrosplenial, siendo ésta una de las regiones corticales más extensas de la especie, presentándose la misma diferenciación arquitectónica que en primates. (*Vann et al., 2009*)

La RSC presenta conexiones con tres regiones: con el hipocampo, con la corteza entorrinal (parahipocampal) y con los núcleos talámicos anteriores y dorsolaterales; teniendo por tanto una función esencial en la memoria episódica y contextual. Asimismo, está interrelacionada con la corteza prefrontal dorsolateral, participando en funciones ejecutivas. (*Vann et al., 2009; Leech et al., 2013*)

Según los diferentes estudios neuropsicológicos realizados en humanos, el daño generado en la RSC se ha visto involucrado en problemas para la orientación y la generación de memoria espacial; en la dificultad para adquirir nueva información, tanto visual como verbal; se compromete la capacidad para imaginar eventos y experiencias futuras; y se relaciona con una amnesia retrógrada de eventos autobiográficos recientes. De igual modo, se postula que la RSC tiene una función de traducción, al adaptar información y representaciones allocéntricas aportadas por el hipocampo (provenientes del exterior) en egocéntricas (propias del individuo); lo que se vincula con la capacidad de orientación y navegación, la memoria y los eventos autobiográficos. (*Vann et al., 2009; Leech et al., 2013*)

3.2. GEN *LIS1* Y SU IMPLICACIÓN EN EL DESARROLLO NEURONAL.

LIS1 es una proteína codificada por el gen *PAFAH1B1*, localizado en el brazo corto del cromosoma 17 en primates (17p13.3) y en el cromosoma 11B3 en ratones. La proteína está compuesta 410 aminoácidos y presenta 2 dominios funcionales, en concreto, el dominio LisH ubicado en la porción N-terminal, es el responsable de la interacción con otros péptidos *LIS1* y que se produzca el homodímero *LIS1*, siendo esta la forma funcional de la proteína (*Domínguez et al., 2022; Reiner et al., 2002; Dobyms, 1993*).

Se ha involucrado a la proteína *LIS1* en diferentes procesos clave tanto en el desarrollo neuronal embrionario como en la etapa adulta, como son la formación y modulación de la sinapsis, y la migración neuronal. *LIS1* participa en estos procesos

de dos formas fundamentalmente, codificando la subunidad reguladora no catalítica de la acetil-hidrolasa del factor activador plaquetario cerebral (PAF-AH), implicada en la diferenciación y migración neuronal; y regulando la unión de la dineína a los microtúbulos, siendo pieza clave del movimiento y del crecimiento celular (**Domínguez et al., 2022; Reiner et al., 2002; Dobyys, 1993**).

Alteraciones en la secuencia de LIS1 se asocian clásicamente en la patogénesis de la lisencefalia tipo 1, una severa malformación cerebral congénita, la cual se caracteriza por presentar alteraciones en el número y tamaño de las circunvoluciones y surcos cerebrales (paquigiria) o, incluso, su ausencia completa (agiria). Asimismo, otra particularidad de esta enfermedad es la desorganización en la estructura cortical, no estando presente el patrón típico de seis capas neuronales. La lisencefalia presenta manifestaciones clínicas variadas y heterogéneas dependiendo de la gravedad, siendo la aparición recurrente de crisis epilépticas refractarias a tratamiento médico la forma clásica de manifestación, lo que compromete la calidad y esperanza de vida de los pacientes (**Domínguez et al., 2022; Reiner et al., 2002; Dobyys, 1993**). Por otro lado, autores como Reiner et al. (2006) relacionan las alteraciones en LIS1 con otras patologías neurológicas como la esquizofrenia, el autismo o el trastorno bipolar, siendo estas mucho más frecuentes de carácter general en la sociedad (**Reiner et al., 2006**).

El trabajo previo desarrollado en nuestro laboratorio ha demostrado la presencia de alteraciones funcionales que afectan a la transmisión sináptica y a la generación de actividad epileptiforme en la corteza cingular y retrosplenial (ACC y

RSC) de ratones mutantes del gen *Lis1* (**Domínguez et al., 2022**), por lo que hemos realizado este trabajo con objeto de conocer mejor las consecuencias funcionales de la inactivación de este gen en un tipo neuronal específico de estas regiones de la corteza cerebral.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVO DEL TRABAJO.

Teniendo en cuenta la implicación del gen *LIS1* en los procesos de migración neuronal y modulación sináptica, se estudiará mediante modelos electrofisiológicos la hipótesis general de observar diferencias en la capacidad de generar actividad epileptiforme en aquellos ratones mutantes (MUT) respecto a los de tipo “wild-type” (WT).

El objetivo específico del trabajo es el estudio de la relación dosis – respuesta de la generación de actividad epileptiforme en presencia de bicuculina y la sensibilidad a este bloqueante gabaérgico en ratones “wild-type” y mutantes.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1. MODELO EXPERIMENTAL.

Para la realización del trabajo se utilizaron ratones entre el día 14 y 18 postnatales (P14-P18), obtenidos del cruce de ratones modificados genéticamente con el sistema “*cre-Lox-P*”, el cual permite inactivar el gen *Lis1* de forma selectiva en las neuronas que expresan parvoalbúmina positivas (PV+).

Los ratones procedían del animalario de ratones modificados genéticamente del Instituto de Neurociencias, parte del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Dicho animalario está acreditado según la normativa ISO 9001/2008 y la manipulación de los animales se realizó por el profesional capacitado.

Como consecuencia del cruce de animales, se obtuvieron tres líneas diferentes, diferenciándose ratones “wild-type” (WT), con ambos alelos para *Lis1* normales ($Lis1^{+/+} - PV^{+/+}$); ratones heterocigotos (HT), con un alelo inactivado y otro normal ($Lis1^{Flox/+} - PV^{Cre/+}$); y ratones homocigotos o mutantes (MUT), con ambos alelos inactivados ($Lis1^{Flox/Flox} - PV^{Cre/+}$).

En cuanto a los caracteres fenotípicos, los ratones homocigotos se diferenciaban del resto de líneas por alteraciones en la propia cola y por una afectación atáxica característica (*Figura 2*), no presentando dichas manifestaciones fenotípicas ni los “wild-types” ni los heterocigotos. Además, para poder estudiar cada línea de manera específica, se recurrió al genotipado de los ratones experimentales por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).



Figura 2. Enlace QR del vídeo donde se pueden visualizar las alteraciones fenotípicas del ratón mutante.

5.2. MODELO ELECTROFISIOLÓGICO.

- Preparación de cortes de cerebro.

Los experimentos se realizaron con rodajas coronales de los cerebros obtenidos de los ratones. Tras haber decapitado al animal vivo y haber extraído rápidamente el cerebro, este fue perfundido de manera continua con disoluciones extracelulares, a las que se les añadió carbógeno (95% O₂, 5% CO₂), a lo largo de toda la experimentación con el fin de asegurar la supervivencia del tejido neuronal. Las composiciones de las disoluciones están reflejadas en la *Tabla 1* y *Tabla 2*. Ambas soluciones se mantienen saturadas con carbógeno, por lo que se ajusta el pH a 7.4.

Disolución de corte	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	124
NaHCO ₃ ⁻	26
Glucosa	10
KCl	2.5
NaH ₂ PO ₄	1.25
CaCl ₂	0.5
MgCl ₂	2.25

Tabla 1. Disolución de corte. Se indican en la tabla las concentraciones en mM de los diferentes compuestos requeridos.

Disolución extracelular	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	124
NaHCO ₃ ⁻	26
Glucosa	10
KCl	2.5
NaH ₂ PO ₄	1.25
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1

Tabla 2. Disolución extracelular. Se indican en la tabla las concentraciones en mM de los diferentes compuestos requeridos.

Del tejido cerebral se obtuvieron rodajas de 350 μm de grosor utilizando el vibratomo del laboratorio del Instituto Neurociencias CSIC-UMH de Alicante. Durante todo este proceso, el cerebro estuvo bajo una perfusión con disolución de corte helada. Posteriormente, los cortes cerebrales elaborados se transfirieron a una cubeta con la disolución extracelular y se incubaron a 37°C durante 30 minutos para diluir posibles neurotóxicos del tejido y mantenerlo en unas condiciones similares a las fisiológicas.

- **Registro extracelular.**

Tras la adecuada preparación del tejido cerebral, se seleccionaron los cortes correspondientes, colocándolos en la cámara del microscopio y localizando las regiones cerebrales de la ACC y de la RSC (*Figura 3*). Dicha cámara pudo ser perfundida de manera continua gracias a un sistema con el cual se administró la disolución extracelular a 32-33°C y las diferentes disoluciones preparadas previamente con concentraciones ascendentes de bicuculina (0.05 μM ; 0.1 μM ; 0.2

μM ; 0.5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM y 50 μM). La bicuculina es un fármaco antagonista de los receptores GABA_A, por lo que, al bloquear estos receptores, se disminuye el umbral para la generación de actividad epileptiforme en la corteza cerebral estimulada.

Las rodajas se estimularon mediante pulsos de corriente aplicados en la capa 1 de la corteza cerebral con un electrodo bipolar metálico bajo un protocolo de frecuencia de un estímulo eléctrico cada 30 segundos (y de 0.1 ms de duración); la intensidad del pulso de corriente de estímulo se ajustó 2 veces la intensidad umbral en cada rodaja. La actividad eléctrica epileptiforme de la corteza se registró de forma extracelular mediante un electrodo de vidrio de 5-10 μM de diámetro en la punta relleno de solución extracelular colocado en la capa 2/3 de la corteza cingular (*Figura 3*), tanto en la ACC como en la RSC. Los diferentes registros se obtuvieron con un amplificador *MultiClamp 700B* y se filtraron con un convertidor analógico-digital *Digidata 1440A*. Los registros se obtuvieron y se analizaron con el software pClamp 10.7.

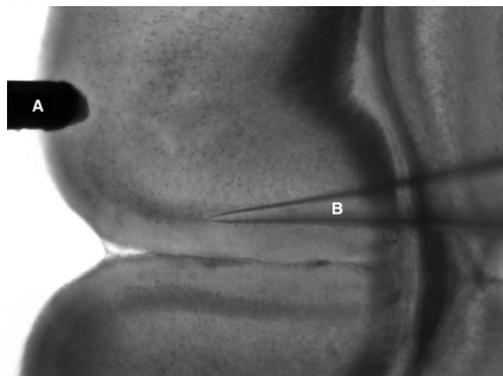


Figura 3. Corte coronal de la RSC, se diferencia el electrodo de estímulo situado sobre la capa 1 de la corteza (A) y el de registro sobre las capas 2/3 de la corteza (B).

El protocolo de perfusión de las diferentes cortezas estudiadas se muestra en la *Figura 4*. Dicho protocolo fue el mismo tanto para la ACC como para la RSC, distinguiéndose únicamente en la concentración de bicuculina de la disolución inicial, siendo 0.2 μM para la ACC y 0.05 μM para la RSC.



C	Disolución control
B1	Disolución 0.05 μM <u>bicuculina</u>
B2	Disolución 0.1 μM <u>bicuculina</u>
B3	Disolución 0.2 μM <u>bicuculina</u>
B4	Disolución 0.5 μM <u>bicuculina</u>
B5	Disolución 1 μM <u>bicuculina</u>
B6	Disolución 2 μM <u>bicuculina</u>
B7	Disolución 5 μM <u>bicuculina</u>
B8	Disolución 10 μM <u>bicuculina</u>
B9	Disolución 20 μM <u>bicuculina</u>
B10	Disolución 50 μM <u>bicuculina</u>

Figura 4. Protocolo de perfusión mediante disoluciones con concentraciones crecientes de bicuculina. Para cada rodaja, se perfundió durante 2 minutos y medio con la disolución control y durante 10 minutos con cada disolución de bicuculina, aumentando la concentración de este bloqueante gabaérgico tras cada lavado con la disolución control. Dado que se comenzó con la concentración de 0.2 μM de bicuculina en la ACC, el experimento en esta región duró 1 hora y 40 minutos en total; mientras que, al comenzar con una concentración de 0.05 μM en la RSC, en esta región cortical el experimento duró 2 horas y 5 minutos.

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Los parámetros obtenidos se compararon mediante el “*Mann Whitney rank sum test*”, que es un test no paramétrico para muestras independientes. Las comparaciones estadísticas se hicieron con el software SigmaStat 3.5, considerándose como diferencias estadísticamente significativas aquellas que mostrasen un *p valor* < 0.05. El ajuste de los datos experimentales a una ecuación de Hill se hizo con el software Origin 8.5.

6. RESULTADOS.

Para el estudio de la relación dosis – respuesta en la generación de actividad epileptiforme y de la sensibilidad a la bicuculina se experimentó con un total de 21 rodajas coronales, distribuidas según las líneas de los ratones en: 7 “wild-types” (WT), 3 heterocigotos (HT) y 10 mutantes (MUT). No se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos de los ratones heterocigotos, dado que el objetivo fue comparar la respuesta epileptiforme en aquellos ratones con ambos alelos inactivados para *Lis1* (MUT) respecto aquellos con ambos alelos normales (WT). Por lo tanto, finalmente se analizaron para la corteza cingular anterior (ACC), 4 rodajas WT y 4 rodajas MUT; mientras que para la corteza retrosplenial (RSC), 3 rodajas WT y 7 rodajas MUT.

En la *Figura 5A* se muestra un ejemplo del registro electrofisiológico realizado en una rodaja de ACC y RSC de un ratón WT. En dicho registro se observa el incremento de respuesta epileptiforme generada a partir de disoluciones con concentraciones de bicuculina de 2 μ M en la ACC y de 0.5 μ M en la RSC, de forma

aproximada. Además, a concentraciones de bicuculina 10 μM y superiores, se observó la generación de post-descargas en la corteza cerebral, siendo más frecuentes y numerosas en la ACC que en la RSC. Por su lado, la curva dosis – respuesta ejemplificada en la *Figura 5B* se elaboró con el valor de la amplitud pico inicial según la concentración de bicuculina administrada en las diferentes cortezas. Para poder estudiar de una forma más precisa los valores obtenidos, se recurrió al modelo sigmoidal del efecto máximo utilizando la ecuación de Hill, que, al ajustarla a los datos de amplitud de la descarga epileptiforme, nos proporciona un valor ($D_{50\%}$), el cual nos indica la concentración de fármaco necesario para generar la mitad de la amplitud total de la respuesta epileptiforme (*Figura 5B*).

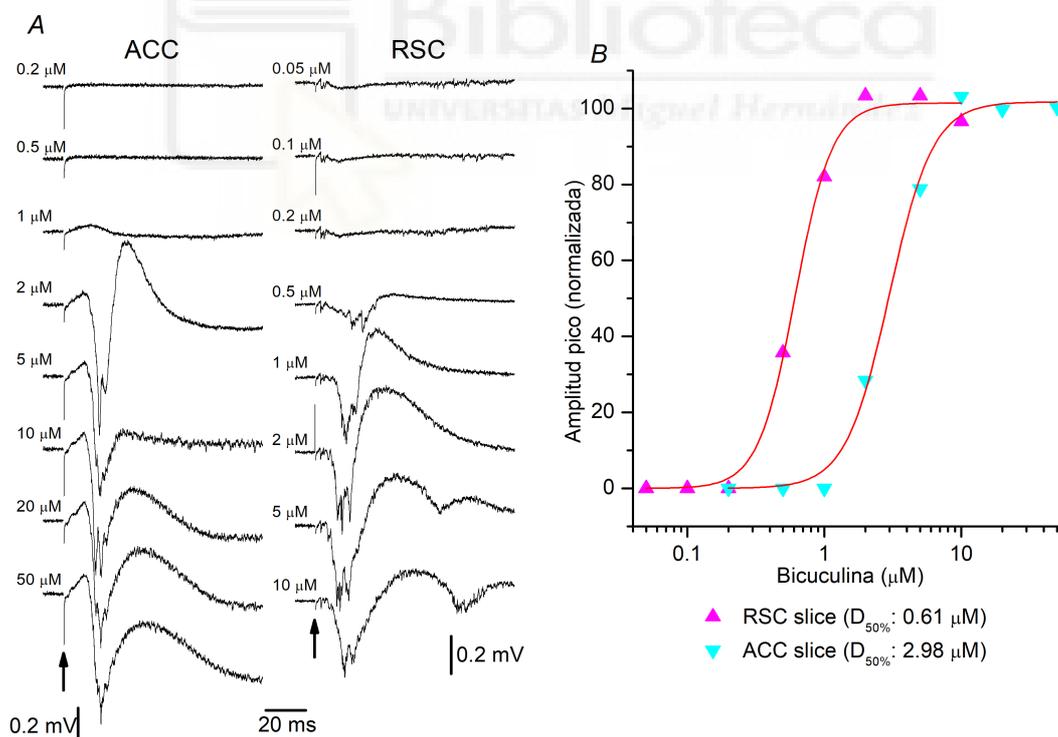


Figura 5. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de bicuculina a rodajas “wild-type” de corteza cingular anterior (ACC) y corteza retrosplenial (RSC).

A, ejemplos de las respuestas epileptiformes registradas en una rodaja de ACC y en una rodaja de RSC en presencia de

concentraciones crecientes de bicuculina; la flecha en la parte inferior de cada serie de registros indica el momento de estimulación (artefacto de estímulo). La escala de tiempo es la misma para los registros de las dos rodajas. **B**, relación entre el tamaño de la respuesta epileptiforme y la concentración de bicuculina aplicada de las rodajas mostradas en el panel A; la amplitud de la respuesta epileptiforme se mide mediante la amplitud del pico negativo inicial (amplitud pico) y se muestra normalizada respecto al valor promedio de la respuesta obtenida con las dos concentraciones más altas aplicadas a cada rodaja. Las líneas rojas muestran el ajuste de una ecuación de Hill a los valores de amplitud pico; de este ajuste se obtiene la concentración de bicuculina que produce el 50% del efecto máximo ($D_{50\%}$).

Los resultados que se obtuvieron en cada rodaja de ACC y RSC de ratones WT demostraron que, a concentraciones crecientes de bicuculina, la respuesta epileptiforme desencadenada aumentaba de tamaño, medida como la amplitud máxima del pico inicial (*Figura 6A*). De igual manera, tras realizar el ajuste con la ecuación de Hill y representarlo en un diagrama de barras (*Figura 6B*), se obtuvo un valor $D_{50\%}$ en la RSC próximo a 0.6 μM , mientras que, en la ACC, el valor $D_{50\%}$ se aproximó a 2 μM .

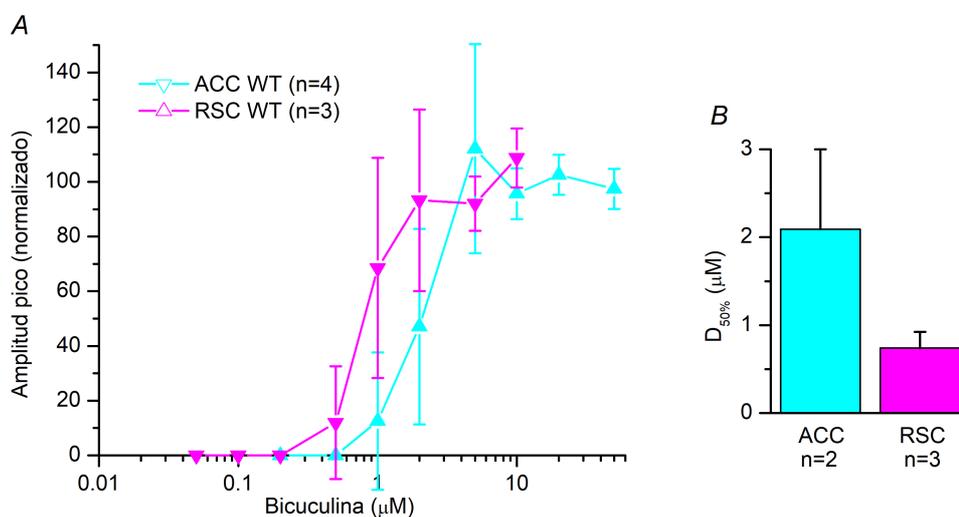


Figura 6. Diferencia del efecto de la bicuculina en rodajas de ACC y de RSC.

A, relación dosis – respuesta del efecto de la bicuculina en rodajas de ACC (símbolos azules) y de RSC (símbolos magenta). **B**, valores promedio del $D_{50\%}$ en rodajas de ACC y RSC; el valor del $D_{50\%}$ se ha calculado mediante el ajuste a una ecuación de Hill solo en aquellas rodajas en las que se utilizó el rango completo de concentraciones de bicuculina que produjo un efecto máximo y una saturación del efecto (como se muestra en la figura 5B; ACC n=2, RSC n=3). Los datos mostrados en esta figura se han obtenido a partir de rodajas de animales “wild type”. En los paneles A y B los datos se muestran como media \pm desviación estándar.

Esta comparación entre las dos regiones de la corteza cingular y retrosplenial (ACC y RSC, *Figura 6*) sugiere que la RSC es más sensible a la generación de descargas epileptiformes; aunque la diferencia entre los valores de $D_{50\%}$ (*Figura 6B*) no es estadísticamente significativa ($p=0.064$) hay una tendencia clara en esa dirección.

La *Figura 7* muestra la comparación entre rodajas de animales WT y MUT en ambas regiones corticales. La actividad epileptiforme generada aumentaba de tamaño de manera similar a concentraciones crecientes de bicuculina (*Figura 7A-C*). En la región ACC no hay diferencia entre ambos genotipos (*Figura 7A-B*; $p=0.704$ para los datos de la *Figura 7B*: WT n=4, MUT n=4), pero en la RSC, aunque la diferencia en los valores de $D_{50\%}$ no son estadísticamente significativos, hay una tendencia clara a que en rodajas de animales MUT la relación dosis-respuesta está desplazada a concentraciones más altas (*Figura 7C-D*; $p=0.08$ para los datos de la *Figura 7D*: WT n=2, MUT n=3).

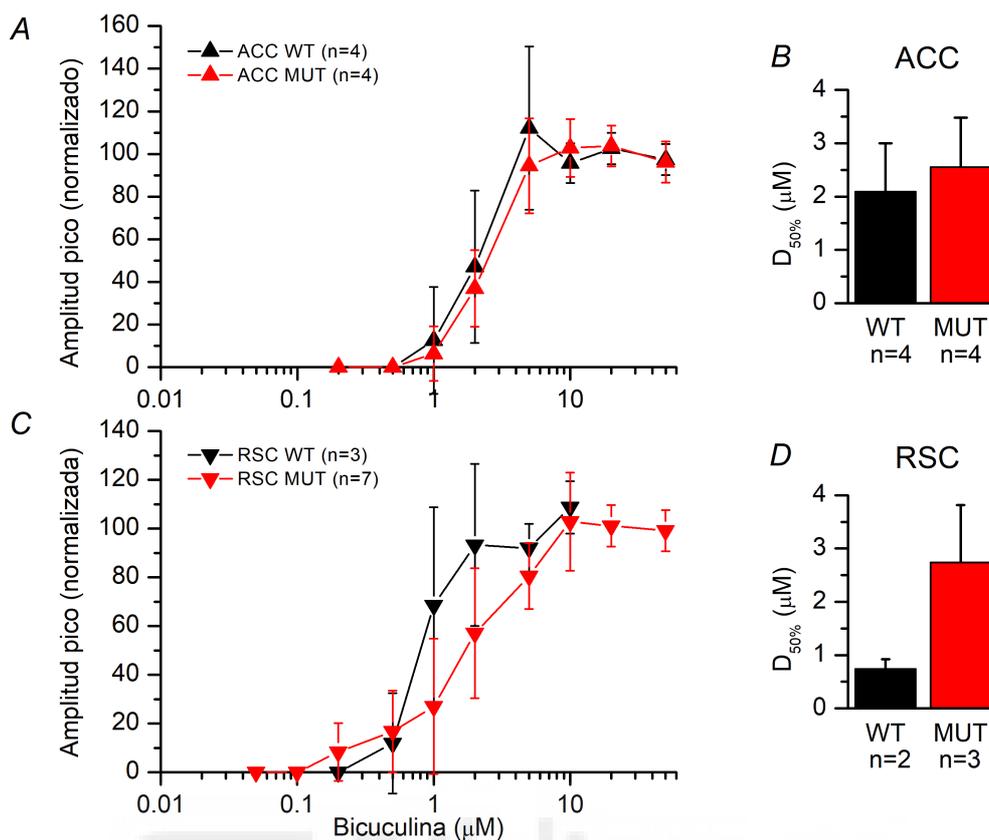


Figura 7. Comparación del efecto de la bicuculina en rodajas de animales “wild type” (WT) y mutantes (homocigotos, MUT).

A y C, Relación dosis – respuesta del efecto de la bicuculina en rodajas de ACC y RSC, WT y MUT. Los datos correspondientes a las rodajas de animales WT son los mismos que los mostrados en la figura 3A. **B y D,** valores promedio del $D_{50\%}$ en rodajas de ACC y RSC, WT y MUT; el valor del $D_{50\%}$ se ha calculado mediante el ajuste a una ecuación de Hill solo en aquellas rodajas en las que se utilizó el rango completo de concentraciones de bicuculina que produjo un efecto máximo y una saturación del efecto (como en la figura 5B). En todos los paneles los datos se muestran como media \pm desviación estándar.

7. DISCUSIÓN.

Las diferentes funciones en las que está involucrada la proteína LIS1, de acuerdo con Reiner et al. (2002), son la formación y modulación de la sinapsis, y la migración neuronal, las cuales no podrán ejecutarse de manera correcta debido a alteraciones en la secuencia proteica de LIS1. Para poder estudiar dichas alteraciones funcionales, se diseñó este estudio en el que se focalizó la atención en las interneuronas parvoalbúmina positivas localizadas en la región de la corteza cingular anterior y de la corteza retrosplenial, comparándose los resultados obtenidos en ratones “wild-type” (WT) y en ratones mutantes (MUT).

En nuestro estudio, al añadir un bloqueante de los canales GABA_A como la bicuculina a las disoluciones con las que se perfundieron las diferentes rodajas cerebrales, demostramos que tanto los ratones WT como los MUT son capaces de generar actividad epileptiforme en presencia de concentraciones crecientes de bicuculina, de la misma forma que se demostró en el estudio de Domínguez et al. (2022), en el que se estudia una mutación del gen *Lis1* que afecta a todas las neuronas corticales. Además, en ambas líneas de ratones se cumplía la correlación de que, a concentraciones crecientes del fármaco, mayor respuesta epileptiforme generada hasta llegar a la saturación del efecto (curvas dosis – respuesta, *Figura 5B*). Asimismo, en ambas cortezas de ratones WT y MUT se registraron post-descargas con concentraciones elevadas de bicuculina, como consecuencia de la sensibilidad que muestran ambas regiones al fármaco.

Al comparar ambas cortezas estudiadas entre sí en los ratones WT (*Figura 6A-B*), los resultados obtenidos mostraron que la RSC parece tener una sensibilidad mayor a la bicuculina que la ACC, consiguiéndose generar actividad epileptiforme a concentraciones menores del fármaco. La diferencia entre los valores de $D_{50\%}$ de ambas regiones no es estadísticamente significativa, posiblemente debido al bajo número de casos estudiados.

Finalmente, teniendo en cuenta los hallazgos obtenidos en los registros de las diferentes cortezas encontramos resultados similares a Domínguez et al. (2022), de forma que, en la ACC, la respuesta a dosis crecientes del fármaco fue similar tanto en los WT como en los MUT, mostrando una sensibilidad similar a la bicuculina (*Figura 7A-B*). Sin embargo, pese a que en la RSC tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas, se muestra una tendencia en los ratones WT a conseguir desencadenar una mayor respuesta epileptiforme a concentraciones menores del fármaco respecto a los ratones MUT (*Figura 7C-D*), pudiéndose valorar este hallazgo como una mayor sensibilidad a la bicuculina en la RSC de los ratones WT.

En nuestro trabajo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, posiblemente, no se llegó a alcanzar niveles de significación en la tendencia observada en la RSC de los ratones WT debido a la baja muestra total de ratones empleados. Por ello, consideramos que se debería continuar el estudio en esta región cortical, aumentando el número de casos y controles para poder valorar una posible diferencia significativa.

8. CONCLUSIONES.

Tras la realización del estudio, podemos concluir que:

1. Ambas líneas de ratones mostraron capacidad de generar actividad epileptiforme al bloquear los canales GABA_A en las cortezas estudiadas; hay una tendencia no significativa estadísticamente a que en la región RSC la sensibilidad a la bicuculina es mayor que en la ACC.
2. La tendencia (no significativa estadísticamente) observada en la respuesta a dosis crecientes del fármaco en la corteza retrosplenial (RSC) de ratones “wild-type” (WT) sugiere una mayor sensibilidad al fármaco que los ratones mutantes (MUT) en esta región cortical.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Dobyns WB. Lissencephaly. JAMA. 1993;270(23):2838.
- 2.- Domínguez E, Andreu A, Martín P, Murcia R, Martínez S, Geijo E. Properties of the epileptiform activity in the cingulate cortex of a mouse model of LIS1 dysfunction. Brain Structure and Function. 2022;227(5):1599–614.
- 3.- Leech R, Sharp DJ. The role of the posterior cingulate cortex in cognition and disease. Brain. 2013;137(1):12–32.

4.- Reiner O, Cahana A, Escamez T, Martinez S. Lis1—no more no less. *Molecular Psychiatry*. 2002;7(1):12–6.

5.- Reiner O, Sapoznik S, Sapir T. Lissencephaly 1 linking to multiple diseases: Mental retardation, neurodegeneration, schizophrenia, male sterility, and more. *NeuroMolecular Medicine*. 2006;8(4):547–66.

6.- Rolls ET. The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory. *Brain Structure and Function*. 2019;224(9):3001–18.

7.- Roxo MR, Franceschini PR, Zubaran C, et al. The limbic system conception and its historical evolution. *The Scientific World Journal*. 2011;11:2427–40.

8.- Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA. What does the retrosplenial cortex do? *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10(11):792–802.