

Prof. Salvador Martínez Pérez, Director del Instituto de Neurociencias, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández, UMH y la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada: "*Estudio experimental de las propiedades funcionales de la corteza cerebral de un modelo animal de Lisencefalia: el ratón *Lis1/sLis1**" ha sido realizada por D. Eduardo Domínguez Sala (NIF 48562462D) bajo la dirección de los Profesores Emilio Geijo Barrientos y Dr. Salvador Martínez Pérez, y da su conformidad para que sea presentada a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en San Juan de Alicante, mayo de 2017

Salvador Martínez

Director

Prof. Emilio Geijo Barrientos, Catedrático de Fisiología, y Prof. Salvador Martínez Pérez, Catedrático de Anatomía y Embriología Humana, de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

Que D. Eduardo Domínguez Sala (DNI 48562462D), ha realizado bajo su dirección y co-dirección respectivamente, el trabajo experimental que recoge la Tesis Doctoral titulada: *"Estudio experimental de las propiedades funcionales de la corteza cerebral de un modelo animal de Lisencefalia: el ratón Lis1/sLis1"*, y que han revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo dando su conformidad para que la misma sea presentada a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en San Juan de Alicante, mayo de 2017

Emilio Geijo
Director

Salvador Martínez
Co-director

**Estudio experimental de las propiedades
funcionales de la corteza cerebral de un
modelo animal de Lisencefalia: el ratón
Lis1/sLis1.**



Autor: Eduardo Domínguez Sala

Directores: Dr. Emilio Geijo Barrientos y Dr. Salvador Martínez Pérez.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
1. Desarrollo temprano y filogenia de la corteza cerebral.....	6
2. Estructura de la neocorteza.....	10
2.1. Componentes celulares y estructura laminar de la neocorteza.....	10
2.2. Regionalización cortical.....	13
2.3. Conectividad cortical.....	15
2.3.1. Circuitos corticales.....	15
2.3.2. Sincronización cortical.....	17
2.3.3. Sincronización cortical y enfermedades mentales.....	18
3. Alteraciones corticales asociadas a defectos del desarrollo.....	19
3.1. Lisencefalia asociada a la alteración de LIS1.....	20
3.2. LIS1: estructura y función en el sistema nervioso central.....	21
3.3. Aprovechando las semejanzas: modelos animales para el estudio de LIS1.....	22
3.4. Nuevas perspectivas patológicas para LIS1.....	23
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Líneas transgénicas.....	29
1.1. Línea <i>Lis1/sLis1</i>	29
1.2. <i>Lis1/sLis1</i> x GAD67-GFP.....	29
2. Genotipado de las líneas transgénicas.....	30
2.1. Extracción de ADN.....	30
2.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	31
2.3. Electroforesis DNA.....	31
3. Registros electrofisiológicos in vitro en rodajas coronales de cerebro de ratón.	32

3.1.	Preparación de rodajas para registro electrofisiológico “ <i>in vitro</i> ”.....	32
3.2.	Soluciones extracelulares.....	33
3.3.	Equipo para registros electrofisiológicos en rodajas.	33
3.4.	Registros electrofisiológicos en rodajas y cuantificación de parámetros.	34
4.	Registros de potenciales de campo locales (LFP) <i>in vivo</i>	35
5.	Análisis estadístico.	36
RESULTADOS		37
1.	Sección primera. Propagación y propiedades de la actividad sincrónica epileptiforme (ASE) en la corteza cingular del ratón <i>Lis1/sLis1</i>	37
1.1.	Propagación de ASE a lo largo de la capa 2/3 del hemisferio ipsilateral al estímulo. 40	
1.2.	Propagación de la actividad sincrónica epileptiforme al hemisferio contralateral. 42	
1.3.	Modulación de la propagación de actividad sincrónica epileptiforme por CNQX. 45	
1.4.	Presencia de postdescargas oscilatorias.....	48
1.5.	Estudio de frecuencia de las postdescargas oscilatorias.	50
2.	Sección segunda. Estudio de las interneuronas de tipo <i>Fast-Spiking</i> en la corteza motora primaria del ratón <i>Lis1/sLis1</i>	55
2.1.	Estudio de las propiedades electrofisiológicas de las interneuronas de tipo <i>Fast-Spiking</i> en la corteza motora primaria.	55
2.2.	Estudio de las corrientes excitadoras post-sinápticas espontáneas (sEPSC) en células <i>Fast-Spiking</i> de la corteza motora primaria.	61
3.	Sección tercera. Estudio de la actividad eléctrica espontánea de la corteza cerebral mediante experimentos de registro “ <i>in vivo</i> ” en la corteza motora primaria de ratón <i>Lis1/sLis1</i>	65
3.1.	Estudio de la potencia de la actividad eléctrica de corteza motora primaria.	65
3.2.	Estudio de la coherencia de la actividad eléctrica de la corteza motora primaria. 67	

DISCUSIÓN	69
1. Estudio de las propiedades de la ASE en la corteza cingular del animal <i>Lis1/sLis1</i> . 69	
2. Estudio de las propiedades de las interneuronas de tipo <i>Fast-Spiking</i> en la corteza motora primaria del ratón <i>Lis1/sLis1</i>	74
3. Estudio de las propiedades de la actividad eléctrica cortical en la corteza motora primaria del ratón <i>Lis1/sLis1</i>	77
4. La corteza del ratón <i>Lis1/sLis1</i> como modelo de estudio de alteraciones asociadas al desarrollo cortical asociadas a enfermedades mentales.	78
CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	83



INTRODUCCIÓN

Una de las claves para la supervivencia de cualquier ser vivo reside en su capacidad de respuesta y adaptación a los distintos cambios que se producen tanto en el medio externo como en el interno. La gran diversidad de ambientes existente en nuestro planeta ha inducido la aparición de un amplio abanico de estrategias adaptativas en los distintos organismos que los habitan, con el fin de generar respuestas conductuales adecuadas a lo que ocurre en cada momento a su alrededor. De entre todas estas, el sistema nervioso de mamíferos, y en especial el de humanos, es considerada la más exitosa a la par que compleja (desde una perspectiva antropocéntrica). El sistema nervioso, a grandes rasgos, se divide en sistema nervioso periférico y sistema nervioso central. Este último se caracteriza por quedar confinado en el interior de un esqueleto óseo formado por columna vertebral y cráneo, los cuales protegen a médula espinal y cerebro respectivamente. De entre las distintas partes que forman el cerebro de mamíferos, la neocorteza o *isocortex* es considerada la más novedosa evolutivamente. Esta ha sufrido a lo largo de la filogenia de mamíferos un proceso de expansión, acompañado de una mayor complejidad tanto estructural como funcional (especialmente de mamíferos superiores), siendo su punto álgido la neocorteza de cetáceos, primates y en especial la del ser humano.

Dicha complejidad estructural y funcional es fruto de un incremento de la complejidad de los distintos eventos que intervienen en el desarrollo del sistema nervioso central, como son la diferenciación, proliferación y migración neuronal o la sinaptogénesis. El desarrollo del sistema nervioso comienza en etapas tempranas durante la gestación y puede alargarse hasta estadios postnatales. Alteraciones durante esta ventana temporal pueden modificar el adecuado progreso de los distintos fenómenos implicados en la formación del sistema nervioso central, lo cual puede tener consecuencias negativas sobre la estructura y función de este. Unas de las causas de alteraciones del desarrollo más comunes son las de origen genético, y de entre estas, aquellas relacionadas con la alteración de la migración neuronal han sido especialmente estudiadas durante la última década (Guerrini y Parrini, 2010). Un claro ejemplo de esto es la lisencefalia, la cual puede estar producida por la alteración de un grupo variado de genes, de entre los cuales el gen *PAFAH1B1*, el cual codifica para la proteína LIS1, es uno de los más estudiados. Aun así, a pesar de que se han desdeñado diversos aspectos sobre su función y las

consecuencias que conllevan su alteración sobre la estructura del cerebro (y en especial sobre la corteza cerebral), muy poco es sabido sobre las consecuencias funcionales (Reiner y Sapiro, 2013). Por tanto, el objetivo global de esta tesis doctoral es el estudio de las consecuencias funcionales sobre la corteza del ratón de la mutación de la proteína LIS1.

1. Desarrollo temprano y filogenia de la corteza cerebral.

Para una mayor comprensión de la localización y de la estructura de la corteza cerebral de los mamíferos y en concreto del ratón, es necesario entender en cierto grado su desarrollo. Los distintos eventos que llevan a la formación de estructuras diferenciadas en el sistema nervioso de vertebrados comienzan tras la formación del tubo neural, estructura alargada, hueca y no diferenciada, formada como fruto del plegamiento y cierre del ectodermo neural. La regionalización del tubo neural se produce gracias a la acción de determinadas estructuras, de localización discreta a lo largo del tubo neural, conocidas como organizadores secundarios. Estos organizadores secretan moléculas difusibles al medio extracelular denominadas morfógenos, las cuales forman gradientes de concentración, produciendo una inducción diferencial a lo largo del tubo neural que conlleva el establecimiento de los patrones de diferenciación antero-posterior y dorso-ventral (Martínez y col., 2012). Esta inducción diferencial básicamente se trata de una activación de distintos programas moleculares a lo largo del tubo neural que inducen una paulatina diferenciación en las distintas partes que conformaran el cerebro adulto (Figura I.1).

Así, la porción rostral del tubo neural queda rápidamente diferenciada en una estructura conocida como prosencéfalo, que posteriormente se diferencia en prosencéfalo secundario y diencéfalo (Figura I.1C). El prosencéfalo secundario a su vez se diferencia en una porción rostral y otra caudal, dando lugar esta última al telencéfalo (Figura I.1D y Figura I.1E). El telencéfalo a su vez se diferencia en dos porciones, una rostral o subpalio y otra caudal o palio (Puelles y col., 2000; Puelles y col., 2013).

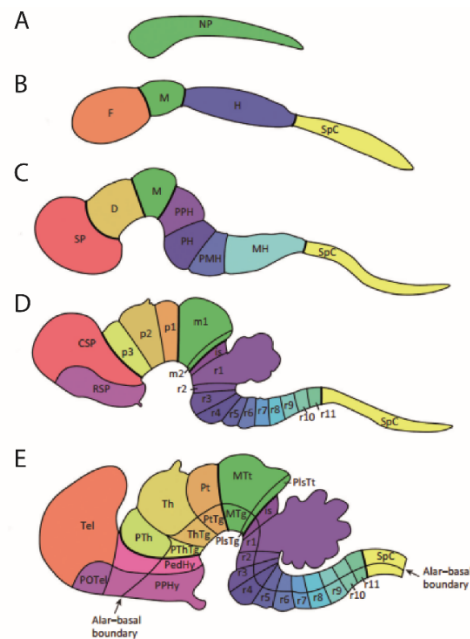


Figura I.1. Modelo de regionalización del tubo neural en mamíferos. **A)** Tubo neural no diferenciado. **B)** Primera regionalización anteroposterior en prosencéfalo (F), mesencéfalo (M), rombencéfalo (H) y médula espinal (SpC). **C)** Segmentación del prosencéfalo en prosencéfalo secundario (SP) y diencéfalo (D). Segmentación del rombencéfalo en regiones prepontina (PPH), pontina (PH), pontomedular (PMH) y medular (MH). **D)** Segmentación del prosencéfalo secundario en prosencéfalo secundario rostral (CSP) y caudal (RSP). Segmentación del diencéfalo en los prosómeros 1 (p1; pretecho), 2 (p2; tálamo) y 3 (p3; pretálamo). Segmentación del mesencéfalo en los mesómeros 1 (m1) y dos (m2). Nueva segmentación del rombencéfalo en distintos segmentos denominados rombómeros (r1-r11), incluido el rombómero 0 o istmo (is). **E)** Segmentación del prosencéfalo rostral para producir el área preóptica y la porción rostral del hipotálamo (PPHy). El prosencéfalo caudal se segmenta en un área dorsal que dará lugar al telencéfalo y una ventral que dará lugar a la porción caudal del hipotálamo (PedHy). En el resto del tubo neural se hacen más acusadas las diferenciaciones en el eje dorsoventral. Adaptado de Puelles y col., 2013.

El palio a su vez se diferencia dando lugar a varias subdivisiones: palio medial, palio dorsal, palio lateral, palio ventral y zonas amigdalinas. Aquí empezamos a encontrar diferencias a lo largo de la filogenia de vertebrados. De hecho se cree que fue algún ancestro del grupo de los reptiles el primero en presentar este esquema de divisiones (Figura I.2A y B). La idea más aceptada es la que postula que el palio dorsal, del cual deriva la neocorteza, surgió del límite entre el palio medial y palio lateroventral en algún punto de la evolución y que este ha sufrido un paulatino proceso de expansión y estratificación a lo largo de la filogenia de vertebrados (Figura I.2. C y D, esquema en aves y mamíferos respectivamente), dando lugar a lo que hoy conocemos como la neocorteza o *isocortex* de seis capas (Puelles, 2001; Palomero-Gallagher y Zilles, 2004).

El palio medial da lugar a hipocampo, subículo, corteza entorinal y corteza retrosplenial (Witter y Amaral, 2004). Por último, el palio ventral-lateral da lugar a áreas olfativas y amígdala (Medina y col., 2004).

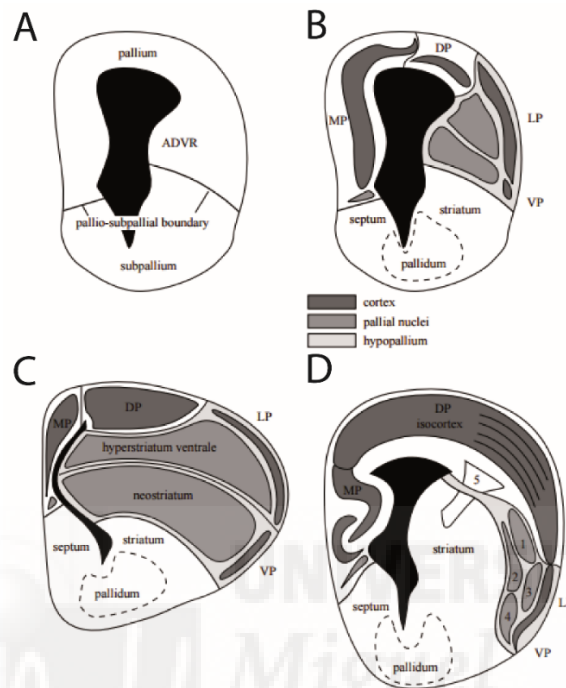


Figura 1.2. Esquema de la relación palio-subpalio en reptiles (A, B), aves (C) y mamíferos (D). A-B) Esquema de la relación palio-subpalio y las distintas divisiones dentro de estas regiones en un hipotético cerebro de reptil ancestral. C) Esquema de la regionalización de palio y subpalio del cerebro de aves. D) Esquema de la regionalización de palio y subpalio del cerebro de mamíferos. DP: palio dorsal; LP: palio lateral; MP: palio medial; VP palio ventral. Adaptado de Puelles, 2001.

Otro punto clave en la formación de la neocorteza es la expansión de las vesículas telencefálicas, la cual se debe fundamentalmente a dos procesos: proliferación y migración neuronal. En la zona ventricular (VZ) del palio dorsal se encuentra las células pluripotenciales que forman el epitelio neural, estas dan lugar a distintos tipos de progenitores, algunos de los cuales, tras sucesivas divisiones asimétricas y simétricas ocurridas en la VZ o en la zona subventricular (SZ), darán lugar a neuronas. En este nicho se produce la mayor parte de las neuronas que formaran el *neocortex*. Estas neuronas se diferenciarán mayoritariamente en neuronas piramidales, las cuales forman alrededor de un 80% de las neuronas de la neocorteza. Otro elemento clave es la glía radial, que aparte de ser un progenitor neuronal, emite proyecciones que se anclan tanto en la zona ventricular como las meninges, actuando como guía para que las neuronas producidas en

las VZ y SZ migren hacia la superficie pial. Así, tras sucesivos eventos de división y migración se va formando la estructura laminar típica del *neocortex*, siguiendo el patrón de formación de “dentro-fuera”. Este consiste en la formación y migración radial (desde regiones ventriculares a regiones piales) de neuronas que darán lugar a las neuronas piramidales de capas profundas en primer lugar para que después lo hagan las de capas más superficiales, atravesando las primeras, formándose así la típica estructura laminar en 6 capas que conforma la corteza completamente desarrollada (Nadarajah y Parnavelas, 2002; Rackic, 2009).

El gran grupo de neuronas corticales, conocido como interneuronas, procede de distintos nichos proliferativos localizados en el subpalo: eminencia ganglionar medial (MGE), eminencia ganglionar lateral (LGE) y el área preóptica (POA; (Gelman y Marín, 2010). En la zona ventricular de estas regiones subpiales, de forma semejante a lo descrito previamente para los precursores de las neuronas piramidales, el neuroepitelio da lugar a diversos tipos de progenitores que a su vez darán lugar a los distintos tipos de interneuronas. Estas, en primer lugar migrarán desde sus respectivos nichos subpiales hasta la SZ pial, proceso también facilitado por la glía radial presente en dichos nichos, alcanzando así las zonas ventriculares del palio dorsal. Este proceso se conoce como migración tangencial. Tras esto, siguen una ruta de migración radial (similar a la descrita para neuronas piramidales), distribuyéndose así en las distintas capas corticales (Nadarajah y Parnavelas, 2002; Marín y Ulrich, 2014). Durante los eventos de proliferación y migración neuronal resulta clave la participación del citoesqueleto y específicamente de los microtúbulos, que más allá de la visión clásica de mero elemento estructural, posee un papel fundamental como componente dinámico durante la migración, la división y la diferenciación celular (Kapitein y Hoogenraad, 2015). Así pues, tanto los elementos estructurales que conforman los microtúbulos como los diversos complejos proteicos asociados que regulan el desarrollo de sus diversas funciones, son elementos clave. Alteraciones en cualquiera de estos conllevan disrupciones drásticas en el desarrollo cortical, siendo un claro ejemplo las mutaciones en la tubulina alfa 1A o en la proteína LIS1 (Guerrini y Parrini, 2010).

2. Estructura de la neocorteza.

La corteza cerebral es la región más extensa y compleja del cerebro de mamíferos y se divide en tres regiones claramente diferenciadas en base a su estructura: el *isocortex* (o neocortex), el archicortex y el paleocortex. El *isocortex* o *neocortex* está formado por una capa relativamente fina de materia gris que recubre los hemisferios cerebrales y que en mamíferos superiores presenta una forma rugosa e irregular muy característica formando giros y circunvoluciones (Valverde, 2002).

2.1. Componentes celulares y estructura laminar de la neocorteza.

El *neocortex*, al igual que el resto del SNC, está compuesto por diversos tipos celulares, que generalmente se suelen agrupar en dos grandes y heterogéneos grupos: neuronas y glía. En nuestro caso nos centraremos en introducir las células nerviosas debido a la naturaleza de los diversos objetivos de este trabajo de investigación. Desde finales del siglo XIX se tiene la certeza de que existe una variabilidad importante de células neuronales en la corteza cerebral del SNC de mamíferos, que siempre se ha tratado de clasificar, de forma más o menos acertada, dependiendo de la información disponible en cada momento (Lorente de Nó, 1941; Valverde, 2002; Kirkdaile, 2012). Desde hace varias décadas las células neuronales de la neocorteza se suelen clasificar en dos grandes grupos previamente mencionados: neuronas excitadoras y neuronas inhibitoras.

Las neuronas excitadoras suponen alrededor de un 80-90% de las neuronas de la neocorteza, son abundantes en todas las regiones y capas de esta, exceptuando la capa 1. La mayor parte de este grupo está formado por las neuronas piramidales. Estas se caracterizan por presentar un árbol dendrítico más o menos ramificado que presenta numerosas espinas sinápticas (estructuras especializadas para la formación de sinapsis generalmente excitadoras) y un axón que forma proyecciones locales y no locales, proyectando a otras regiones corticales, al hemisferio contralateral e incluso a estructuras subcorticales, formando la sustancia blanca. En cualquier caso, siempre forma sinapsis excitadoras mediadas por el neurotransmisor glutamato con las células diana. Las sinapsis que reciben son mayormente excitadoras, localizándose estas en las espinas dendríticas. Las sinapsis de tipo inhibitor que reciben suelen tener como diana el eje dendrítico, el soma y la porción inicial del axón de las células principales, aunque también

lo pueden hacer en el árbol dendrítico. Presentan una variedad de tamaños considerable, aunque por lo general siguen un mismo patrón morfológico: dendrita apical que siempre proyecta a capas superiores (con mayor o menor ramificación), soma con forma de pirámide, dendrita basal y axón de proyección desde a capas inferiores hasta médula espinal, pudiendo dejar colaterales en otros puntos del cerebro (Lorente de Nó, 1941; De Felipe y Fariñas, 1992).

El otro gran grupo de neuronas excitadoras está formado por las células estrelladas. Reciben dicha denominación por su morfología y presentan rasgos similares a las neuronas piramidales, tanto a nivel morfológico como fisiológico. Se localizan mayormente formando la capa IV de regiones sensoriales de corteza, recibiendo una considerable inervación por parte de las aferentes talámicas. No presentan dendrita apical, la cual desaparece durante el proceso de maduración, pero por el contrario presentan una gran cantidad de espinas dendríticas. Poseen un soma de forma globular, redondeada, del cual surge un axón de proyección local, del cual surgen numerosas colaterales que forman sinapsis en distintos tipos de neuronas de capas superiores. Como las células piramidales, forman sinapsis excitadoras (Valverde 2002; Kirkcaldie 2012).

Distintas poblaciones de células excitadoras se disponen formando estratos más o menos uniformes generando la característica estructura laminar en 6 capas de la neocorteza cerebral ya descrita por Lewis en 1878. A pesar de que detallados estudios sobre la composición de estas capas viene realizándose desde tiempos de Santiago Ramón y Cajal y Camillo Golgi a finales del siglo XIX (Lorente de Nó, 1941), hoy en día todavía siguen dilucidándose detalles de cierta relevancia sobre su estructura y composición celular. Seguidamente se exponen uno de las más actuales revisiones las distintas capas y la composición de estas en la corteza de ratón (propuesto en *The Mouse Nervous System*, 2012):

- **Capa 1 (Plexiforme o Molecular).** Capa más superficial, situada bajo las meninges. Se encuentra formada mayormente por multitud de proyecciones axónicas procedentes de diversas localizaciones (tanto corticales como subcorticales) y proyecciones dendríticas procedentes de capas inferiores. Sustancialmente menos poblada (en términos celulares), presenta una población característica de esta capa, las células de Cajal-Retzius. Presenta, a diferencia del resto de capas, una mayor proporción de células inhibitorias que excitadoras.

- **Capa 2/3 (Piramidal supragranular).** Recibe este nombre ya que se asume la idea de que esta capa es la homóloga a las capas 2 y 3 en mamíferos superiores, encontrándose fusionadas en el ratón. Presenta una población de pequeñas células piramidales involucradas en circuitos corticales locales y distales. La dendrita apical de este tipo de células proyecta a capa 1 y su axón generalmente a capa 5. Esta capa presenta aferencias corticocorticales (callosas e intrahemisféricas) además de presentar dendritas apicales de neuronas piramidales de capas inferiores. También hay un significativo número de células de axón corto o interneuronas de tipo cesto y candelabro.

- **Capa 4 (Granular).** Su presencia y tamaño está relacionado con la función de cada región cortical, siendo más notable en regiones de función sensorial, ya que está altamente ligada a la presencia de aferencias sensoriales procedentes del tálamo. La población celular característica de esta capa son las células estrelladas espinosas, las cuales reciben una gran cantidad de sinapsis de fibras talámicas. Esta capa presenta característicamente una gran cantidad de dendritas apicales procedentes de capa 6.

-**Capa 5 (Piramidal profunda).** Presenta diversos tipos de neuronas piramidales de tamaño variable (generalmente mayor al del resto de capas) cuyo axón proyecta a otras zonas corticales y subcorticales, con una prominente dendrita apical que proyecta a capas superiores.

-**Capa 6 (Polimórfica).** Capa de grosor considerable que presenta diferentes morfologías de células piramidales. Se caracteriza por una fuerte proyección recíproca a núcleos talámicos, además de distintas proyecciones corticocorticales tanto locales como distales. Por debajo de esta existe también otra capa que suele diferenciarse en composición celular y proyecciones, y que recibe distintos nombre: capa 6B, capa 6 profunda, o incluso capa 7. Posee una cantidad pobre de células piramidales que emiten proyecciones corticocorticales, o bien ipsilaterales a capa 1, o a través del cuerpo calloso.

El segundo grupo de neuronas es el formado por las neuronas inhibitoras, un grupo muy heterogéneo en cuanto a morfología, propiedades electrofisiológicas, origen embrionario y distribución a lo largo de la corteza. Se caracterizan generalmente por formar sinapsis inhibitoras mediadas por el neurotransmisor GABA y por poseer un axón de proyección local, el cual forma contactos no espinosos sobre el eje dendrítico, soma o porción proximal del axón de otras neuronas, pudiendo controlar la excitabilidad en distintos

puntos. Además, la gran diversidad de propiedades electrofisiológicas en este grupo se traduce en una amplia gama de tipos de respuesta frente a un mismo estímulo. Esto, unido a la mayor eficiencia de las sinapsis inhibitoria, hace que las interneuronas sean consideradas como el elemento dinamizador de los circuitos neuronales (Markram y col., 2004). Históricamente se han considerado distintos grupos de interneuronas en base a la morfología de su axón (Lorente de Nó, 1941), a la expresión de marcadores moleculares (Hendry y Jones, 1991) o a sus propiedades electrofisiológicas (Kawaguchi y Kubota, 1997), pero aunque alguno de los grupos obtenidos en los distintos tipos de clasificación pueden solapar considerablemente, no siempre ocurre así (Petilla Interneuron Nomenclature Group, 2008). Recientemente se ha propuesto una nueva clasificación que establece tres grupos no solapantes de interneuronas que expresan los marcadores moleculares parvalbúmina (PV), somatostatina (SST) y la subunidad 5HT3a del receptor ionotrópico de serotonina, los cuales abarcarían casi la totalidad de las interneuronas corticales, aunque a su vez estos estarían compuestos por subgrupos con diversas propiedades morfológicas, electrofisiológicas y moleculares (Rudy y col., 2011).

2.2. Regionalización cortical.

Aunque el patrón de estratificación en 6 capas previamente descrito se conserva a groso modo a lo largo de toda la neocorteza, un rasgo característico de la neocorteza es su regionalización en distintas zonas de estructura y función diferentes (Figura 13). De hecho, hace ya más de un siglo que se determinaron sustanciales diferencias en cuanto a la citoarquitectura entre distintas zonas, quedando patente una clara regionalización (Campbell, 1905; Brodmann, 1909; según Lorente de Nó, 1941). Estos primeros estudios fueron mejorados drásticamente con la incorporación de una gran cantidad de información detallada sobre las proyecciones nerviosas presentes en cada región (aportes realizados mayormente por la escuela de Cajal mediante el uso de su variación de la tinción de Golgi; Lorente de Nó, 1941). Existen numerosos estudios que han revelado cierta información sobre cómo se produce este proceso, el cual al parecer se debe a un conjunto de mecanismos intrínsecos y extrínsecos a la propia corteza.

Ciertas evidencias apuntan a una temprana determinación de la identidad de cada región, y a que esta viene marcada durante los procesos de proliferación y migración neuronal. De hecho la hipótesis más aceptada hoy día, conocida como Hipótesis de la Unidad Radial, propone que existe una diferenciación entre las células pluripotenciales situadas en la zona ventricular, incluso desde antes de que se produzca los procesos de

neurogénesis y migración neuronal. Cada uno de estos progenitores sería capaz de generar las diferentes poblaciones de neuronas que forman una misma columna, las cuales migrarán radialmente diferenciándose posteriormente (Rakic, 2009; Marin y Müller, 2014). Esto indica que ya existen ciertos factores determinantes de la regionalización a nivel del epitelio neural. Una de las cuestiones que, sorprendentemente, permanece abierta hoy día es si el número de neuronas descendientes de progenitores neurales se mantiene constante entre distintas áreas. En 1980 Rockel y colaboradores determinaron que el número de neuronas para una sección columnar dada permanencia constante entre distintas regiones corticales y este se conservaba a lo largo de la filogenia. Tras esto, tuvo lugar la aparición de diversos estudios corroborando y contradiciendo totalmente este resultado, abriendo así un largo debate (Rakic 2008). Durante la pasada década, casi 30 años después, y a pesar de los avances técnicos, se seguían publicando estimaciones totalmente contradictorias en este aspecto (Herculano-Houzel y col., 2008; Nikoosh Carlo y col., 2012).

Por otro lado Wise y Jones en 1978 demostraron que para el desarrollo completo de la corteza somatosensorial de la rata era necesaria la llegada a esta de la proyección talamocortical, aunque alrededor de dos décadas después se determinó que en el ratón mutante *Gbx2^{-/-}*, el cual carece de proyección talamocortical, conservaba la expresión de factores de transcripción inductores de la regionalización cortical (Miyashita-Lin y col., 1999). Esto evidencia que existen distintos factores tanto intrínsecos como extrínsecos a la corteza cerebral que determinan su regionalización. Por tanto procesos como división celular, migración, diferenciación e incluso la formación de conexiones sinápticas tienen cierta importancia durante el proceso de regionalización, procesos en los que el citoesqueleto y en concreto la proteína LIS1 juega un papel fundamental (Reiner y Sapiro, 2013).

El patrón de regionalización, aparte de encontrarse altamente conservado entre individuos de una misma especie, ha sido ampliamente estudiada a lo largo de la filogenia de mamíferos quedando patente un cierto nivel de homología entre distintas especies (Caviness, 1975). Esto queda corroborado con la presencia de áreas claramente definidas a lo largo de la filogenia de mamíferos con la misma función y estructura y conectividad similares, como es el caso de la corteza motora, somatosensorial o visual. A pesar de esto, también existen rasgos únicos que responden a especializaciones adaptativas de cada especie. Un claro ejemplo es el patrón de regionalización del cerebro humano, el cual es

altamente complejo y revela la presencia de áreas únicas a lo largo de la filogenia. Un claro ejemplo de esto son las áreas de Broca y Wernicke, funcionalmente relacionadas con el lenguaje (Aboitiz y Garcia, 1997).

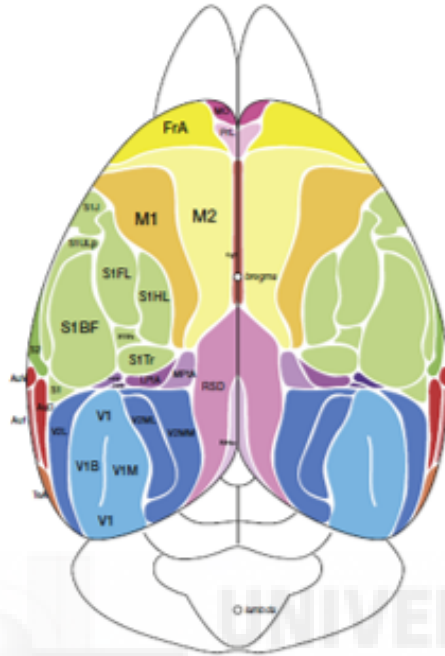


Figura I.3. Regionalización de la corteza cerebral del ratón. Esquema que representa la corteza del ratón en el cual podemos observar las distintas regiones propuestas. Esta regionalización se basa tanto en estudios anatómicos como funcionales. Cabe destacar como las regiones somatosensorial (tonos verdes) motora (tonos naranja y amarillo) y visual (tonos azules) ocupan una gran proporción del *neocortex* del ratón (imagen adaptada de *The Mouse Nervous System 2012*).

2.3. Conectividad cortical.

La corteza cerebral, de la misma forma que otras partes del cerebro, está formada por una red interconectada de neuronas que actúan de manera conjunta formando el sustrato físico-químico de los distintos procesos cognitivos. Por tanto, una de las cuestiones más relevantes en el estudio de la corteza es cómo las neuronas se encuentran interconectadas, es decir, cómo se organizan los circuitos corticales.

2.3.1. Circuitos corticales.

Dos hallazgos, ambos desarrollados de forma paralela por el laboratorio de Cajal, sentaron las bases para la aparición de las primeras hipótesis sobre la existencia de un circuito cortical en la corteza cerebral de mamíferos. El primero de ellos fue el establecimiento de la neurona como unidad fundamental del sistema nervioso, lo cual

sugirió directamente la necesidad de una coordinación entre estos elementos. El segundo, la aparición de los primeros análisis detallados sobre las proyecciones axonales y dendríticas contenidas en la corteza, los cuales revelaban la conservación de ciertos patrones conectivos. De ambos emerge una idea conjunta: las neuronas son elementos independientes que están conectados siguiendo ciertos patrones conservados, lo que sugiere un circuito para la transmisión del impulso nervioso. De hecho, la primera hipótesis sobre la estructura de un circuito cortical más o menos definido y relativamente generalizado, fue propuesta por uno de sus discípulos, Rafael Lorente de Nó (Lorente de Nó, 1941). Este, basándose exclusivamente en el estudio morfológico de las proyecciones neuronales, describió una organización funcional elemental. La descripción propone una organización funcional columnar formada por células de las distintas capas corticales las cuales presentan una alta densidad de conexiones específicas entre sí. Esta unidad elemental sería capaz de recibir impulsos eléctricos a través de fibras aferentes (procedente de tálamo y corteza mayormente), procesarlos y emitir una respuesta hacia otras regiones del cerebro. Esta hipótesis fue corroborada a nivel funcional casi dos décadas después en corteza somatosensorial de gato (Mountcastle, 1957) y poco más tarde, corteza visual de este mismo animal (Hubel y Wiesel, 1962). Posteriormente esta organización columnar también fue encontrada en áreas motoras y auditivas, lo que llevo a la propuesta del concepto de la columna como unidad funcional de la corteza cerebral (revisado por Mountcastle, 1997). Sin embargo, observaciones posteriores han determinado que dicho patrón columnar, tanto a nivel funcional como anatómico, no es extensible a toda la corteza y que este tampoco es una norma general a lo largo de la filogenia (Lund y col., 2003; Horton y Adams, 2005). Aunque estos autores no rechazan que el concepto de columna como unidad funcional (con su respectivo sustrato anatómico) se ajuste correctamente a ciertas regiones corticales, rechazan asumirlo como una propiedad general de la corteza cerebral.

En 1989 Douglas y Martin propusieron un nuevo modelo: el microcircuito cortical. En contra de la visión de circuito descrita para la columna cortical que postula un flujo lineal de la información entre las distintas capas corticales, en el que dicho flujo viene determinado mayormente por la intensidad del impulso recibido por la columna, dichos autores propusieron una unidad funcional mucho más discreta, formada por conexiones recurrentes entre piramidales y/o interneuronas, formando circuitos de retroalimentación entre ellas. Este modelo explica mejor dos rasgos característicos de los circuitos locales

que han sido determinados de manera experimental y se han encontrado en todas las áreas de corteza estudiadas. En primer lugar es capaz de explicar el balance entre excitación e inhibición que reina en el *córtex* teniendo en cuenta las proporciones de este tipo de neuronas entre sí. En segundo lugar es capaz también de explicar cómo el circuito local puede modificar la ganancia de los distintos impulsos que recibe (Douglas y Martin, 2010).

Más allá de las proyecciones que forman el circuito local y que determinan el flujo del impulso en la columna cortical, existe una gran conectividad entre distintas zonas de una misma región y a su vez entre distintas regiones. Ateniéndonos a las vías de conexión de mayor tamaño se puede establecer claramente una jerarquía en el flujo de la información entre las distintas áreas que participan en una misma modalidad sensorial. Paralelamente a estas vías principales, existen conexiones recíprocas, más discretas, entre dichas áreas, lo cual responde a las complejas necesidades del procesamiento de la información. Así, a medida que se asciende jerárquicamente los niveles de procesamiento son cada vez más complejos, implicando una mayor cantidad de información. El tipo de conexiones corticocorticales que median este tipo de interacciones son mayormente excitadoras y proceden de neuronas piramidales de capas superiores, siendo una sola neurona de capa 2 de corteza visual capaz de proyectar a la vez a distintas áreas corticales (Felleman y Van Essen, 1991). Ese tipo de conexiones llegan a conectar zonas muy lejanas de la corteza. Un claro ejemplo son aquellas que forman el cuerpo calloso, comisura formada por axones mayoritariamente excitadores y procedentes de neuronas piramidales de la capa 2/3 que generalmente forman sinapsis en regiones homotópicas del hemisferio contralateral (Yorke y Caviness, 1975).

2.3.2. Sincronización cortical.

Como hemos descrito anteriormente, el componente nervioso de la corteza cerebral está compuesto por un gran número de neuronas de muy diversos tipos y características que se organizan en circuitos siguiendo ciertos patrones repetitivos a lo largo de la corteza. Uno de los rasgos más característicos de los circuitos corticales es el de mediar la sincronización entre las distintas neuronas que lo componen generando distintos patrones de actividad implicados en distintos procesos cognitivos (Connors y Amitai, 1995). Un claro ejemplo de esto es la actividad oscilatoria cortical. La actividad oscilatoria cortical consiste en el disparo coordinado de una población de neuronas a una determinada frecuencia, lo cual genera variaciones sinusoidales en el potencial de campo a dicha

frecuencia determinada. Aunque los primeros estudios realizados durante las primeras décadas del siglo XX asociaban este tipo de actividad a estados inconscientes o patológicos, el desarrollo de nuevas metodologías para su inducción, manipulación y registro, así como el descubrimiento de su implicación en distintos procesos cognitivos, han hecho resurgir el interés en su estudio. La actividad oscilatoria se clasifica en los siguientes intervalos o bandas de frecuencia: 0-4Hz, banda delta; 4-8Hz, banda theta, 8-13Hz banda alfa, 13-30Hz banda beta, 30-100Hz banda gamma; >100Hz oscilaciones ultra-rápidas (Buzsaki y Draguhn, 2004). Aunque no se pueden relacionar distintos intervalos de frecuencia en la actividad oscilatoria con procesos cognitivos concretos, generalmente se asocia la actividad de bajas frecuencias y grandes amplitudes a estados de reposo o sueño, la cual se propaga por una gran parte de la corteza. Sin embargo, oscilaciones de media o altas frecuencias, baja amplitud y que emerge en zonas muy localizadas de la corteza, se suelen relacionar con procesos cognitivos llevados a cabo en estado consciente (Wang, 2010). Estas bandas de frecuencia, aunque están basadas en evidencias experimentales, no han de ser tomadas como fronteras inviolables, encontrándose conservadas a lo largo de la filogenia de mamíferos (Buzsaki y Watson, 2012). En el hipocampo, donde distintas poblaciones neuronales se caracterizan por sincronizarse claramente en el rango theta, se ha observado en distintas especies que esta puede llegar a superar los 10Hz (Bland, 1986).

La actividad oscilatoria, sino en todo el espectro de frecuencias por lo menos en gran parte de él, viene determinada por la frecuencia en la que interneuronas gabaérgicas emiten impulsos sobre grupos concretos células piramidales, las cuales alternan periodos de excitación en los que disparan de forma coordinada con periodos de inhibición. Este grupo de piramidales puede a su vez emitir un impulso coordinado sobre otra población, transmitiendo ese patrón temporal de actividad. Este mecanismo básico de sincronización de poblaciones neuronales ha sido sugerido como una de las posibles formas en las que la información puede codificarse en los circuitos corticales y ser transmitida entre estos a lo largo de la corteza (Buzsaki y Watson, 2012).

2.3.3. Sincronización cortical y enfermedades mentales.

Desde mediados del siglo XX se ha venido determinando la presencia de anomalías en las propiedades de la actividad oscilatoria así como en la capacidad de sincronización de distintas regiones corticales en pacientes con distintos trastornos cerebrales (Fenton, 1977; Kam y col., 2013; Brealey y col., 2014). Esta anomalía se ha ido asumiendo como

obvia a medida que se ha ido conociendo la etiología de muchos de estos trastornos. En términos generales, las alteraciones descritas afectan al número de neuronas, su distribución o a la conectividad entre estas, y en muchas ocasiones relacionadas con el componente inhibitorio de los circuitos corticales (Marín, 2012). Por ejemplo, se ha determinado la reducción de la población de neuronas positivas para el marcador GAD67 (marcador molecular general para interneuronas) en la corteza prefrontal de pacientes de trastorno bipolar y esquizofrenia, presentando estos últimos también una reducción de la expresión en la subunidad NR2A del receptor de NMDA (Woo y col., 2002). Además, también se ha determinado una distribución anómala de distintos tipos de interneuronas en la corteza cingular de individuos que presentaban depresión profunda, trastorno bipolar o esquizofrenia (Cotter y col., 2002). Ya que la aparición y características actividad oscilatoria dependen en gran parte del componente inhibitorio, no es descabellado que en distintos trastornos neurológicos se haya determinado una alteración de este tipo de actividad. Por tanto el estudio de los componentes del circuito cortical, así como estos se organizan y sincronizan es necesario para entender su funcionamiento en situaciones normales y patológicas, lo cual puede sentar la base para el desarrollo de nuevas terapias (Marín, 2012; Buzsaki y Watson, 2012).

3. Alteraciones corticales asociadas a defectos del desarrollo.

El desarrollo cortical ocupa una ventana temporal que en mamíferos se extiende más allá del nacimiento. Durante este proceso se suceden los complejos eventos de proliferación, migración, diferenciación y sinaptogénesis, los cuales están finamente regulados y en los que intervienen diversos factores genéticos y ambientales. Cualquier tipo de modificación en alguno de estos es capaz de desembocar en un amplio espectro de alteraciones corticales con diversas consecuencias (Stolp y col., 2011).

Durante las últimas décadas se ha producido un gran avance en el entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo cortical, lo que unido a una mejora en las técnicas de diagnóstico (sobre todo genéticas y de imagen) ha permitido una mayor comprensión de la relación entre una determinada alteración genética y sus consecuencias fenotípicas. Esto ha dado lugar a sucesivas clasificaciones de las malformaciones corticales asociadas a anomalías del desarrollo en las que se relaciona un determinado fenotipo morfológico y funcional con su causa genética, señalando además en que proceso del desarrollo cortical está involucrado dicho gen (Barkovich y col., 2001; Barkovich y

col., 2005), facilitando mucho más la comprensión de la naturaleza de dicha alteración y por tanto el diseño de tratamientos más adecuados.

En la última clasificación de malformaciones corticales asociadas a alteraciones del desarrollo propuesta por Barkovich y colaboradores se establecen 4 categorías, una de las cuales corresponde a las malformaciones debidas a alteraciones en la migración neural. De entre las distintas malformaciones corticales debidas a alteraciones en la migración neural, una de las más documentadas y estudiadas es la lisencefalia (Dobyns y col., 1985; Dobyns y col., 1999; Matsumoto y col., 2001; Bi y col., 2009). Bajo la denominación de lisencefalia se agrupan un conjunto de alteraciones que tienen como denominador común una disrupción en la formación de los giros y circunvoluciones corticales. Esta puede aparecer como consecuencia de la alteración de distintos genes que codifican para proteínas relacionadas de algún modo u otro con el proceso de migración neural. Un típico ejemplo de estas son la proteína LIS1, Doblecortina (DCX), Reelina (RELN), o ARX (Guerrini y Parrini, 2010). De entre estas, la proteína LIS1 ha sido una de las más estudiadas debido a su importancia de distintos procesos biológicos y sus implicaciones clínicas (Reiner y Sapir, 2013).

3.1. Lisencefalia asociada a la alteración de LIS1.

La proteína LIS1 fue descubierta a principios de los años 90 durante la búsqueda de alteraciones genéticas en enfermos de síndrome de Miller-Dieker, los cuales se caracterizan por presentar una clara lisencefalia, acompañada de una típica malformación facial y severo retraso cognitivo (Reiner y col., 1993). Poco después se determinó que dicho síndrome era en realidad una enfermedad poligénica y que la alteración en LIS1 era responsable de producir el fenotipo lisencefálico de forma aislada (Lisencefalia tipo 1) al resto de rasgos fenotípicos del síndrome de Miller-Dieker (LoNigro y col., 1997). La Lisencefalia tipo I es una enfermedad rara (1:30.000 nacimientos) y se caracteriza por presentar una grave displasia cortical que se manifiesta con una acentuada paquigiria (disminución en el número de giros y circunvoluciones corticales, acompañados de un aumento de su tamaño), llegando en los casos más graves a una agiria (ausencia de giros y circunvoluciones) parcial o total, a lo que subyace una pérdida de la estructura laminar de la corteza. Esto viene acompañado de crisis epilépticas severas y recurrentes de muy difícil tratamiento y que conllevan un deterioro cognitivo paulatino que se suma al ya

producido por la propia alteración de la corteza (Dobyns y col., 1993). Por lo general los pacientes que presentan esta enfermedad poseen muy mal pronóstico, con una esperanza de vida de unos pocos años, en el mejor de los casos.

3.2. LIS1: estructura y función en el sistema nervioso central.

La proteína LIS1 se encuentra codificada por el gen PFAFH1B1, formado por 11 exones y localizado en el brazo corto del cromosoma 17 en humanos (Reiner y col., 1993; LoNigro y col., 1997). Esta región cromosómica es conocida como región crítica de la lisencefalia (LCR), la cual se caracteriza por presentar varios locus relacionados con el desarrollo y función del sistema nervioso además de presentar una alta tasa de mutación (Chong y col., 1997; Tabarés-Seisdedos y col., 2006). LIS1 está compuesta por 410 aminoácidos, presentando en su extremo amino-terminal un dominio LisH que media la homodimerización de ella misma, su forma funcional. Por otro lado, su extremo carboxilo-terminal presenta un dominio formado por 7 repeticiones triptófano-aspartico (WD), cuya función es la interacción proteína-proteína, pero en este caso con proteínas diana (Reiner y col., 2002). Por otro lado LIS1 posee un alto nivel de expresión en el SNC el cual se encuentra finamente regulado durante el desarrollo (Reiner y col., 1995; Escámez y col., 2012), lo que hace prever el papel fundamental de LIS1. A grandes rasgos se puede decir que posee dos funciones diferenciadas; por un lado actúa como regulador del motor molecular Dineína y por otra parte participa como la subunidad reguladora de la enzima acetil-hidrolasa del factor de agregación plaquetaria (PAF-AH) la cual regula los niveles fisiológicos del factor de agregación plaquetaria (PAF. Hattori y col., 1994). El motor molecular Dineína está formado por una proteína de alto peso molecular (500kDa), la cual interacciona con los microtúbulos del citoesqueleto para mediar distintas funciones, como por ejemplo la estabilización y dinamismo de estos durante distintos procesos como la división celular, la migración neuronal o la motilidad ciliar, además de ser el responsable del transporte retrógrado asociado a microtúbulos, mediando LIS1 la unión de Dineína a estos (Wynshaw-Boris y Gambello, 2001; Roberts y col., 2013). En base a esto, las alteraciones presentes en cerebros lisencefálicos han sido achacadas a errores en la regulación de LIS1 sobre Dineína (Wynshaw-Boris y Gambello, 2001). Por otro lado, existen evidencias de que el nivel fisiológico de PAF juega un papel importante en del desarrollo y función del SNC. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que PAF presenta una actividad regulatoria sobre la migración neuronal (Bix y Clark,

1998) y que esta puede ser debida a un efecto sobre la estabilidad de los microtúbulos (Gopal y col., 2009). Además, PAF puede actuar como modulador de sinapsis excitatorias durante la formación de potenciación a largo plazo (LTP. Clark y col., 1992).

3.3. Aprovechando las semejanzas: modelos animales para el estudio de LIS1.

Un paso importante en el estudio de la función de LIS1 y su implicación patológica ha sido la creación de distintos modelos animales. En 1998 Hirotsune y colaboradores desarrollaron el primer modelo experimental en ratón para el estudio de la proteína LIS1. Este animal carece de uno de los alelos que codifica para LIS1 provocando una reducción en la expresión de esta proteína de alrededor de un 50%. En este mismo trabajo se mostró que el desarrollo normal de la neocorteza e hipocampo son sensibles a la reducción de la dosis de LIS1, viéndose claramente afectada la migración neuronal. Gambello y colaboradores en el año 2003, empleando el mismo modelo determinaron que la reducción de la expresión de LIS1 produce efectos drásticos en el desarrollo cortical, presentando una alteración severa de la migración neuronal, una disminución clara de la proliferación en la zona ventricular así como un incremento significativo de muerte celular. Poco después fue demostrado que dicha reducción en la expresión de LIS1 conlleva una alteración de la migración de interneuronas desde zonas subpiales (eminencia ganglionar) hasta la zonas paliales (McManus y col., 2004). En el mismo modelo también se ha determinado recientemente mediante experimentos *in vivo* una alteración en el proceso de formación y refinado de filopodios y de espinas dendríticas por parte de neuronas piramidales de la capa V de la corteza somatosensorial de ratones de entre 2 y 3 semanas postnatales (Sudarov y col., 2013). Por último se determinó la relación entre la falta de LIS1 y distintas alteraciones conductuales, como una pérdida en la capacidad de aprendizaje y formación de memoria, y también de habilidades motoras y sociales (Paylor y col., 1999; Sudarov y col., 2013).

Durante la primera década de del siglo XXI se descubrió la directa relación entre elementos genómicos conocidos como Copias de Numero Variable (CNV) y ciertas alteraciones neurológicas (Walsh y col., 2008). Las CNV son repeticiones anómalas del propio genoma que quedan insertadas en este y que contienen la secuencia nucleotídica necesaria para la expresión de uno o más genes modificando la dosis génica de estos y que están estrechamente relacionadas con diversas patologías en humanos (McCarroll y

Altshuler 2007). En 2009 se publicó un estudio en el que se describía la presencia de CNV que poseían la secuencia del gen PAFAH1B1 y/u otros genes de la LCR, presentando un incremento de dosis proteica (Bi y col., 2009). En el estudio se describía una serie de alteraciones en el SNC que en cierta forma diferían de las clásicamente descritas en enfermos de lisencefalia. En general, las duplicaciones aisladas del gen PAFAH1B1 descritas conllevaban una alteración generalizada del desarrollo, tanto en el SNC como en el resto de órganos. No presentaban el cerebro típico lisencefálico, sino microcefalia, y una consecuente alteración cognitiva. Dicho estudio se complementaba con la descripción fenotípica de un nuevo modelo animal en ratón en el cual se caracterizaba por una sobreexpresión de LIS1. Estos animales presentaban un tamaño reducido del cerebro, de forma semejante lo observado en pacientes, debido a una alteración en la migración neuronal radial y tangencial. Además, también se determinó que la sobreexpresión de LIS1 tenía como consecuencia una clara alteración en el establecimiento de la polaridad celular en el neuroepitelio de la zona ventricular (nicho de los precursores de las futuras neuronas del *neocortex*).

3.4. Nuevas perspectivas patológicas para LIS1.

Aunque las alteraciones en LIS1 se han asociado clásicamente con enfermedades drásticas como lo son la Lisencefalia tipo 1 y el síndrome de Miller-Dieker, durante la última década se ha venido sugiriendo que alteraciones en dicha proteína podrían subyacer en otro tipo de patologías y alteraciones cognitivas menos severas pero de mayor relevancia social por su impacto socioeconómico, como por ejemplo la esquizofrenia, trastorno bipolar o retraso mental (Reiner y Sapir 2006). De hecho, desde hace algún tiempo este tipo de enfermedades se están relacionando con defectos en el desarrollo cortical (Reiner y Sapir 2006; Walsh y col., 2008), en el que LIS1 juega un papel crucial. Esto queda fundamentado por dos tipos de evidencias que se exponen a continuación.

En primer lugar, algunos de los defectos asociados a alteraciones en LIS1 son también rasgos identificativos de distintos trastornos mentales. Por ejemplo, se ha observado una alteración en la migración de neuronas positivas para el marcador parvalbúmina en la corteza cingular anterior en pacientes de esquizofrenia (Kalus y col., 1997). También en enfermos de autismo se ha descrito una alteración en la migración neuronal acompañada de un defecto en la proliferación (Wegiel y col., 2010). En segundo lugar, se sabe que varias proteínas muy relacionadas con LIS1 juegan un papel importante en el desarrollo de este tipo de enfermedades. Por ejemplo, se ha detectado la alteración en el gen que

codifica para la subunidad catalítica Alpha1 de la PAF-AH, cuya actividad está regulada por LIS1, en pacientes con retraso mental (Nothwang y col., 2001). Por otro lado, se ha detectado una clara disminución de la presencia de Reelina, proteína que activa una vía de señalización durante el proceso de migración neuronal en el que participa LIS1, en cerebros de enfermos de esquizofrenia y trastorno bipolar analizados postmortem (Impagnatiello y col., 1998; Guidotti y col., 2000). Alteraciones en DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia 1*), proteína que interacciona con LIS1 (Brandon y col., 2004) formando un complejo proteico implicado en distintas funciones celulares, ha sido ampliamente relacionada con esquizofrenia y otros trastornos psiquiátricos (Millar y col., 2000; Yates 2012). Además en sendos estudios publicados en la década pasada se describen alteraciones en distintos genes en la LCR en enfermos de esquizofrenia y trastorno bipolar, entre los que se encuentra el receptor de PAF (Tabarés-Seisdedos, 2006; Tabarés-Seisdedos, 2008). Por todo esto no es descabellado plantear que alteraciones en LIS1 puedan subyacer a distintas patologías mentales menos severas que la esquizofrenia.

Sin embargo, como se ha mencionado antes, la mayoría de alteraciones genéticas descritas en pacientes no suponen una pérdida completa de un alelo y una consecuente disminución de los niveles de expresión, sino mutaciones puntuales o deleciones parciales que pueden incluso implicar más de un gen (Dobyns y col., 1993; Reiner y col., 1993; Reiner y col., 2002), lo cual puede suponer una situación mucho más compleja. En el año 2001 fue publicado otro modelo experimental en ratón, el cual presenta en uno de los alelos del gen que codifica para LIS1 una deleción del primer exón, mimetizando una mutación descrita en un paciente de lisencefalia de fenotipo no muy severo (Cahana y col., 2001). Esta mutación supone la pérdida por completo del dominio LisH, que media la homodimerización de LIS1, su forma funcional. Se determinó que esta mutación provoca una alteración en la formación de la placa cortical durante el desarrollo temprano, una cierta alteración morfológica de la glía radial así como un retraso en la formación de la proyección talamocortical. En estudios posteriores también se observó un retraso en el desarrollo de la proyección septohipocampal (Garcia-Lopez y col., 2015) así como un retraso en el intercambio de subunidades de los receptores de GABA_A en neuronas piramidales de la corteza parietal, produciendo en estas una reducción tanto en la amplitud como en la frecuencia de los IPSP (potenciales inhibitorios postsinápticos (Valdés y col., 2007).

Casi veinte años después del desarrollo del primer modelo experimental para el estudio de la proteína LIS1 se ha acumulado una importante información sobre su estructura, su interacción con otras proteínas para la formación de complejos proteicos y la participación de estos en diversos procesos celulares. También se han investigado las consecuencias de la disminución de su expresión sobre la morfología y función del hipocampo (Jones y Baraban 2007; Jones y Baraban 2009; Greenwood y col., 2009; Hunt y col., 2012) y en menor medida sobre el desarrollo cortical (Cahana y col., 2001; Gambello y col., 2003; McManus y col., 2004). Sin embargo el conocimiento sobre cómo podrían afectar a la fisiología de la corteza se encuentra muy pobremente estudiado. El estudio de la fisiología de la corteza es fundamental ya que esta es el substrato de los distintos procesos cognitivos. Por otro lado, existen ciertas evidencias, como se ha descrito antes, de que alteraciones en LIS1 podrían subyacer en patologías menos drásticas a la lisencefalia, como por ejemplo esquizofrenia, trastorno bipolar o retraso mental, las cuales se caracterizan por presentar anomalías cognitivas características. Por tanto, estudiar si alteraciones en LIS1 pueden producir fenotipos similares a los descritos en este tipo de patologías puede abrir una nueva vía hacia su mejor comprensión.

Para este cometido decidimos emplear como modelo de estudio el ratón *Lis1/sLis1* el cual presenta una deleción en el primer exón de uno de los dos alelos del gen que codifica para dicha proteína, una situación representativa del tipo de alteraciones descritas en pacientes. Para el estudio de posibles alteraciones en el funcionamiento de la corteza cerebral de dicho modelo experimental decidimos realizar dos tipos de aproximaciones.

En primer lugar se decidió realizar un estudio de las propiedades de la actividad sincrónica epileptiforme (ASE) generada por el bloqueo de GABA_A a lo largo de la corteza cingular tanto en animales control como en animales *Lis1/sLis1*. En estas condiciones la ASE surge como fruto del disparo coordinado y repetido de potenciales de acción por parte de una población neuronal determinada, lo cual genera una situación de excitabilidad que tiende a propagarse rápidamente a lo largo de la corteza a través de conexiones excitadoras lo que permite el estudio de los mecanismos que subyacen a la sincronización neuronal y cómo esta puede transmitirse a lo largo de la corteza (Gutnick y col., 1982; Connors y col., 1984; Castro-Alamancos 2000). Así pues, estudiando las propiedades de la ASE en la corteza del ratón *Lis1/sLis1*, podremos obtener información sobre cómo una carencia en la proteína LIS1 puede afectar el funcionamiento de dichos circuitos corticales. Por otro lado, el estudio de la ASE generada por antagonistas de

GABA_A ha sido empleado desde hace décadas como modelo de epilepsia debido a sus semejanzas con los crisis epilépticas descritas en pacientes (aparición de ASE de forma espontánea, rápida propagación a lo largo de la corteza y posterior aparición de diversos daños tisulares asociados a esta (Söderfeldt y col., 1983). Debido a que la epilepsia es uno de los síntomas más característicos en pacientes que presentan alteraciones en LIS1 (Dobyns y col., 1993), el estudio de la ASE en la corteza del ratón *Lis1/sLis1* podría desvelar información sobre las propiedades del circuito local durante este tipo de eventos.

Desde hace décadas se ha relacionado la aparición de distintas enfermedades psiquiátricas con alteraciones funcionales en el sistema inhibitorio cortical (Goldman-Rakic y Selemon 1997). Este tipo de enfermedades mentales se ha relacionado tanto con anomalías en la distribución de distintos tipos de interneuronas en la corteza (Guidotti y col., 2000; Woo y col., 2008) como con la alteración de distintos patrones de actividad cortical (Basar y Güntekin 2008) estrechamente ligados a la actividad de dichas interneuronas. Por tanto un estudio de las propiedades electrofisiológicas de las interneuronas y de patrones de actividad cortical estrechamente relacionados a estas en la corteza del ratón *Lis1/sLis1* podría revelarnos información sobre si alteraciones en LIS1 conllevan consecuencias funcionales semejantes a las asociadas en distintos trastornos psiquiátricos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Diversas evidencias sugieren que alteraciones en el desarrollo cortical asociadas a una disfunción de la proteína LIS1 podrían subyacer en diversas patologías psiquiátricas menos drásticas a la lisencefalia, como por ejemplo esquizofrenia, trastorno bipolar o retraso mental. Pacientes de este tipo de trastornos presentan patrones anómalos de actividad cortical. Investigar si en la corteza del ratón *Lis1/sLis1* existen patrones de actividad eléctrica anómalos semejantes a los observados en dichas patologías, ofrecería una nueva perspectiva de la patofisiología asociada a alteraciones en LIS1, hasta ahora mayoritariamente relacionada con la lisencefalia, y una nueva vía para la mejor comprensión de diversos trastornos mentales. Un paso previo para determinar si el ratón *Lis1/sLis1* puede ser un modelo útil de otras enfermedades distintas de la Lisencefalia es caracterizar las alteraciones electrofisiológicas que presenta la corteza cerebral en este animal; para ello planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Estudio de las propiedades y de la propagación de la actividad sincrónica epileptiforme (ASE) en la corteza cingular del ratón *Lis1/sLis1*.
- 2) Estudio de las propiedades electrofisiológicas de las interneuronas gabaérgicas de tipo *Fast-Spiking* en la corteza motora primaria del ratón *Lis1/sLis1*.
- 3) Estudio de la actividad eléctrica de la corteza motora del ratón *Lis1/sLis1*.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas transgénicas.

1.1. Línea *Lis1/sLis1*

Esta línea transgénica, creada usando la cepa ICR, fue descrita por Cahana y col., en 2001 presenta una deleción en el primer exón del gen que codifica para la proteína LIS1. Como consecuencia se produce la coexpresión de dos versiones de la proteína, una de ellas no presenta el primer exón el cual codifica para el dominio que media la homodimerización. Esto hace que la proteína no forme homodímeros, que es la versión funcional, pero por otro lado sí que es capaz de interactuar con las proteínas diana. Esto conlleva distintos defectos sobre el desarrollo, como por ejemplo el retraso y alteración en la formación placa cortical, una anomalía en la morfología de la glía radial y neuronas piramidales así como el retraso en la formación de la proyección talamocortical (Cahana y col., 2001). A nivel funcional se determinaron diversas alteraciones de las corrientes excitadoras inhibitorias en neuronas piramidales de corteza (Valdés-Sánchez y col., 2007).

Los animales empleados para el desarrollo de esta tesis pertenecían a estadios postnatales, frutos del cruce de un macho heterocigoto y una hembra ICR de fuera de la línea. Para los distintos experimentos se emplearon animales control o WT (WT; que no presentaban la mutación) y hermanos de camada heterocigotos para la mutación descrita anteriormente (*Lis1/sLis1*). Para los registros realizados en la primera sección de resultados se emplearon animales de entre 14 y 16 días postnatales. Para experimentos *in vivo* descritos en la tercera sección de resultados los animales empleados fueron postnatales adultos de entre 3 y 6 meses.

1.2. *Lis1/sLis1* x *GAD67-GFP*

Esta línea fue obtenida del cruce de macho *GAD67-GFP* x hembra *Lis1/sLis1* con el objetivo de facilitar la localización de interneuronas en la corteza de animales *Lis1/sLis1*, y así facilitar la obtención de registros descrita en la segunda sección de resultados. La línea *GAD67-GFP* es un knock-in al que se la ha insertado el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), realizado mediante el sistema “*gene targeting*” y que

expresa GFP bajo el promotor del gen que codifica para la proteína GAD67 (como se describe en Tamamaki y col., 2003). Esta línea está desarrollada en la cepa C57BL/6.

Los animales de esta línea empleados para la realización de los registros descritos en la segunda sección de resultados. Se emplearon ratones postnatales de entre 28 y 32 días, machos, tanto WT como heterocigotos, hermanos de camada y frutos de un mismo cruce (hembra heterocigota de la línea *Lis1/sLis1* con macho positivo para GFP de la línea *GAD67-GFP*).

Todos los animales fueron mantenidos, manipulados y sacrificados de acuerdo con la legislación y política nacional e internacional vigente (Directiva española “Real Decreto 1201/2005”; European Community Council Directive 2010/63EU). Todos los procedimientos y protocolos realizados en esta tesis fueron aprobados por el Órgano Evaluador de Proyectos de la Universidad Miguel Hernández.

2. Genotipado de las líneas transgénicas.

Para la distinción entre animales WT y heterocigotos para la mutación en el gen que codifica la proteína LIS1 se requirió el genotipado mediante la técnica de la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR). Para ello empleamos una pareja de cebadores que amplifican una región del genoma presente en el animal *Lis1/sLis1* y ausente en el animal WT y que tiene una longitud de unas 1800 pares de bases. El genotipado para saber si eran WT o heterocigoto para el alelo GAD67-GFP se realizó exponiendo a los individuos recién nacidos a una transiluminador de luz UV, permitiendo distinguir aquellos de genotipo WT y heterocigotos.

2.1. Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó a partir de una muestra de tejido obtenida de la oreja de cada animal (tejido restante tras el marcaje de cada individuo). Para ellos se llevó a cabo una lisis alcalina del tejido, para lo cual se introdujo cada pequeña porción de tejido en un tubo eppendorf de 1,5ml y se añadió 200µl de NaOH 50Mm y se dejó durante 1h y 15' (aproximadamente) a 98° y en ligera agitación. Después de este tiempo se añadió 30 µl de tampón Tris 1mM (pH7), se mezcló bien con el lisado y después se centrifugó durante 8 minutos a 13,200 r.p.m.

2.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

Para cada reacción de PCR se empleó 1µl del sobrenadante del extracto obtenido como anteriormente se ha descrito. En él se encuentra diluido el ADN genómico que emplearemos como molde para la PCR. Además se emplearon 13µl de *Ready Mix*, *Thermo scientific*, USA, (0,0045 unidades de *Taq Polymerase ThermoPrime*, 75mM Tris-HCl -pH 8.8 a 25°C-, 20mM (NH₄)₂SO₄, 2.0mM MgCl₂, 0.01% (v/v) Tween20, 0.2mM cada of dATP, dCTP, dGTP y dTTP, “precipitant” y marcador rojo para electroforesis) y 1µl del stock 5µM de primers (Mlis1 3' sequence 5' GGT GGC AGT GTT GAG ATG CCT AGC C 3'; Mlis1 5' sequence 5' GCA TTC CTG TAA TCC AGT ACC TGG 3'). Programa de PCR empleado: un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 5', en segundo lugar 35 ciclos (94°C 40''Desnaturalización_60°C 45''Hibridación primers_72°C 3' Polimerización) y por último una polimerización a 72°C 10'. El termociclador empleado fue un Mastercycler DNA Enginer (Eppendorf, Germany).

2.3. Electroforesis DNA.

Para la visualización del fragmento de DNA amplificado (solo se amplifica un fragmento del genoma de los animales heterocigotos) después de la PCR realizamos una electroforesis en gel de agarosa al 1'5% p/v diluida en tampón de electroforesis TAE (0.04M Tris-Acetate 0.001M de EDTA). Antes de que empiece a polimerizar la agarosa añadimos 10µl de Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich, USA) por cada 50ml de TAE. El Bromuro de Etidio tiene la propiedad de intercalarse en el ADN y emitir florescencia cuando es excitado con luz ultravioleta. El gel lo introducimos en una cubeta de electroforesis donde cargamos todas nuestras muestras. Para tener una referencia en la que basarnos para saber el tamaño del fragmento amplificado cargamos 4ul de marcador de tamaño de banda (GenRuler™ 1kb Leadder, Fermentas, USA). La cubeta posee dos bornes que se conectan a una fuente de alimentaciónA continuación se muestra una imagen representativa del resultado de la electroforesis para un grupo de muestras.

3. Registros electrofisiológicos in vitro en rodajas coronales de cerebro de ratón.

3.1. Preparación de rodajas para registro electrofisiológico “in vitro”.

El procedimiento de disección del cerebro y preparación de rodajas coronales que conservasen el cuerpo calloso fue el realizado de forma habitual en nuestro laboratorio (Troca y Geijo, 2010; Rovira y Geijo-Barrientos, 2016). Para cada animal que fue sacrificado (por dislocación cervical), el cerebro fue diseccionado rápidamente, proceso durante el cual se vertió frecuentemente sobre la superficie de esta solución de corte (composición en mM: NaCl, 124; KCl, 2.5; PO₄H₂Na, 1.25; Mg Cl₂, 2.5; Ca Cl₂, 0.5; NaCO₃H, 26; glucosa, 10). Debido a su composición (bajo calcio y alto magnesio) y temperatura (2°-4°), ayuda a ralentizar la degradación del tejido, como por ejemplo la muerte celular por citotoxicidad inducida por la liberación masiva de glutamato. Esta solución necesita ser saturada con CO₂ mediante un burbujeo constante con carbógeno (5%CO₂ + 95%O₂), para llevarla a pH 7.4. Para la extracción del cerebro se cortó el cráneo por su sutura medial de caudal a rostral tras lo que empleando una gubia se retiraron ambos huesos. Tras esto se empleó una espátula para extraer el cerebro para lo que se requirió la sección de varios pares craneales. Una vez diseccionado se eliminó la zona más caudal (topográficamente hablando) lo que generó una superficie de apoyo para su pegado (con cyanolit) en sobre el porta muestras del vibratomo (Leica VT1000S). Los reglajes empleados normalmente fueron 0.125mm/s de velocidad de avance de la cuchilla y entre 8 y 9 Hz de frecuencia de corte de esta. Tras esto se obtuvieron rodajas coronales de 350 µm, seleccionando aquellas en las que se la proyección callosa atravesaba la línea media. Se incubó las rodajas durante 30' a 34° y después 45'- 60' a RT antes de iniciar los registros electrofisiológicos en solución extracelular de registro saturada con carbógeno para fijar el pH en 7.4. Este tipo de preparación puede hacer el tejido se mantenga en óptimas condiciones durante muchas horas, lo que nos permite una amplia ventana temporal de registro.

3.2. Soluciones extracelulares.

Solución extracelular modificada con alto K^+ y bajo Ca^{++} , empleada en el primer apartado de resultados (composición en mM: NaCl, 124; KCl, 5; PO_4H_2Na , 1.25; $MgCl_2$, 1; $CaCl_2$, 1.2; $NaCO_3H$, 26; glucosa, 10; pH 7.4 cuando es saturada con 95% O_2 and 5% CO_2).

Solución extracelular estándar, empleada en registros *in vitro* del segundo apartado de resultados (composición en mM: NaCl, 124; KCl, 2.5; PO_4H_2Na , 1.25; $MgCl_2$, 1; $CaCl_2$, 2; $NaCO_3H$, 26; glucosa, 10; pH 7.4 cuando es saturada con 95% O_2 and 5% CO_2).

3.3. Equipo para registros electrofisiológicos en rodajas.

El equipo para registros *in vitro* está formado por un microscopio (Olympus BX50WI) equipado con una fuente de fluorescencia, óptica Nomarski, iluminación mediante infrarrojos y objetivos 4x y 40x (este último de inmersión en agua), el cual reposa sobre una mesa anti-vibración (Technical Manufacturing Corporation, Peabody, MA 01960 USA). El microscopio lleva montada una cámara digital (Hamamatsu – ORCA) que permite la visualización de las rodajas y la identificación de las neuronas previamente al registro; además, el sistema de fluorescencia permite la identificación de neuronas GABAérgicas en las rodajas de animales *Lis1/sLis1-GAD67-GFP*. El amplificador empleado es un Multiclamp 700B (Axon Instruments, Molecular Devices, USA) equipado con dos canales de registro y como convertidor analógico-digital se usó una Digidata 1200B o una Digidata 1322A (Axon Instruments, Molecular Devices, USA) de 16 bit de resolución. Cada canal de registro está formado por un preamplificador (Axon instruments CV-7B). Ambos preamplificadores estuvieron montados sobre micromanopuladores, uno de ellos mecánico manual (MX100R) y el otro de precisión motorizado (Sutter instruments MP-225). La adquisición de registros, la generación de estímulos y el análisis “off line” de los registros se hizo con el software pClamp v9 ó v10 (Axon Instruments, Molecular Devices, USA). Los estímulos eléctricos utilizados para la estimulación extracelular se aplicaron mediante un Stimulus Isolator A360-C (World Precision Instruments, USA). La perfusión de las distintas soluciones se realizó con un flujo de 4ml/min, el cual estaba controlado por un sistema de electroválvulas. Además la temperatura de registro se mantuvo a 33° durante todos los experimentos en rodajas gracias a un sistema de control de temperaturas TC-344B (Warner Instruments Corporation, USA).

3.4. Registros electrofisiológicos en rodajas y cuantificación de parámetros.

Todos los registros electrofisiológicos se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 20 KHz y utilizando un filtro de paso bajo de 4 KHz de frecuencia de corte. Los registros extracelulares de potenciales de campo se realizaron con electrodos de “patch” estirados a partir de capilares de vidrio con filamento de borosilicato de 1.5 mm de diámetro externo y 0.86 mm y rellenos de solución extracelular. La latencia de las respuestas evocadas se calculó desde el inicio del artefacto de estímulo hasta el 10% de la amplitud máxima de la respuesta. La cuantificación de la frecuencia de las post-descargas se realizó en el periodo de registro donde estas postdescargas aparecen de forma constante y regular.

Los registros intracelulares se obtuvieron mediante electrodos de “patch” en la configuración de “*whole cell*”; los electrodos se estiraron a partir de capilares de vidrio con filamento de borosilicato de 1.5 mm de diámetro externo y 0.86 mm de diámetro interno y tenían entre 3.5 – 8 MOhms rellenos con solución intracelular (composición en mM: 130 mM gluconato potásico, 5 mM KCl, 5mM NaCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM Mg-ATP, 0.2 mM Na-GTP; pH 7.2 ajustado con KOH; 285–295 mOsm). En los registros de potencial de membrana obtenidos en el modo “*current-clamp*” se utilizaron protocolos de pulsos de corriente rectangulares hiperpolarizantes y despolarizantes (con incrementos de 30pA desde -200pA) para así obtener la relación corriente-voltaje de la célula. En base a las respuestas a este protocolo, se calcularon las distintas propiedades intrínsecas de las neuronas registradas. En primer lugar, la resistencia de membrana (R_m) y la constante de tiempo de la membrana (τ_m) se calcularon a partir de la respuesta al pulso hiperpolarizante de menor amplitud. Por otro lado, las propiedades del potencial de acción (AP) se calcularon a partir del primer AP evocado por pulsos despolarizantes. En primer lugar se midió el umbral de disparo del AP como el punto en el cambia bruscamente la pendiente al inicio del AP. La amplitud del AP se midió desde el umbral hasta el pico. La duración del AP se midió al 50% de su amplitud. La amplitud de la post-hiperpolarización del AP se midió desde del umbral del AP. El tiempo de caída al 50% de la post-hiperpolarización se midió como el tiempo transcurrido desde el pico de la AHP hasta alcanzar un 50% de la amplitud.

Por último, en el segundo apartado de resultados, se realizaron registros de corriente de membrana en modo *voltage-clamp*, estudiar las corrientes excitadoras post-sinápticas espontáneas (sEPSC). Estas corrientes se registraron a un potencial de membrana de -70 mV (valor aproximado del potencial de equilibrio de Cl⁻ para las concentraciones para este ion en la solución extracelular estándar e intracelular). Tanto la detección de sEPSCs eventos como el cálculo de su amplitud (medida desde la base al pico) se hicieron de forma automática empleando el *software* WinEDR (Strathclyde Electrophysiological Software, Dr. John Dempster, Strathclyde University, UK).

4. Registros de potenciales de campo locales (LFP) in vivo.

Para estos experimentos los animales fueron anestesiados empleando para ello una dosis de Uretano de 1.6mg/g de peso (diluido en salino) aplicada mediante inyección intraperitoneal. Una vez que el animal no respondía a varios estímulos reflejos se consideró que este estaba anestesiado adecuadamente. Durante todo el experimento el animal se mantuvo a una temperatura constante de 37° empleando para ello un colchón calentador. Después de esto y previo paso a la cirugía se aplicó una dosis de Bupivacaina 0.5 v/v en salino mediante inyección subcutánea. Seguidamente se dispuso al animal en un estereotáxico y se procedió a la cirugía. Se realizaron dos trépanos mediante el uso de una broca manual. Los trépanos estaban situados uno en cada hemisferio y en zonas homótopicas sobre la corteza motora primara. Las coordenadas escogidas fueron: +1.5 mm en el eje anteroposterior, ±1.5 mm en el eje lateromedial y 1.2-1.5 mm en el eje dorsoventral respecto el punto bregma (Paxinos y Franklin 2001). Siguiendo estas coordenadas en las tres dimensiones del espacio se introdujo una sonda multicanal de silicio (Neuronexus Technologies, Michigan, USA) con 32 electrodos de registro separados por 50µm en cada hemisferio cortical. Estos electrodos multi-canal permiten registrar en 32 puntos a lo largo del grosor de la corteza. Antes de introducir el electrodo se impregna este en DiI, lo cual nos permitirá una verificación *postmortem* de la localización del electrodo. Para esto, después del experimento se perfundieron los animales con paraformaldehido (PFA) al 4% peso/volumen en solución salina, se extrajeron los cerebros y se realizó un post-fijado de 24h en la misma disolución. Una vez post-fijados, se hicieron cortes coronales de 50µm al vibratomo, estos se tiñeron con DAPI (10µg/ml; Sigma-Aldrich). La adquisición de señales electrofisiológicas se realizó de forma continua a una frecuencia de muestreo de 20kHz empleando para ello el *software* Mc_Rack y se empleó un amplificador-digitalizador ME64-PGA-MPA-System

(Multichannel Systems, Reutlingen, Germany). Después se redujo la frecuencia de adquisición de cada señal a 2.5kHz y se aplicó un filtro tipo Notch a 50 y 100Hz y un filtro pasa altos de 0.5Hz. Posteriormente se seleccionó un electrodo representativo de capa 2/3, capa 5 y capa 6 teniendo en cuenta la distancia recorrida en el eje Z por el electrodo, el análisis *post mortem* de la localización del electrodo y el registro electrofisiológico. La situación de estos canales de registros seleccionados respecto a la superficie pial fue de aproximadamente 250 μ m en capa 2/3, 650 μ m en capa 5 y 1150 en capa 6. Posteriormente se realizaron los cálculos de potencia y de coherencia empleando para ello algoritmos basados en código MatLab (Mathworks, MA, USA). La potencia se obtuvo empleando la Transformada de Fourier y la coherencia mediante el periodograma de Welch.

Para el análisis de potencia se emplearon las siguientes bandas de frecuencia: delta, 0.5-4Hz; alfa, 8-13Hz; beta, 13-30Hz; Gamma, 30-100Hz. Los cálculos de potencia se realizaron empleando la transformada de Fourier a nuestra señal. Una vez calculada la potencia en las distintas bandas de frecuencia establecidas, estas se normalizaron en cada caso (por experimento y capa) respecto a la potencia de la banda delta. Previamente a la normalización se determinó que no existían diferencias significativas en la potencia de la banda delta entre animales WT y *Lis1/sLis1* en capa 2 (WT=0.01 \pm 0.044mV²; *Lis1/sLis1*=0.0049 \pm 0.0015mV²; p=0.156), capa 5 (WT=0.065 \pm 0.014mV²; *Lis1/sLis1*=0.046 \pm 0.01mV²; p=0.427) y capa 6 (WT=0.079 \pm 0.014mV²; *Lis1/sLis1*=0.074 \pm 0.018mV². p=0.827).

5. Análisis estadístico.

Todos los valores mostrados representan la media \pm S.E., salvo que se indique lo contrario. El análisis estadístico para la comparación de medias se realizó aplicando el test t-Student, salvo en los casos en los que la distribución de la muestra no siguiera una distribución normal, en los cuales se empleó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para la comparación de proporción de rodajas con presencia de postdescargas presentada en la sección primera de resultados se empleó el Z-test para proporciones de dos poblaciones. P-valor indicado como: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

RESULTADOS

1. Sección primera. Propagación y propiedades de la actividad sincrónica epileptiforme (ASE) en la corteza cingular del ratón *Lis1/sLis1*.

La actividad sincrónica epileptiforme (ASE) se genera en la corteza cerebral en condiciones de inhibición parcial o total de los receptores de GABA_A (Connors, 1984). En estas condiciones, de forma espontánea o evocada por estímulo eléctrico, se generan descargas de potenciales de acción de forma sincrónica en las neuronas corticales que se propagan a lo largo de la corteza cerebral. La propagación de estas descargas depende de las interconexiones formadas por las neuronas piramidales y su estudio es una forma de evaluar la presencia de alteraciones en el circuito cortical en el ratón *Lis1/sLis1*.

El estudio de la propagación de ASE se realizó en la corteza cingular de ratón (Figura R1.1), concretamente en la capa 2/3. Para ello se usaron rodajas coronales en las que se conservan intactas gran parte de las fibras del cuerpo calloso, lo que permite el estudio de la propagación de este tipo de actividad a lo largo de la corteza cerebral de un hemisferio y la propagación entre hemisferios a través del cuerpo calloso. Hemos estudiado la propagación de ASE en la capa 2/3 de la corteza cingular, concretamente en la corteza cingular anterior (ACC; áreas de Brodmann 24b y 24a; Vogt y Paxinos, 2012) y la corteza retrosplenial (RSC; áreas de Brodmann a30 and a29c; Vogt y Paxinos, 2012). Estas dos regiones tienen distinta organización citoarquitectónica y están involucradas en distintos procesos cognitivos (Vann y col., 2009; Vogt y Paxinos, 2012; Shenhav y col., 2013). Para este estudio, se prepararon rodajas coronales pertenecientes a dichas zonas como se muestra en la figura R1.1. Para la ACC se utilizaron rodajas situadas entre 0.2 y 1.1 mm respecto a Bregma y para la RSC se utilizaron rodajas situadas entre -1 y -2.5 mm respecto a Bregma; en ambos casos la referencia utilizada fue el atlas de cerebro de ratón *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos y Franklin, 2001).

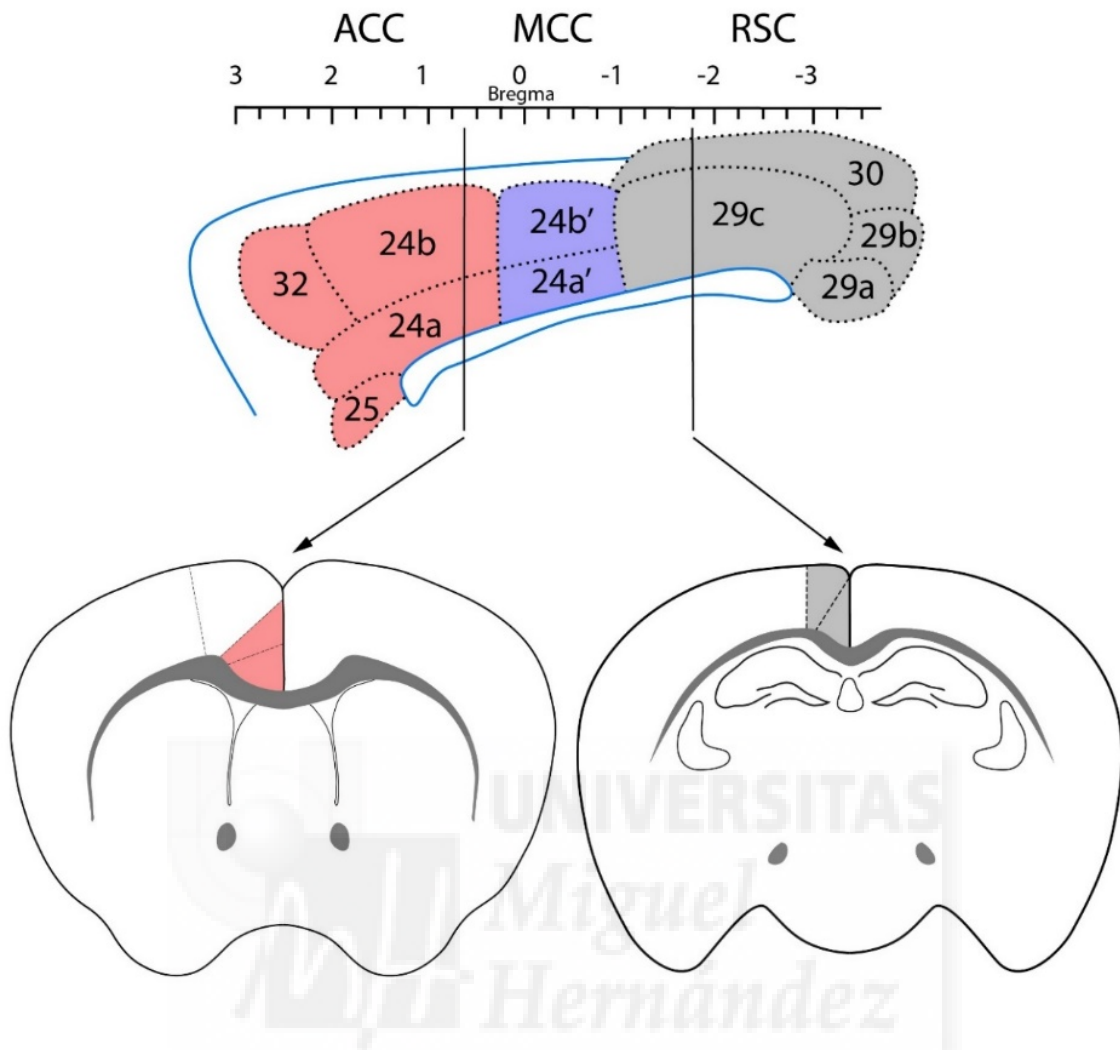


Figura R1.1. Corteza cingular del ratón. En la parte superior se muestra un esquema sagital en el que se representan las distintas áreas que componen la corteza cingular en ratón a lo largo del eje anteroposterior, con sus posiciones referenciadas al punto Bregma (esquema modificado de Vogt y Paxinos, 2012). En rosa se presenta la corteza cingular anterior (ACC), con sus dos subdivisiones, una dorsal o ACC primaria y una ACC ventral o secundaria. En morado se representa la porción medial de la corteza cingular. En gris se representa la corteza retrosplenial (RSC) también dividida en una zona dorsal o agranular (aRSC) y una ventral o granular (gRSC). En la parte inferior se muestran los esquemas de una rodaja coronal tipo perteneciente a los intervalos estudiados de corteza cingular anterior y de corteza retrosplenial, en los que se muestran también las áreas pertenecientes a corteza cingular. En el caso de la corteza cingular anterior se muestra el límite entre la ACC (áreas 24a y b) y la corteza motora y en el caso de la RSC se muestra el límite entre la región ventral (granular, área 29) y dorsal (agranular, área 30).

Para evocar ASE se perfundieron rodajas coronales procedentes de ratones de entre 14 y 16 días postnatales con Bicuculina $10\mu\text{M}$, concentración a la que las propiedades de este tipo de actividad se mantienen constantes (Alefeld y col., 1998), disuelta en solución extracelular modificada (con 5mM K^+ , 1.2mM Ca^{2+}). En estas condiciones aparecen descargas epileptiformes, tanto espontáneamente como evocadas por estímulos eléctrico aplicados a la capa 1 (Figura R1.2). En el caso de las descargas epileptiformes evocadas por estímulo eléctrico, éstas se propagan a lo largo de la corteza cerebral desde el punto de estimulación, propagándose también al hemisferio contralateral respecto al estímulo a través del cuerpo caloso (Rovira y Geijo-Barrientos, 2016). En la Figura R1.2A se muestra un esquema que representa una rodaja coronal, con la localización del electrodo de estímulo y la posición de distintas zonas de registro extracelular en la capa 2/3. En la Figura R1.2B, C y D se muestran varios ejemplos de descargas epileptiformes, espontáneas o evocadas por estímulo eléctrico, registradas mediante electrodos de registro extracelular situados a 1.2 mm del electrodo de estímulo. Para evocar descargas epileptiformes se utilizaron estímulos eléctricos (pulsos de corriente) de 0.1 ms de duración aplicados a intervalos de 30 segundos; la intensidad del pulso se ajustó en cada rodaja a un valor doble de la intensidad umbral.

Tras el estímulo eléctrico (indicado en cada caso por la flecha negra en la Figura R1.2), se evoca un componente o descarga inicial de potencial negativo y de amplitud variable, que va desde unas décimas a pocos mV (0.5-2 mayoritariamente) y de una duración habitual en el rango de decenas de milisegundo. Esta descarga inicial puede verse acompañada de una serie de postdescargas de número variable (desde dos o tres hasta superar ampliamente la decena) de amplitud y duración usualmente menor a la descarga inicial (Figura R1.2B). En cuanto a la actividad sincrona espontánea (Figura R1.2C), posee unas características muy similares a la evocada por estímulo eléctrico en términos de amplitud y duración, tanto de la descarga inicial como de las postdescargas. En la Figura R1.2D se muestran dos registros realizados a 1.2mm del electrodo de estímulo de dos rodajas distintas en los que queda reflejado la variabilidad en la frecuencia de aparición y duración de la actividad espontánea.

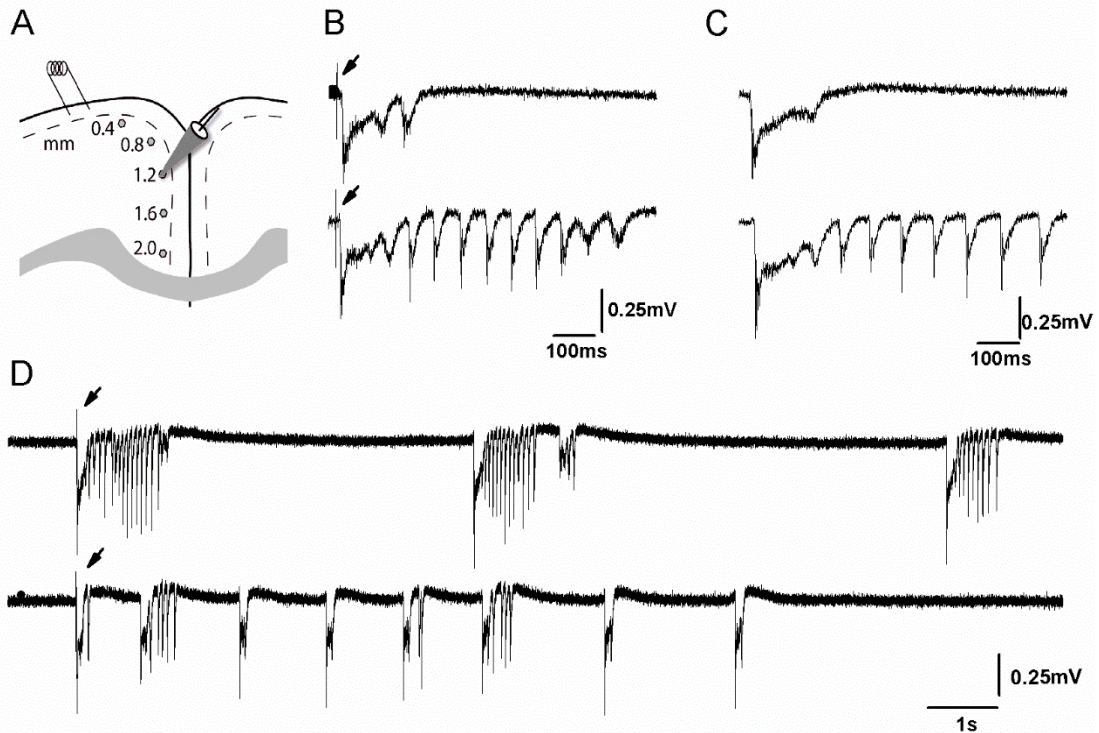


Figura R1.2. Propiedades de la ASE. **A)** Esquema del modelo experimental empleado en el que se muestra área de corteza cingular de una rodaja coronal, el electrodo de estímulo situado en capa I a la altura del cíngulo y las distintas posiciones de registro extracelular en la capa 2/3 del hemisferio ipsilateral al estímulo, separadas 0.4mm entre sí y con un electrodo de registro a 1.2mm respecto de la posición del electrodo de estímulo. **B)** Ejemplos de descargas evocadas de distinta duración y con número variable de postdescargas. La flecha negra señala el artefacto de estímulo. **C)** Ejemplos de registro de descargas espontáneas de distinta duración y con número variable de postdescargas. **D)** Ejemplos de registro de 15.5 segundos de duración en los que se pueden distinguir una primera descarga evocada (artefacto de estímulo marcado con una flecha) y varias descargas espontáneas a lo largo del registro.

1.1. Propagación de ASE a lo largo de la capa 2/3 del hemisferio ipsilateral al estímulo.

Para estudiar con detalle la propagación de ASE en la corteza cingular, se establecieron varias posiciones de registro extracelular separadas entre sí 0.4mm desde el electrodo de estímulo hasta la región más ventral de la corteza (Figura R1.3A). En cada posición de registro se cuantificó la latencia de la ASE evocada por el estímulo aplicado a la capa 1. En cada rodaja, el valor de la latencia de las respuestas evocadas registradas en cada posición se obtuvo de la media de al menos 10 respuestas consecutivas. En las rodajas más anteriores las posiciones de registro de 0.4 y 0.8mm respecto al electrodo de estímulo

no quedan circunscritas a la ACC sino que se encuentran situadas en la corteza motora secundaria (M2). Aun así también se cuantificó la latencia en estas posiciones. En la Figura R1.3B se muestran dos ejemplos de respuestas obtenidas a 1.6 mm del electrodo de estímulo en un animal WT (trazo negro) y en un animal *Lis1/sLis1* (trazo rojo); se puede observar claramente la diferencia de latencia en ambos casos. En la Figura R1.3C se representan los valores promedios de latencia por cada posición de registro obtenidos en el hemisferio ipsilateral para las regiones ACC y RSC en animales WT y *Lis1/sLis1* (líneas y símbolos negros y rojos respectivamente). En la corteza retrosplenial, debido a que esta región cortical es más estrecha en sentido dorso – ventral (topográficamente hablando) que la región cingular anterior, solo se utilizaron 4 posiciones de registro, también separadas por 0.4 mm (ver Figura R1.4C).

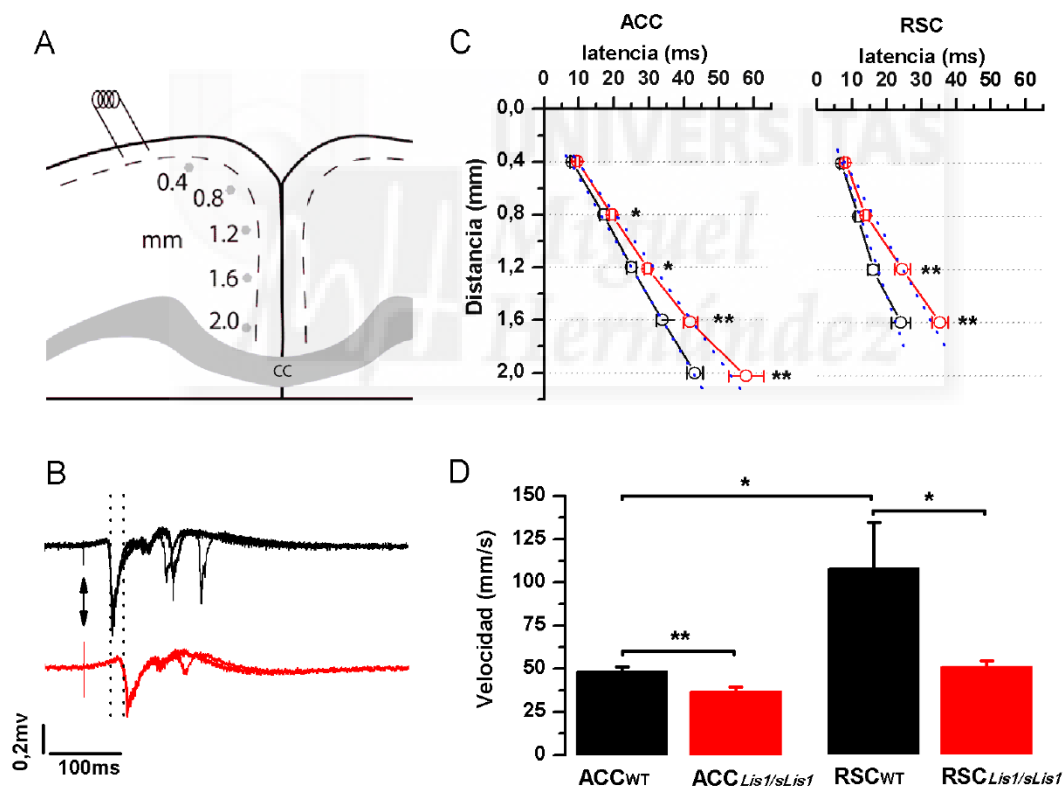


Figura R1.3. Propagación de ASE en la capa 2/3 del hemisferio ipsilateral de la corteza cingular. **A)** Esquema que representa una rodaja coronal con el electrodo de estímulo y las posiciones de registro a lo largo de la capa 2/3 del hemisferio ipsilateral. **B)** Ejemplo de dos registros obtenidos de un animal WT (trazado negro) y un animal *Lis1/sLis1* (trazado rojo) en una misma posición de registro (1.6mm de la ACC). La flecha indica el artefacto de estímulo. Las líneas de puntos indican el lugar en el que se midió la latencia en cada registro, por tanto el intervalo entre éstos representa la diferencia de latencia entre ambos registros. **C)** Valores promedio de latencia obtenidos en cada una

de las posiciones de registro, en animales WT (símbolos negros) y *Lis1/sLis1* (símbolos rojos), tanto en la ACC (WT=25 rodajas de 11 ratones; *Lis1/sLis1*=16 rodajas de 8 ratones) como en la RSC (WT=12 rodajas de 6 ratones; *Lis1/sLis1*=23 rodajas de 9 ratones). Las líneas punteadas representan el ajuste lineal a las latencias; de este ajuste se ha obtenido la velocidad de propagación de la ASE. **D)** Valores de la velocidad de propagación de las respuestas epileptiformes a lo largo de la capa 2/3 en animales WT (barras negras) y *Lis1/sLis1* (barras rojas); la velocidad de propagación se calculó en cada rodaja a partir del ajuste lineal de los valores de latencia de las respuestas registradas en cada posición de registro. En las rodajas de ACC: WT=18 rodajas de 8 animales; *Lis1/sLis1*=14 rodajas de 8 animales. En las rodajas de RSC: WT=9 rodajas de 5 animales; *Lis1/sLis1*=17 rodajas de 7 animales.

En general, las latencias fueron mayores en los animales *Lis1/sLis1*, incrementándose esta diferencia a medida que registramos en zonas más alejadas del electrodo de estímulo. En la ACC las diferencias de latencia se determinaron estadísticamente diferentes desde 0.8 a 2 mm respecto la posición de estímulo. Por lo contrario en la región RSC se encontraron diferentes las latencias a 1.2 y 1.6mm desde la posición de estímulo. A partir de las latencias de las respuestas registradas en cada posición se calculó la velocidad de propagación de las descargas epileptiformes a partir del ajuste lineal de los valores de latencia obtenidos en las distintas posiciones de registro en cada rodaja. En la Figura R1.3D se presentan los valores promedio de velocidad de propagación obtenidos para ambos genotipos en ambas regiones. Las diferencias en la velocidad de propagación entre WT (barras negras) y *Lis1/sLis1* (barras rojas) en ambas regiones se determinaron estadísticamente significativas. En ambos casos, y en lógica coherencia con las diferencias de latencia, la velocidad de propagación determinada en rodajas *Lis1/sLis1* fue menor que la observada en animales WT. También se comparó los datos obtenidos en rodajas WT entre ambas regiones cingulares, siendo la velocidad de propagación claramente mayor en la región RSC respecto a la ACC.

1.2. Propagación de la actividad sincrónica epileptiforme al hemisferio contralateral.

Debido a que en nuestras rodajas coronales se conservan intactos parte de los axones que forman el cuerpo calloso, las descargas epileptiformes evocadas en un hemisferio por el estímulo aplicado a la capa 1 se propagan a la capa 2/3 del hemisferio contralateral (Walker y col., 2012; Rovira y Geijo-Barrientos, 2016). Para estudiar la propagación interhemisférica de ASE en animales WT y *Lis1/sLis1* se midió la latencia de la ASE evocada en un hemisferio por estímulo en la capa 1 y registradas en el hemisferio

contralateral. La Figura R1.4A muestra un esquema del experimento: se aplican estímulos eléctrico en la capa 1 de un hemisferio (igual que en el apartado anterior) y se registraron las ASE en 5 posiciones de registro situadas en el hemisferio contralateral, en sitios homotópicos respecto a las utilizadas en el hemisferio ipsilateral. Como en el apartado anterior, en la RSC solo se utilizaros 4 posiciones de registro por cada rodaja. También, para cada una de estas posiciones de registro se calculó el valor de latencia promediando al menos 10 respuestas consecutivas. En las rodajas correspondientes a la región ACC también se cuantificaron aquellas posiciones correspondientes a la corteza motora secundaria (M2). En la Figura R1.4B se muestra un ejemplo de las respuestas registradas en el hemisferio contralateral (posición: 1.2 mm de la RSC) en una rodaja de un animal WT (trazado negro) y de un animal *Lis1/sLis1* (trazado rojo). La latencia de las respuestas registradas en el hemisferio contralateral se muestran en la Figura R1.4C; se muestra el promedio de los valores de latencia obtenidos por cada posición de registro por región cortical y genotipo (WT, línea y símbolos en negro; *Lis1/sLis1*, línea y símbolos en rojo). También se incluyen como referencia los valores de latencia del hemisferio ipsilateral (símbolos y líneas grises; mismos datos que los de la Figura R1.3C). En general, de forma similar a lo observado para el hemisferio ipsilateral, la latencia de las respuestas registradas en posiciones homotópicas contralaterales es mayor en animales *Lis1/sLis1*, aunque las diferencias solo fueron estadísticamente significativas en la región RSC, en las tres posiciones más ventrales de registro. Llamativamente, en las zonas más ventrales de la RSC los valores de latencia media en animales *Lis1/sLis1* llegaron a ser casi del doble respecto a los observados en rodajas WT (Figura R1.4C, panel derecho). En la Figura R1.4D se representa la comparación de los valores de latencia por posición de registro en el lado contralateral entre las regiones ACC y RSC para animales WT (datos de la Figura R1.4C). De manera similar a lo descrito en el anterior apartado para el lado ipsilateral, los valores de latencia en la propagación al hemisferio contralateral se encontraron en general mayores en la ACC que en la RSC. Por último, a partir de las latencias de la ASE registradas en los hemisferios ipsi- y contralaterales calculamos el tiempo de propagación interhemisférica (TPI) en la RSC, región en la que las latencias medidas en el lado contralateral fueron estadísticamente significativas en animales *Lis1/sLis1*. El TPI se calculó, en cada rodaja, como la latencia medida en una posición de registro en el hemisferio contralateral menos la latencia de la respuesta registrada en la posición homotópica del hemisferio ipsilateral; esta medida se hizo en las posiciones de 0.8 y 1.6mm; la primera de ellas correspondiente a la región dorsal (agranular; aRSC) de

la RSC y la segunda a la región ventral (granular; gRSC) de la RSC. La Figura R1.4E muestra los valores del TPI obtenidos en la aRSC y en la gRSC; como es de esperar por los datos de latencia de la Figura R1.4C, el tiempo de propagación interhemisférico se encontró diferente de forma claramente significativa entre ambos genotipos en ambas subdivisiones de la RSC.

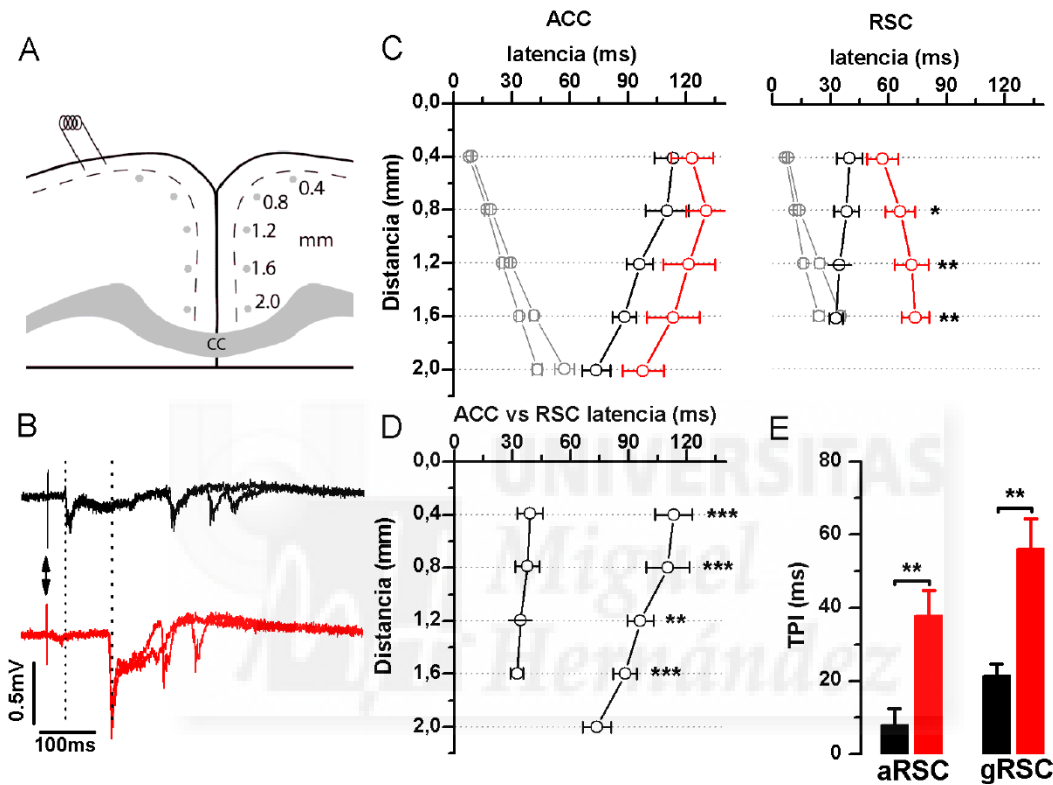
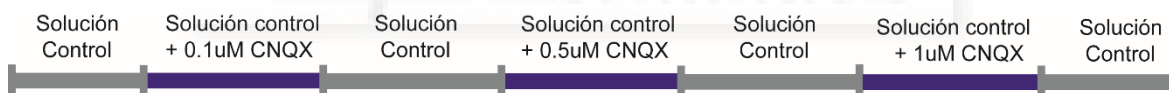


Figura R1.4. Propagación de ASE a zonas homotópicas en capa 2/3 en el hemisferio contralateral. **A)** Esquema que representa una rodaja coronal con el electrodo de estímulo y las posiciones homotópicas de registro a lo largo de la capa 2/3 del hemisferio contralateral. **B)** Ejemplo de dos registros obtenidos en el hemisferio contralateral de un animal WT (trazado negro) y un animal *Lis1/sLis1* (trazado rojo) en una misma posición (homotópica de 1.2 mm). La flecha indica el artefacto de estímulo. Las líneas de puntos indican el lugar en el que se midió la latencia en cada registro, por tanto el intervalo entre éstas representa la diferencia de latencia entre ambos registros. **C)** Representación de los valores promedio de latencia obtenidos en cada posición homotópica contralateral de registro, tanto para animales WT (símbolos negros) y *Lis1/sLis1* (símbolos rojos), tanto en la ACC (WT=10 rodajas de 5 animales; *Lis1/sLis1*=7 rodajas de 4 animales) como en la RSC (WT=7 rodajas de 6 animales; *Lis1/sLis1*=17 rodajas de 9 animales). Se presentan los valores de latencia ipsilateral para facilitar su comparación (líneas y símbolos grises; mismos datos que los de la Figura R1.3C). **D)** Comparación de valores de latencia al hemisferio contralateral entre las regiones ACC y RSC. **E)** representación de los valores de Tiempo de Propagación Interhemisférico (TPI) para dos posiciones de la región RSC:

0.8 mm (región dorsal, aRSC) y 1.6 mm (región ventral, gRSC) en animales WT (barras negras; 7 rodajas de 6 ratones) y animales *Lis1/sLis1* (barras rojas; 15 rodajas de 7 ratones).

1.3. Modulación de la propagación de actividad sincrónica epileptiforme por CNQX.

La propagación de actividad epileptiforme evocada por desinhibición de la corteza a lo largo de la corteza cerebral es dependiente de la transmisión sináptica excitadora entre neuronas piramidales mediada por receptores de glutamato (Pinto y col., 2005). Dado que hemos observado una menor velocidad de propagación en la corteza de animales *Lis1/sLis1* decidimos comparar la sensibilidad de la propagación de ASE a concentraciones diferentes de un bloqueante de receptores de glutamato (CNQX, bloqueante de receptores AMPA/kainato) para comprobar posibles diferencias asociadas a este tipo de receptores de glutamato entre animales WT y *Lis1/sLis1*. Para esto se estudió la modulación de la latencia de las descargas epileptiformes evocadas por estímulo eléctrico frente a un protocolo de concentraciones crecientes de CNQX (0.1, 0.5 y 1 μ M), empleando el mismo modelo experimental que hasta ahora. Los pormenores del protocolo aplicado se detallan en el Esquema R1.1.



Esquema R1.1. Protocolo de aplicación de concentraciones crecientes de CNQX. En cada rodaja se registraron las respuestas epileptiformes evocadas por estímulos eléctricos en la capa 1 aplicados cada 30 segundos durante un periodo total de 100 minutos, distribuidos de la siguiente forma: 10 minutos iniciales en presencia de solución control (solución extracelular modificada + 10 μ M bicuculina) seguido de periodos de 15 minutos en los que se aplica sucesivamente cada una de las concentraciones de CNQX empleadas (0.1, 0.5 y 1 μ M) separados por periodos lavado del CNQX de 15 minutos. Para cada tratamiento se cuantificó la media de la latencia de las ASE evocadas en los últimos 2.5 minutos.

En la ACC se estudió la modulación de la propagación de ASE por CNQX en ambas subdivisiones, ACC primaria (1.2mm respecto estímulo) y ACC secundaria (1.6mm respecto estímulo). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R1.5. En ambas regiones de la ACC los resultados obtenidos fueron muy similares. En respuesta a una concentración de 0.1 μ M de CNQX no se observó ningún efecto apreciable en la

propagación de la ASE en ambas regiones para ambos genotipos. Frente a una concentración de 0.5 μM de CNQX se determinó cierto incremento en la latencia muy similar en ambos genotipos. Por lo contrario, frente a una concentración de 1 μM se determinó un aumento claro de la latencia en animales WT, y aunque el aumento de la latencia también fue apreciable en animales *Lis1/sLis1*, este fue significativamente menor en ambas regiones de la ACC. En la Figura R1.5A y B se muestra un ejemplo de registro en condiciones control y tras la aplicación de 1 μM de CNQX, para un animal WT (trazos negros) y *Lis1/sLis1* (trazos rojos) para las regiones primaria y secundaria de la ACC respectivamente. El sombreado gris señala el incremento de latencia en cada caso.

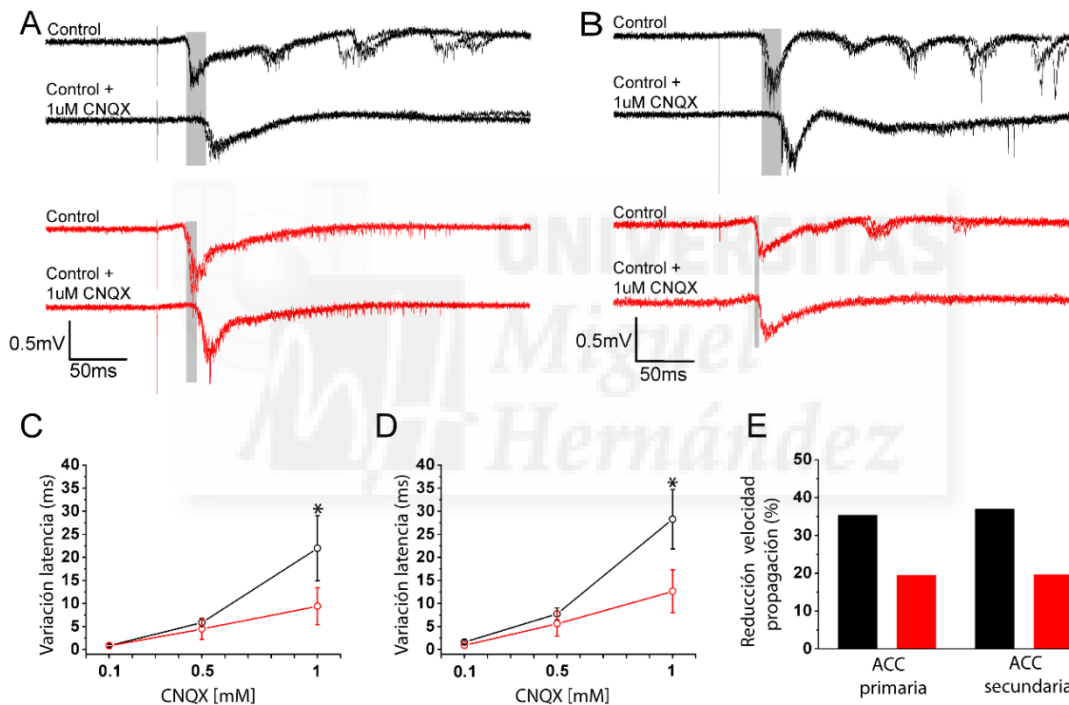


Figura R1.5. Modulación de la latencia por CNQX en la ACC. **A)** Registros obtenidos en la ACC primaria que muestra la latencia de las ASE en solución control y en presencia de 1 μM de CNQX, mostrando en sombreado gris la variación de latencia entre tratamientos. **B)** Registros obtenidos en la ACC secundaria que muestra la latencia en solución control y en presencia de 1 μM de CNQX, mostrando en sombreado gris la variación de latencia entre tratamientos. **C)** Variación de latencia (calculada como latencia en presencia de CNQX – latencia en solución control) frente a 0.1, 0.5 y 1 μM de CNQX en la ACC primaria. **D)** Variación de latencia frente a 0.1, 0.5 y 1 μM de CNQX en la ACC secundaria. **E)** Reducción de velocidad de propagación inducida por CNQX. En todos los casos WT n=12 rodajas (8 animales); *Lis1/sLis1* n=8 rodajas (5 animales). Trazos, símbolos y barras negras para animales WT y en rojo para *Lis1/sLis1*.

Los valores de incremento de latencia obtenidos para cada concentración en ambos genotipos se muestran en las Figuras R1.5C (corteza ACC primaria) y R1.5D (corteza ACC secundaria). También se calculó el porcentaje de reducción de la velocidad de propagación de la ASE a concentraciones de 1 μ M de CNQX respecto del valor control inicial. En la Figura R1.5E se muestran los valores promedio de reducción de velocidad de propagación, calculada por posición de registro y genotipo. En ambas regiones de la ACC se observa claramente que la reducción de la velocidad de propagación de la ASE epileptiforme fue de alrededor de un 35% en animales WT (barras negras) mientras que en animales *Lis1/sLis1* (barras rojas) esta reducción se situó alrededor de un 18%.

En cuanto a la modulación por CNQX en la RSC los resultados obtenidos presentaron un tendencia similar pero más acentuada que en la corteza ACC (Figura R1.6). Al igual que en la ACC, en general los animales *Lis1/sLis1* mostraron una menor sensibilidad al CNQX. Como se muestra en los registros de la Figura R1.6A y B, respectivamente para las regiones aRSC (0.8mm respecto electrodo de estímulo) y gRSC (1.6mm respecto electrodo de estímulo), se produjo un aumento significativo de la latencia en rodajas WT (trazos negros) respecto a rodajas *Lis1/sLis1* (trazos rojos) frente a concentraciones de 1 μ M de CNQX. En las Figuras R1.6C y 1.6D se muestra respectivamente para la aRSC y la gRSC los incrementos de latencia frente a las distintas concentraciones de CNQX empleadas para ambos genotipos (WT línea y símbolos negros, *Lis1/sLis1* línea y símbolos rojos). Tanto en la aRSC como en la gRSC se observó que el aumento de latencia era significativamente mayor para valores de concentración de CNQX de 0.5 y 1 μ M. Por último, se cuantificó el porcentaje de reducción de la velocidad de propagación en ambas regiones y para ambos genotipos (Figura 1.6E). En ambas subdivisiones de la RSC la velocidad de propagación se redujo alrededor de un 45% en animales WT (barras negras), mientras que en animales *Lis1/sLis1* la reducción se calculó en torno a un 20% (barras rojas).

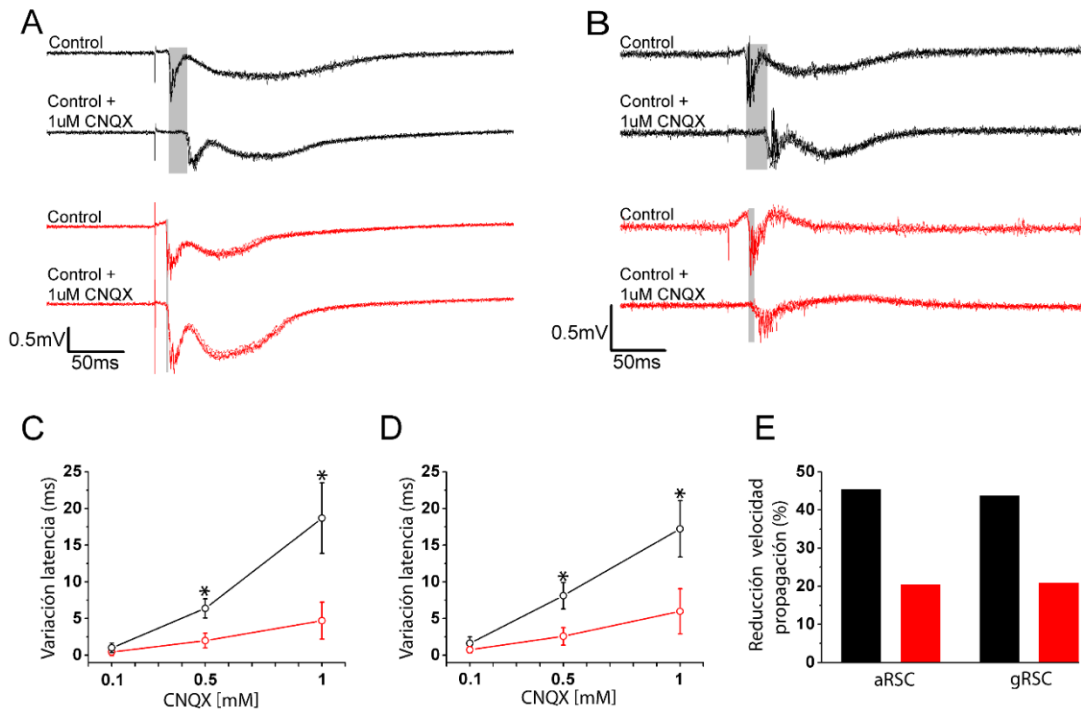


Figura R1.6. Modulación de la latencia por CNQX en la RSC. **A)** Registros de la aRSC que muestra la latencia frente a solución control y control + 1 μ M de CNQX, mostrando en sombreado gris la variación de latencia entre tratamientos. **B)** Registros de la gRSC que muestra la latencia frente a solución control y control + 1 μ M de CNQX, mostrando en sombreado gris la variación de latencia entre tratamientos. **C)** Variación de latencia frente a 0.1, 0.5 y 1 μ M de CNQX en la aRSC. **D)** Variación de latencia frente a 0.1, 0.5 y 1 μ M de CNQX en la gRSC. **E)** Reducción de velocidad de propagación en aRSC y gRSC. En todos los casos WT n=8 rodajas (5 animales); *Lis1/sLis1* n=5 rodajas (4 animales). Trazos, símbolos y barras negras para rodajas WT y en rojo para *Lis1/sLis1*.

1.4. Presencia de postdescargas oscilatorias.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en muchas ocasiones la ASE estaba formada por un componente inicial negativo seguido de postdescargas oscilatorias de duración variable (ver Figura R1.2 y figura R1.8 más adelante). Decidimos realizar una cuantificación de la presencia de estas postdescargas, tanto en ASE evocadas como espontáneas ya que esto podría ofrecernos información sobre las diferencias entre animales WT y *Lis1/sLis1* en la excitabilidad de la región cingular así como en la capacidad de sincronización de los circuitos locales presentes en ésta. Para ello se midió el porcentaje de rodajas en las que la ASE evocada o espontánea presentaba postdescargas, independientemente de su amplitud y duración. La presencia positiva de postdescargas oscilatorias se definió como la presencia de oscilaciones de potencial que

aparecen después del pico negativo inicial. La presencia de postdescargas oscilatorias se cuantificó como el porcentaje de rodajas en que aparecen postdescargas respecto al total de rodajas estudiadas en cada área cortical. Las cuantificaciones se realizaron de nuevo en las porciones primaria y secundaria de la ACC y agranular y granular de la RSC, en las mismas posiciones de registro que el apartado anterior. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura R1.7. En la ACC por lo general se obtuvieron valores de presencia de postdescargas relativamente homogéneos, por lo que no se encontraron diferencias significativas entre genotipos (Figura R1.7A). En la RSC los resultados obtenidos fueron en la misma línea (Figura R1.7B). En general los valores de presencia de postdescargas fueron mayores en rodajas WT respecto rodajas *Lis1/sLis1*, pero estas diferencias no fueron significativas.

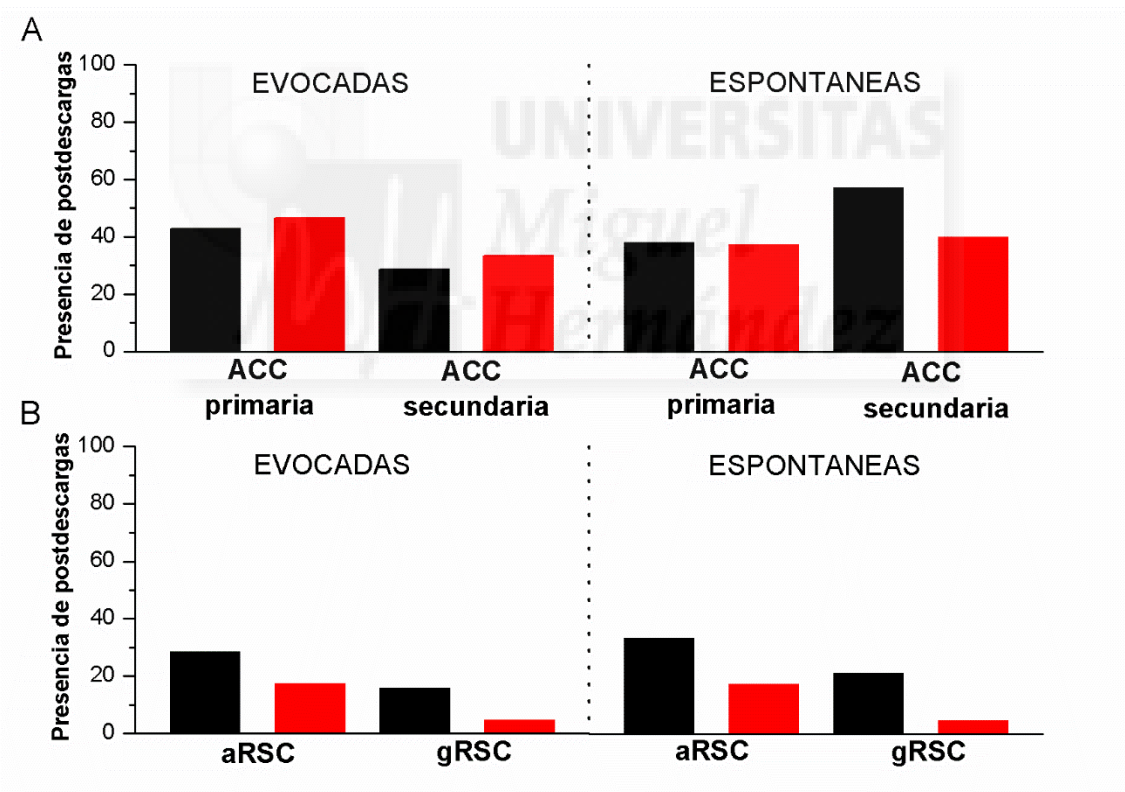


Figura R1.7. Porcentaje de rodajas que presentan postdescargas oscilatorias en ASE evocadas y espontáneas. **A)** Porcentaje de rodajas que presentan postdescargas en la ACC primaria y secundaria (WT n=20 rodajas de 9 ratones; *Lis1/sLis1* n=16 rodajas de 8 ratones). **B)** Porcentaje de rodajas que presentan postdescargas en la RSC agranular y granular (WT n=20 rodajas de 9 ratones; *Lis1/sLis1* n=22 rodajas de 8 ratones). En todos los casos barras negras para rodajas WT y rojas para *Lis1/sLis1*.

Por último, cabe resaltar la diferencia que los valores de presencia de postdescargas entre la ACC y la RSC entre animales WT. En la región ACC se observó una mayor frecuencia de postdescargas respecto a la RSC tanto evocadas como espontáneas, siendo el valor de estas últimas especialmente pequeño en la gRSC.

1.5. Estudio de frecuencia de las postdescargas oscilatorias.

Otro aspecto interesante de las postdescargas asociadas a la ASE es la frecuencia a la que oscilan. Así pues se cuantificó la frecuencia de estas, tanto asociadas a actividad epileptiforme evocada como espontánea. Para medir la frecuencia de las postdescargas se consideraron solo aquellas que presentaban un mínimo de 5 ciclos de oscilación consecutivos de igual duración (ver figura R1.8A); la frecuencia de las postdescargas se midió en la zona central de las postdescargas, en la que la frecuencia es más estable (figura R1.8A). En cada rodaja y en cada posición de registro se cuantificó el promedio de frecuencia de las postdescargas de todas las respuestas en las que éstas estaban presentes, con un máximo de 10 respuestas. En la Figura R1.8 se muestran los datos obtenidos en la ACC para postdescargas presentes en respuestas evocadas y espontáneas. En la ACC se cuantificó la frecuencia de las postdescargas en posiciones de registros correspondientes en ambas subdivisiones, en las mismas posiciones de registro que en apartados anteriores: 1.2mm respecto electrodo de estímulo para la ACC primaria y 1.6mm respecto electrodo de estímulo para ACC secundaria.

En la Figura R1.8A se muestra como ejemplo un registro evocado de la región dorsal de la ACC primaria de una rodaja WT (trazo negro) y otro de una *Lis1/sLis1* (trazo rojo) en el que se muestra la descarga inicial seguida de varias postdescargas, que ejemplifica los registros obtenidos. En el recuadro se resalta el área de máxima sincronía en cada caso, y que fue empleado para la cuantificación de la frecuencia de las postdescargas. En la Figura R1.8B se muestra dicho fragmento con más detalle. Como se puede observar claramente, el número de postdescargas por unidad de tiempo es mayor en los animales WT que en los *Lis1/sLis1*. Por último, en la Figura R1.8C se muestran la cuantificación de los valores promedio de frecuencia en ambas subdivisiones de la ACC los cuales reflejan lo anteriormente descrito. Tanto en ACC primaria (registros en la posición de 1.2mm) como secundaria (registros en la posición de 1.6mm) los valores de frecuencia de postdescargas fueron significativamente mayores en rodajas WT (símbolos negros) respecto a rodajas *Lis1/sLis1* (símbolos rojos), tanto para postdescargas asociadas a actividad evocada como espontánea.

En cuanto a la RSC se escogieron para la cuantificación las posiciones de registro pertenecientes a 0.8mm respecto al electrodo de estímulo para el estudio de las postdescargas en la aRSC y 1.6mm para la aRSC. En cuanto a la gRSC los resultados fueron muy semejantes a los descritos para la ACC, como así se muestra en la Figura R1.9.

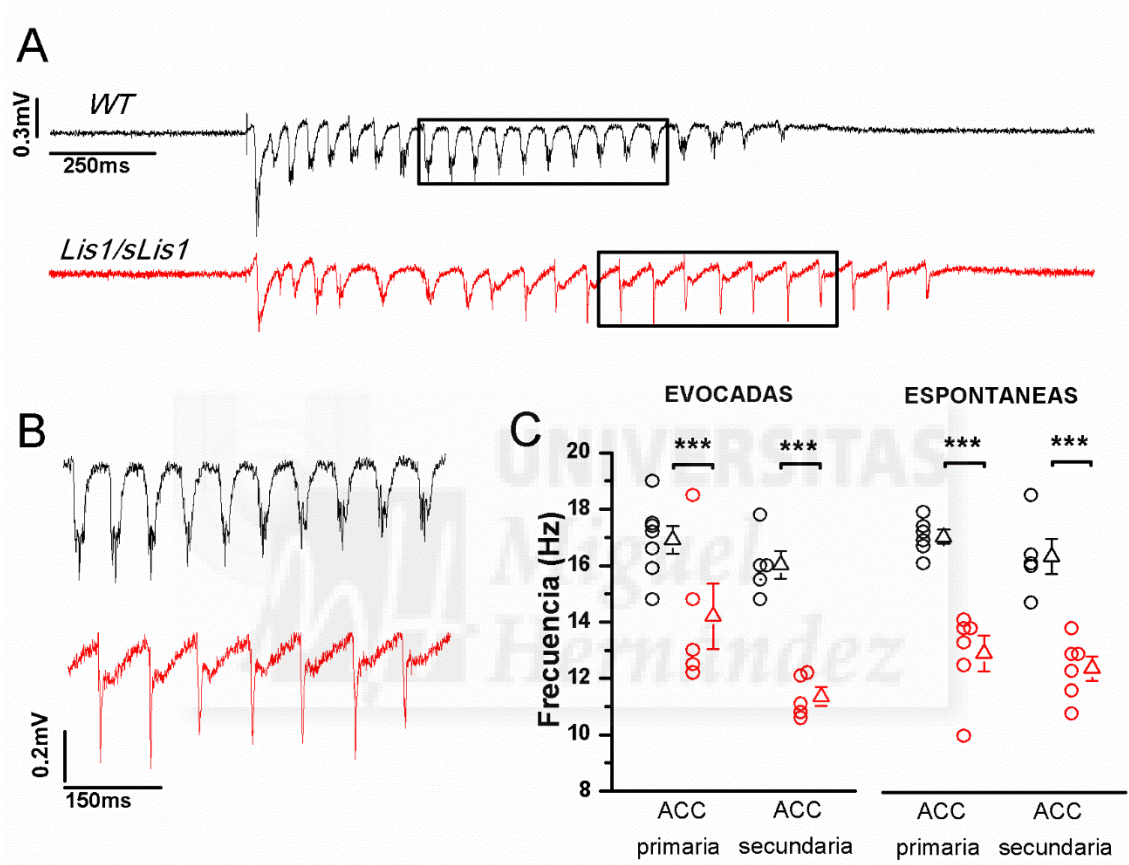


Figura R1.8. Frecuencia de las postdescargas presentes en ASE evocada y espontánea en la ACC. **A)** Ejemplo de registro de postdescargas asociadas a ASE evocada, obtenido en la posición de 1.2 mm respecto al estímulo, correspondiente con la región ACC primaria de una rodaja WT (trazo negro) y de una rodaja *Lis1/sLis1* (trazo rojo). **B)** Detalle de las postdescargas de ambos registros señaladas con un recuadro en A. Nótese el mayor número de descargas por unidad de tiempo en la rodaja WT (negro) que en la rodaja *Lis1/sLis1* (rojo). **C)** Valores individuales por rodaja (círculos) y sus medias \pm S.E (triángulos) de la frecuencia de las postdescargas asociadas a actividad evocada (ACC primaria WT=5 rodajas, de 5 ratones; *Lis1/sLis1*=5 rodajas de 4 ratones. ACC secundaria WT=5 rodajas de 5 ratones; *Lis1/sLis1*=5 rodajas de 4 ratones) y espontánea (ACC primaria WT=6 rodajas de 4 ratones; *Lis1/sLis1*=6 rodajas de 5 ratones. ACC secundaria WT=6 rodajas de 4 ratones; *Lis1/sLis1*=5 rodajas de 5 ratones) tanto en rodajas WT (símbolos negros) como *Lis1/sLis1* (símbolos rojos).

En la Figura R1.9A se muestra un registro representativo de ambos genotipos (WT trazo negro; *Lis1/sLis1*, trazo rojo) de ASE evocada en la aRSC de nuevo con la zona de máxima sincronía delimitada por un recuadro. En la Figura R1.9B se muestra la zona de máxima sincronía con más detalle, en la que se ve a simple vista la diferencia en el número de ciclos por unidad de tiempo, el cual se reduce en las rodajas obtenidas de ratones *Lis1/sLis1*. Por último en la Figura R1.9C se dan los valores de la frecuencia de las postdescargas en la RSC dorsal. En el caso de las postdescargas asociadas a actividad evocada se encontraron diferencias significativas siendo el valor de frecuencia en rodajas WT (símbolos negros) significativamente mayor al de las *Lis1/sLis1* (símbolos rojos) y teniendo un valor semejante al descrito en la ACC ($\approx 16\text{Hz}$). En el caso de las postdescargas asociadas a actividad espontánea aunque el valor medio también se encontró superior en rodajas WT que en rodajas *Lis1/sLis1*, este no presentaba diferencias significativas.

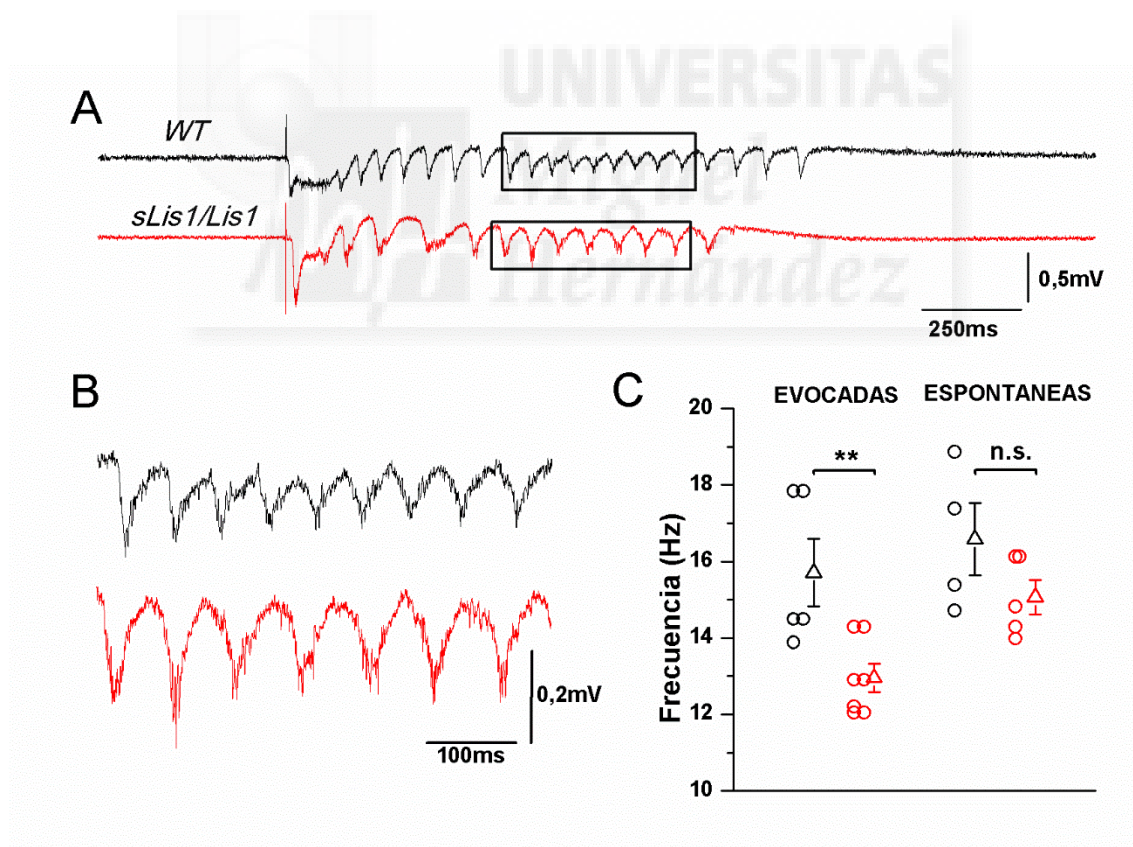


Figura R1.9. Frecuencia de las postdescargas asociadas a actividad evocada y espontánea en la aRSC. **A)** Ejemplo de registro en la corteza aRSC realizado en una rodaja WT (trazo negro) y en una *Lis1/sLis1* (trazo rojo) en la posición de 0.8 mm respecto del estímulo. **B)** Detalle de las postdescargas de ambos registros presentados en A y señalados con un recuadro. Nótese el mayor número de descargas por unidad de tiempo

en la rodaja WT (negro) que en la rodaja *Lis1/sLis1* (rojo). C) Valores individuales por rodaja (círculos) y sus medias \pm S.E. (triángulos) de la frecuencia de las postdescargas en la región aRSC asociadas a actividad evocada (WT=5 rodajas de 3 animales; *Lis1/sLis1*=7 rodajas de 4 animales) y espontánea (WT=4 rodajas de 3 animales; *Lis1/sLis1*=5 rodajas de 3 animales).

Por el contrario, en la región granular (o ventral) de la RSC la presencia de postdescargas fue muy escasa en comparación con la región aRSC. Además, la duración y la amplitud de las postdescargas en esta región eran muy pequeñas y la frecuencia muy irregular, por lo que la cuantificación fue imposible. En la Figura R1.10 se muestra un ejemplo de lo anteriormente descrito para animales WT (trazo negro) como *Lis1/sLis1* (trazo rojo) en la gRSC.

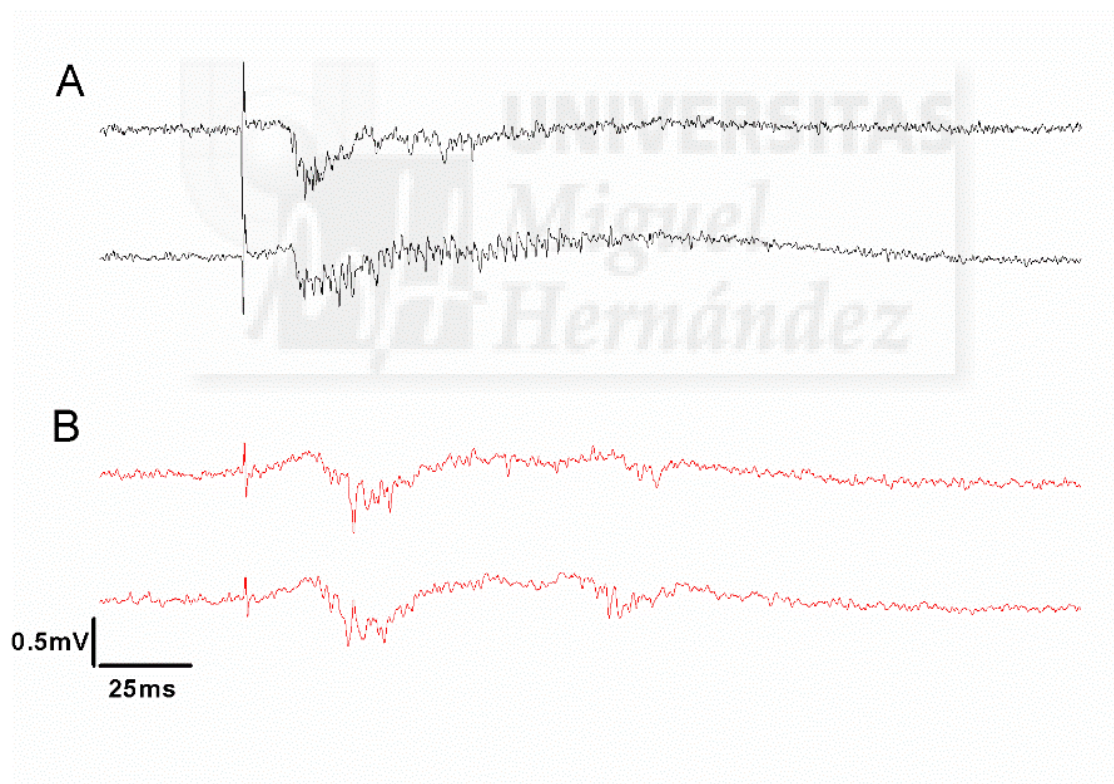


Figura R1.10. Postdescargas en la región gRSC (región ventral). Se muestran dos registros obtenidos en la posición de 1.6 mm (RSC ventral) en dos rodaja de un animal WT (panel A) y dos registros consecutivos en una rodaja de un animal *Lis1/sLis1* (panel B).



2. Sección segunda. Estudio de las interneuronas de tipo Fast-Spiking en la corteza motora primaria del ratón Lis1/sLis1.

2.1. Estudio de las propiedades electrofisiológicas de las interneuronas de tipo Fast-Spiking en la corteza motora primaria.

Los resultados presentados en la sección primera muestran la presencia de alteraciones en las propiedades funcionales de los circuitos corticales en el ratón *Lis1/sLis1*. Los datos previos de nuestro laboratorio muestran la presencia de alteraciones funcionales que afectan al sistema inhibitor cortical (Valdés-Sánchez y col., 2007) y alteraciones estructurales (una anómala distribución de las interneuronas GABAérgicas en la corteza cerebral) que también parecen afectar al sistema de inhibición cortical del ratón *Lis1/sLis1* (Domínguez y col., en preparación). Por esta razón, y como continuación del estudio funcional de la corteza del ratón *Lis1/sLis1*, nos planteamos estudiar las propiedades funcional de las interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral en este modelo animal.

El estudio de las propiedades electrofisiológicas de las interneuronas GABAérgicas corticales se hizo mediante registros intracelulares en rodajas coronales de la corteza motora primaria de ratones WT y *Lis1/sLis1*. Estos experimentos de registro intracelular se hicieron en la corteza motora primaria porque nuestros datos previos sobre la distribución anómala de interneuronas GABAérgicas en la corteza cerebral del ratón *Lis1/sLis1* están hechos en esta región cortical (Domínguez y col., en preparación).

Dado que las interneuronas GABAérgicas representan alrededor de un 15-20% del total de las neuronas presentes en la corteza, para facilitar la identificación y registro de estas neuronas en rodajas corticales se decidió cruzar la línea *Lis1/sLis1* con una línea transgénica que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de la proteína GAD67, la cual se expresa específicamente en esta subpoblación de neuronas corticales (Tamamaki y col., 2003). Mediante este cruce obtuvimos animales que expresan GFP en las interneuronas GABAérgicas, lo que permitió registrar las células positivas para GFP (fácilmente identificables mediante microscopía de fluorescencia) en rodajas obtenidas de estos animales. Se estudiaron las propiedades electrofisiológicas de las interneuronas corticales en animales *Lis1/sLis1* y se utilizaron como controles los

animales de la misma camada que no presentaban la mutación del gen LIS1 (ver métodos). Estos registros se hicieron en rodajas perfundidas con solución extracelular estándar a 34°C.

La figura R.2.1 muestra tres ejemplos de las respuestas electrofisiológicas obtenidas en condiciones de “*current-clamp*” de tres interneuronas GABAérgicas que expresan GFP registradas en la corteza motora. Se puede observar la variabilidad de las propiedades electrofisiológicas: resistencia de entrada, características del potencial de acción y patrón de disparo en respuesta a pulsos de corriente despolarizante. Esta heterogeneidad en las respuestas electrofisiológicas de interneuronas corticales ha sido descrita por otros autores (Kawaguchi y Kubota 1997).

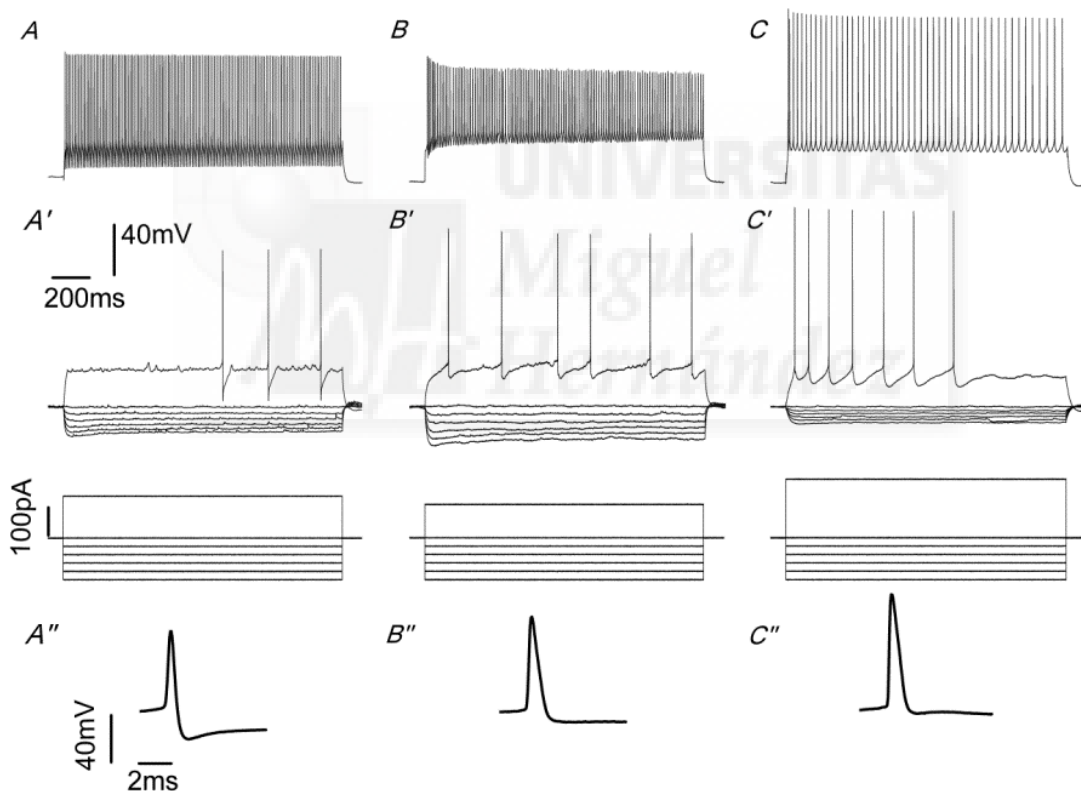


Figura R2.1. Diversidad en la población de células GAD67-GFP positivas. La figura muestra las respuestas de tres neuronas GAD67-GFP positivas (A, A', A''; B, B', B'' y C, C', C''). A, B y C, respuesta a un pulso de corriente despolarizante de amplitud grande. A', B' y C', respuestas a pulsos de corriente hiperpolarizantes y al primer pulso despolarizante supraumbral; los paneles inferiores muestran los pulsos de corriente. A'', B'' y C'', Detalle del primer potencial de acción evocado en los tres tipos de interneuronas. La neurona ilustrada en los paneles A, A' y A'' es una interneurona de tipo *Fast-Spiking*.

Debido a esta diversidad de propiedades electrofisiológicas entre interneuronas decidimos centrarnos en el estudio de las propiedades del subgrupo de interneuronas formado por las *Fast-Spiking* (FS). Este grupo representa un porcentaje de alrededor de un 40-50% del total de interneuronas corticales y se caracteriza por presentar unas propiedades electrofisiológicas relativamente homogéneas y fáciles de identificar y de diferenciar del resto de interneuronas (Kawaguchi y Kubota, 1997; Markram y col., 2004). Los rasgos electrofisiológicos que caracterizan las interneuronas FS son: a) en respuesta a pulsos de corriente despolarizante disparan a frecuencias altas y sin adaptación de frecuencia; b) los potenciales de acción son de muy corta duración y tienen post-hiperpolarizaciones (Ahp) de amplitud grande y curso temporal rápido y c) tiene una resistencia de membrana baja y presentan una alta frecuencia de potenciales sinápticos espontáneos alta. Los paneles A, A' y A'' muestran las propiedades electrofisiológicas típicas de una interneurona de tipo FS. El resto de tipos de interneuronas muestran propiedades electrofisiológicas muy heterogéneas (paneles B – C de la Figura R2.1), lo que hace muy difícil la comparación entre animales WT y *Lis1/sLis1*. En nuestros experimentos, del total de neuronas GAD67-GFP registradas en corteza motora primaria, en animales WT se determinó que de las 114 neuronas registradas un 40% (n=46) fueron del tipo FS, y en animales *Lis1/sLis1* de un 42% (n=45 de un total de 108). Estos valores se corresponden con los descritos previamente en la corteza del ratón GAD67-GFP por los autores de dicho animal transgénico (Tamamaki y col., 2003).

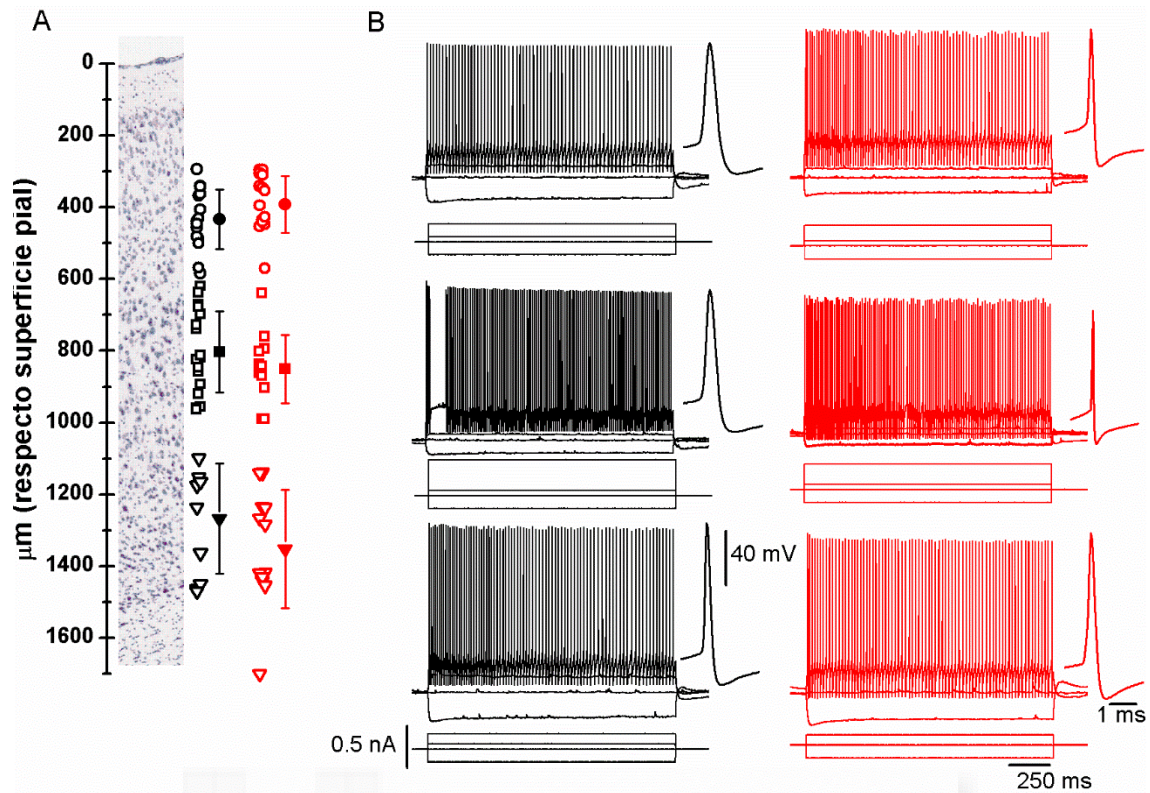


Figure R2.2. Interneuronas de tipo FS registradas en corteza motora primaria en ratones WT y *Lis1/sLis1*. **A)** Posición del soma de cada interneurona registrada de tipo FS respecto a la superficie pial. Los valores individuales y media de la distancia a la pia de las neuronas registradas en animales WT (símbolos negros) y *Lis1/sLis1* (símbolos rojos) se muestran junto a una sección coronal (tinción de Nissl) representativa de la zona en la que se hicieron los registros. Los símbolos rellenos muestran los valores promedios de la distancia del soma respecto a la pia por capa, tanto para la muestra de neuronas de animales WT (capa 2/3 $433.6 \pm 21.58 \mu\text{m}$, $n=15$; capa 5 $803.06 \pm 26.63 \mu\text{m}$, $n=18$; capa 6 $1267.9 \pm 48.45 \mu\text{m}$, $n=10$) como para la muestra de animales *Lis1/sLis1* (capa 2/3 $386.6 \pm 21.27 \mu\text{m}$, $n=14$; capa 5 $845 \pm 27.54 \mu\text{m}$, $n=12$; capa 6 $1346.9 \pm 46.32 \mu\text{m}$, $n=12$). Los límites establecidos entre capas fueron los siguientes: capa 1, desde superficie pial hasta $300 \mu\text{m}$ respecto esta; capa 2/3, de 300 a $550 \mu\text{m}$; capa 5, de 550 a $950 \mu\text{m}$; capa 6, a partir de $950 \mu\text{m}$; límites tomados como referencia empleando el *Allen Brain Atlas* (www.brain-maps.org). La sección columnar de corteza teñida mediante el método de Nissl se extrajo del *Allen Brain Atlas* (nivel 39 del atlas coronal de 56 días postnatales). **B)** Ejemplos de respuesta a pulsos de corriente hiper- y despolarizantes de interneuronas de tipo FS representativas de las distintas muestras registradas por capa y genotipo en corteza motora primaria (trazos negros para WT y rojos para las *Lis1/sLis1*); de arriba hacia abajo: neuronas de capa 2/3, de capa 5 y de capa 6. Junto a cada registro despolarizante supra-umbral se muestra, a una mayor escala temporal, el primer potencial de acción evocado. Las barras de escala mostradas son aplicables a todos los registros. El potencial en reposo de las neuronas mostradas en este panel era (de izquierda a derecha): -71.5mV , -63mV , -58mV , -70mV , -64mV , -74mV .

Los criterios de inclusión en el grupo de las interneuronas de tipo FS utilizados en nuestros experimentos fueron: a) el disparo de potenciales de acción a frecuencias altas sin adaptación de frecuencia en respuesta a pulsos de corriente despolarizante y b) poseer un potencial de acción con un tiempo de duración al 50% del pico menor de 0.25ms. La Figura R2.2 muestra la localización en la corteza motora y las respuestas electrofisiológicas de las interneuronas de tipo FS registradas en animales WT y *Lis1/sLis1*. En la Tabla R2.1 se muestran los valores promedio de las propiedades electrofisiológicas de las poblaciones de interneuronas de tipo FS por capa para cada genotipo. En la capa 2/3 solo se observó una disminución significativa en la amplitud del potencial de acción en células *Lis1/sLis1* respecto las WT. En capa 5 no se encontraron diferencias significativas. En capa 6 se observó un umbral del potencial de acción más negativo en las neuronas de animales *Lis1/sLis1* que en las de animales WT.

	CAPA 2/3		CAPA 5		CAPA 6	
	WT	<i>Lis1/sLis1</i>	WT	<i>Lis1/sLis1</i>	WT	<i>Lis1/sLis1</i>
Em (mV)	-71.05±1.08 n=12	-68.44±2.05 n=11	-69.24±1.64 n=19	-70.73±1.32 n=13	-66.58±1.477 n=13	-71.5±1.71 n=11
Rm (MΩ)	82.46±8.44 n=12	91.49±5.44 n=9	111.14±14.08 n=15	85.26±8.48 n=13	99.96±12.83 n=13	101.13±15 n=9
Tm (ms)	4.46±0.54 n=12	3.98±0.52 n=9	5.43±0.95 n=10	4.29±0.46 n=12	3.4±0.4 n=12	6.13±1.36 n=8
A.P. umbral (mV)	-38.51±1.09 n=12	-40.47±2.29 n=11	-39.17±2.03 n=10	-42.94±1.85 n=13	-33.93±1.75 n=13	-48.3±2.53*** n=11
A.P. amplitud (mV)	72.75±1.89 n=12	64.22±2.2** n=11	78.4±2.29 n=10	76.36±2.91 n=13	75.58±3.5 n=13	79.85±3.85 n=11
A.P. duración (ms)	0.18±0.008 n=12	0.19±0.012 n=11	0.19±0.016 n=8	0.17±0.01 n=13	0.19±0.016 n=13	0.23±0.02 n=11

Tabla R2.1. Propiedades electrofisiológicas de las interneuronas FS registradas. Se muestran los valores obtenidos para cada parámetro (media±S.E.), bajo el cual se muestra el número de casos. El potencial en reposo (Em) fue medido justo al entrar en modo *whole cell*. La resistencia de membrana (Rm) fue medida empleando el primer pulso hiperpolarizante respecto al potencial en reposo. La constante de tiempo de la membrana (τ_m) fue medida a partir del ajuste a una exponencial realizado en la fase de carga de la respuesta de voltaje al primer pulso de corriente hiperpolarizante. La amplitud del potencial de acción fue medida desde el umbral, y la duración fue medida al 50% de la amplitud máxima.

Seguidamente se estudió la relación entre la frecuencia de disparo de potenciales de acción y la amplitud de los pulsos de corriente despolarizante y las propiedades de la posthiperpolarización (Ahp) del potencial de acción. Los datos obtenidos se muestran en la Figura R2.3. La Figura R2.3A muestra la relación entre la frecuencia de disparo y la amplitud de los pulsos de corriente despolarizante (ésta última mostrada como incremento respecto a la rheobase) tanto en neuronas WT y *Lis1/sLis1* de capas 2/3, 5 y 6. En la capa 2/3 se observó un aumento significativo en la pendiente de la relación frecuencia / corriente en las neuronas *Lis1/sLis1* respecto a las WT; esto muestra una mayor excitabilidad de las interneuronas de tipo FS de la capa 2/3 en animales *Lis1/sLis1*. Por lo contrario, en las neuronas de capas 5 y 6, aunque para los pulsos de baja intensidad si existe una tendencia similar, esta diferencia no es significativa.

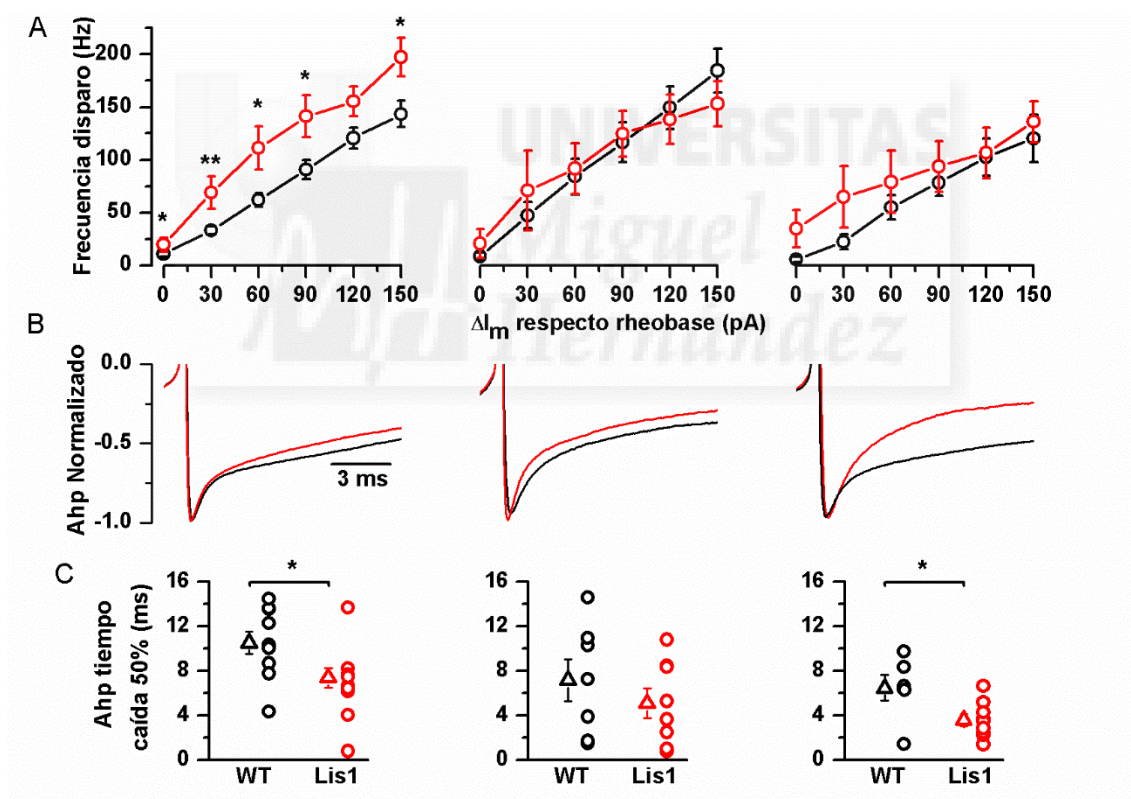


Figura R2.3. Frecuencia de disparo en respuesta a pulsos despolarizantes supraumbrales y propiedades de la posthiperpolarización del potencial de acción (Ahp) en interneuronas de tipo FS. A) Relación entre la frecuencia de disparo y la amplitud de los pulsos despolarizantes de corriente obtenida a partir de las respuestas a pulsos despolarizantes de amplitud creciente. El incremento en frecuencia de disparo esta dado desde el pulso umbral (rheobase). Trazos negros para células WT (capa 2/3 n=10; capa 5, n=18; capa 6, n=14) y trazos rojos para células *Lis1/sLis1* (capa 2/3, n=12; capa

5, n=13; capa 6, n=12). **B)** Curso temporal de la Ahp en FS WT (trazos negros) y *Lis1/sLis1* (trazos grises); se representa el curso temporal promedio con la Ahp normalizada al umbral en células WT (capa 2/3, n=9; capa 5, n=8; capa 6, n=10) y *Lis1/sLis1* (capa 2/3, n=9; capa 5, n=9; capa 6, n=9). **C)** Tiempo de caída al 50% de la Ahp calculado a partir del curso temporal normalizado. Símbolos en negro para WT y grises para *Lis1/sLis1*. Valores individuales y media±s.e.

La amplitud de la Ahp (medida desde el umbral del potencial de acción) fue similar en neuronas WT y *Lis1/sLis1*: capa 2/3 WT $-27.53 \pm 0.95\text{mV}$ (n=12) vs *Lis1/sLis1* $-26.90 \pm 1.76\text{mV}$ (n=11); capa 5 WT $-26 \pm 1.36\text{mV}$ (n=10) vs *Lis1/sLis1* $-24.57 \pm 1.54\text{mV}$ (n=13) y capa 6 WT $-28.22 \pm 1.41\text{mV}$ (n=10) vs *Lis1/sLis1* $-22.59 \pm 1.3\text{mV}$ (n=11). Sin embargo, sí se observaron diferencias en el curso temporal de la Ahp. En la Figura R2.3B se muestra el curso temporal de la post-hiperpolarización del potencial de acción en las capas 2/3, 5 y 6; el curso temporal de la post-hiperpolarización se cuantificó mediante el tiempo desde el pico de la Ahp hasta el 50% de la amplitud de la Ahp (Figura R2.3 C). Como se puede observar, la fase de repolarización de la posthiperpolarización (Ahp) es más rápida en las células *Lis1/sLis1*, aunque la diferencia solamente es significativa en las capas 2/3 y 6. Esta diferencia en el curso temporal de la Ahp podría, en parte, explicar la diferencia en la relación frecuencia de disparo – corriente mostrada en la Figura R2.3 A.

2.2. Estudio de las corrientes excitadoras post-sinápticas espontáneas (sEPSC) en células Fast-Spiking de la corteza motora primaria.

Como se ha dicho anteriormente, las interneuronas de tipo FS se caracterizan por presentar una frecuencia elevada de corrientes post-sinápticas excitadores espontáneos; estas corrientes se pueden observar en el ejemplo de neurona FS mostrado en la Figura R2.1 A. El estudio de estas corrientes arroja información sobre las aferencia sináptica excitadora que reciben estas neuronas. Estas respuestas sinápticas espontáneas se estudiaron en modo voltaje clamp, fijando el potencial de membrana a -70mV . Teniendo en cuenta que en nuestros experimentos el potencial de equilibrio de cloruro es de aproximadamente -70mV (ver la composición de las soluciones intra- y extracelulares descritas en el apartado de métodos) en estas condiciones se registran claramente las corrientes sinápticas excitadoras espontáneas (sEPSC). Los resultados obtenidos se exponen en la Figura R2.4. En la Figura R2.4A se muestra un ejemplo de registro representativo de sEPSC para las capas 2/3, 5 y 6, tanto para células WT como *Lis1/sLis1*. A partir de los registros cuantificamos las propiedades básicas de estas corrientes

obteniendo la frecuencia, amplitud y constante de tiempo de la fase de caída. En la Figura R2.4B se muestra para las capas 2/3, 5 y 6 respectivamente la distribución de la amplitud de dichas corrientes. Como se puede observar, en la capa 2/3 la distribución de amplitudes en células *Lis1/sLis1* se encuentra desplazada hacia la derecha respecto a la de células WT, mientras que en el resto de capas las distribuciones para ambos genotipos fueron semejantes. Este desvío en la distribución de amplitudes en la capa 2/3 queda reflejado en el valor medio de la amplitud de las sEPSC de las neuronas FS de la capa 2/3, siendo este significativamente mayor en la población de células *Lis1/sLis1* ($25.89 \pm 1.18\text{pA}$, $n=7$) que en las WT ($22.72 \pm 0.64\text{pA}$, $n=11$; $p<0.05$). Sin embargo, la amplitud media de las sEPSC registradas en capas 5 y 6 fue similar (capa 5: WT $27.65 \pm 0.73\text{pA}$, $n=10$; *Lis1/sLis1* $29.32 \pm 2.08\text{pA}$, $n=9$; capa 6: WT $32.35 \pm 2.02\text{pA}$, $n=12$; *Lis1/sLis1* $32.21 \pm 4.68\text{pA}$, $n=10$). En la Figura R2.4C se representa los valores de la frecuencia de sEPSC observados por capa y genotipo.

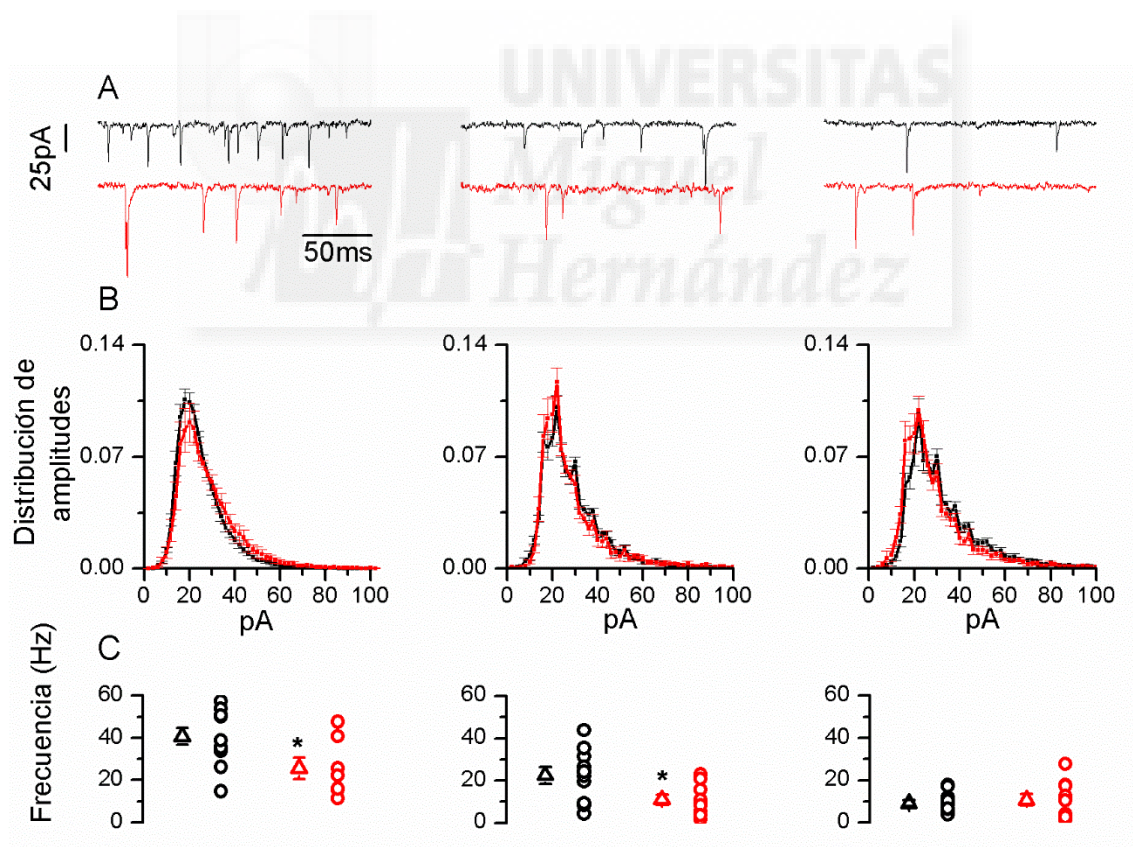


Figura R2.4. Propiedades de las sEPSC en interneuronas FS de corteza motora primaria. La figura muestra las propiedades de las sEPSC en interneuronas FS en animales WT (trazos y símbolos en negro) y *Lis1/sLis1* (trazos y símbolos en rojo) en las capas 2/3 (paneles de la izquierda), 5 (paneles centrales) y 6 (paneles de la derecha). **A)** Ejemplo de registro representativo de interneuronas FS de cada capa y para cada genotipo.

B) Distribución de las amplitudes de las sEPSC agrupadas en intervalos de 2pA; esta distribución está calculada, para cada neurona, dividiendo el histograma de amplitudes por el número total de sEPSC obtenidos en esa neurona y cada panel muestra la media±S.E. de las distribuciones de las neuronas de cada grupo. **C)** Representación de valores promedio de frecuencia de sEPSC (triángulos) así como los valores individuales por célula (círculo). Para todos los paneles mostrados la muestra fue en capa 2/3 WT n= 12 y *Lis1/sLis1* n=7; capa 5 WT n=10 y *Lis1/sLis1* n=9; capa 6 WT n=12 y *Lis1/sLis1* n=10.

Tanto en la capa 2/3 como en la capa 5 se observó una disminución significativa en la frecuencia de corrientes excitadoras espontáneas en células *Lis1/sLis1*, mientras que en capa 6 se observaron valores promedio iguales. Por último, no se encontraron diferencias en los valores de la constante de tiempo de caída entre células WT y *Lis1/sLis1* en ninguna de las tres capas (capa 2/3: WT 1.21 ± 0.09 ms, n=12, y *Lis1/sLis1* 1.33 ± 0.16 ms, n=7; capa 5 WT 1.27 ± 0.06 ms, n=10, y *Lis1/sLis1* 1.31 ± 0.15 ms, n=9; capa 6 WT 1.85 ± 0.09 ms, n=12, y *Lis1/sLis1* 1.72 ± 0.18 ms, n=10).





3. Sección tercera. Estudio de la actividad eléctrica espontánea de la corteza cerebral mediante experimentos de registro “in vivo” en la corteza motora primaria de ratón *Lis1/sLis1*.

Los resultados mostrados anteriormente, así como resultados previos de nuestro laboratorio (Valdés-Sánchez y col., 2007), muestran la presencia de diversas alteraciones electrofisiológicas en la corteza cerebral del ratón *Lis1/sLis1*. Estas alteraciones se han mostrado en preparaciones de rodajas de corteza cerebral in vitro y son claras a nivel celular (propiedades eléctricas de neuronas, propiedades de la transmisión sináptica, etc.), lo que hace pensar que es posible que se traduzcan en alteraciones de la actividad eléctrica cortical global registrada en animales intactos. De entre las alteraciones observadas en la corteza cerebral del ratón *Lis1/sLis1* destacan las alteraciones de las interneuronas de tipo FS; se ha postulado que estas interneuronas constituyen un elemento clave en el circuito local a la hora de generar actividad sincrónica (Wang 2010), especialmente en el rango gamma, por lo que alteraciones en alguna de sus propiedades podría conllevar una disfunción del circuito local y por tanto de la capacidad de generar patrones de actividad sincrónica.

3.1. Estudio de la potencia de la actividad eléctrica de corteza motora primaria.

Para el estudio de la actividad eléctrica de la corteza motora primaria se obtuvieron registros de potenciales locales de campo espontáneos (LFP) en cada capa de corteza motora en animales anestesiados. Para esto, se empleó un multielectrodo de 32 canales, el cual se introdujo perpendicularmente respecto a la superficie pial para así registrar todo el espesor de la corteza. Posteriormente seleccionamos un canal ubicado en las capas 2/3, 5 y 6 (siempre a la misma distancia respecto a la superficie pial). Se obtuvieron registros en animales *Lis1/sLis1* y se compararon con los obtenidos en los animales WT.

La Figura R3.1 muestra el espectro de potencia (en el rango de 8 – 100Hz) de la actividad registrada en capas 2/3, 5 y 6 en animales WT y *Lis1/sLis1*. En la Figura R1.2.5A, se muestra el valor promedio de la potencia del espectro de frecuencia en las capas 2/3, 5 y 6, tanto para animales WT como para *Lis1/sLis1*. En términos generales, los animales WT muestran un perfil de potencia a lo largo del espectro de frecuencia muy similar entre las

tres capas. Así, los valores de potencia más elevados se determinaron en bandas de bajas frecuencias, los cuales van disminuyendo progresivamente hacia rangos de frecuencias mayores, patrón típico en registros realizados en animales anestesiados. En animales *Lis1/sLis1*, el perfil de potencia a lo largo del espectro de frecuencia fue similar al descrito para animales WT, como se muestra en la Figura R3.1A, pero los valores de potencia, en general, fueron superiores. En la Figura R3.1B se muestra la cuantificación de la potencia por bandas de frecuencia en animales WT y *Lis1/sLis1*.

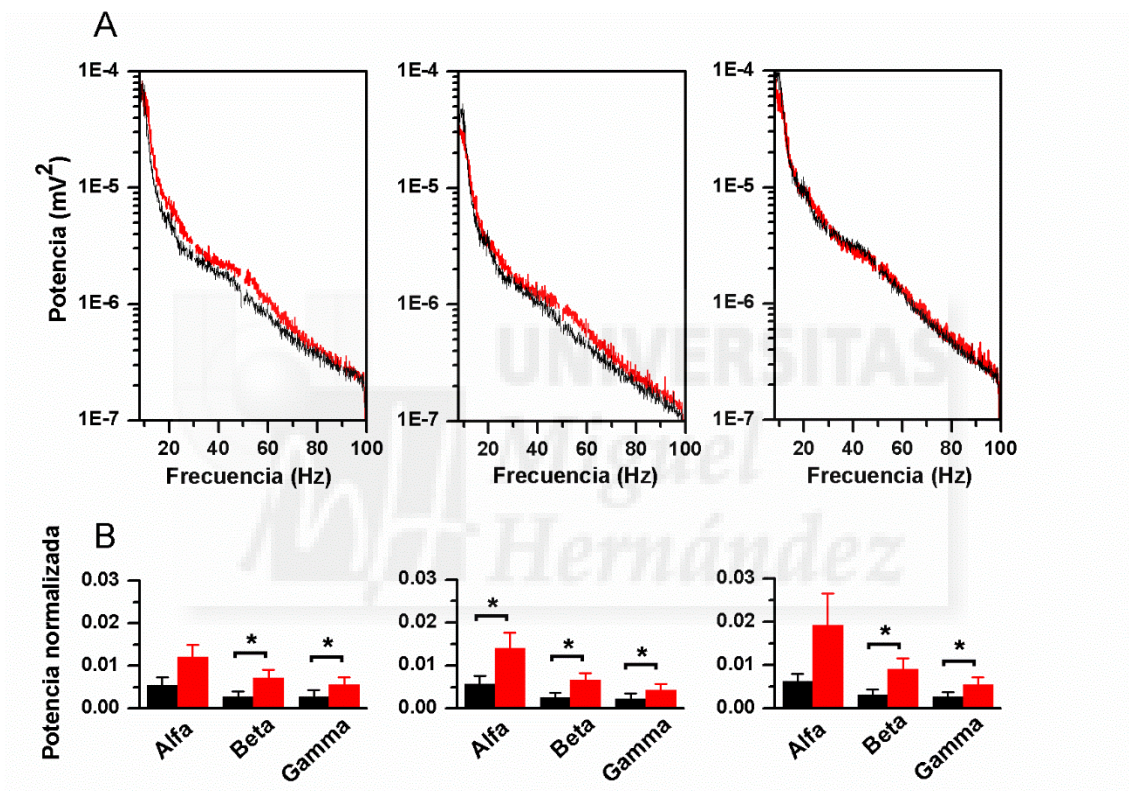


Figure R3.1. Espectro de potencia de los LFP registrados en las distintas capas de en la corteza motora primaria. A) Potencia promedio en el rango de 8 – 100 Hz de los LFP registrados con un multielectrodo situado en la corteza motora primaria de animales WT (trazos negros) y *Lis1/sLis1* (trazos rojos) para capa 2/3 (panel izquierdo), capa 5 (panel central) y capa 6 (panel derecho). El área intervalo entre 49.5 Hz y 50.5 Hz ha sido eliminado y corresponde al intervalo de frecuencias eliminado por el “notch filter” de 50Hz. La resolución de frecuencia fue de 0.1Hz. **B)** Potencia de cada una de las bandas de frecuencia de la actividad eléctrica registrada en capa 2/3 (panel izquierda), capa 5 (panel central) y capa 6 (panel derecho) para animales WT (barras negras) y animales *Lis1/sLis1* (barras rojas). En cada registro individual la potencia de cada banda está normalizada respecto a la potencia de la banda delta; esta normalización se hizo en cada registro individual antes de calcular la potencia media de cada banda. Los rangos de frecuencia de cada banda son: alfa, 8-13Hz; beta: 13-30Hz, gamma: 30-100Hz. En todos los casos WT n=8 animales y *Lis1/sLis1* n=11 animales.

La potencia fue mayor en todas las bandas de frecuencia, siendo este incremento significativo en las bandas de frecuencia beta y gamma en la capa 2/3 y en la capa 6, y en las bandas alfa, beta y gamma en la capa 5.

3.2. Estudio de la coherencia de la actividad eléctrica de la corteza motora primaria.

El siguiente paso fue el cálculo de la coherencia de la actividad eléctrica entre distintas capas corticales; la coherencia es una medida de la sincronía entre capas de la actividad eléctrica registrada simultáneamente con el multielectrodo.

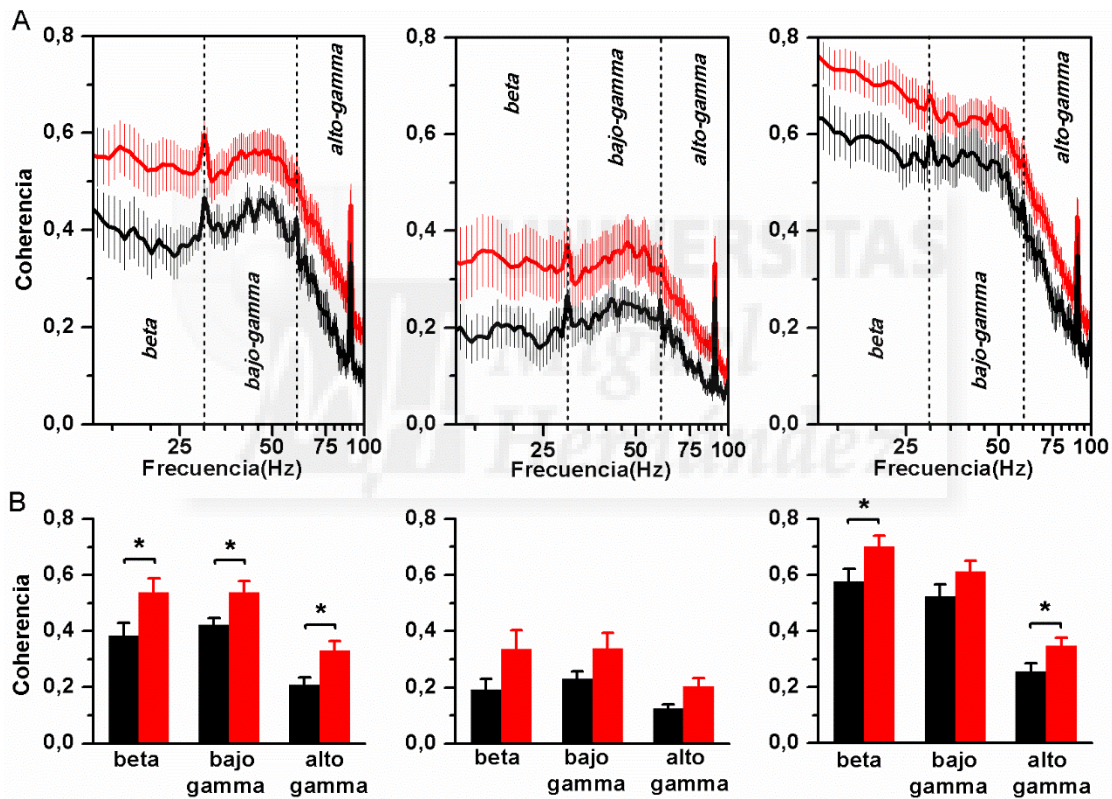


Figura R3.2. Coherencia de la actividad eléctrica entre distintas capas en la corteza motora primaria. **A)** Valor promedio de la coherencia obtenida para distintas frecuencias al comparar la actividad eléctrica de la capa 2/3 y la capa 5 (panel izquierdo), la capa 2/3 y la capa 6 (panel central) y la capa 5 y la capa 6 (panel derecho) en animales WT (trazos negros; n=8 animales) y *Lis1/sLis1* (trazos rojos; n=11 animales). La resolución de frecuencia fue de 0.6 Hz. **B)** Comparación de la coherencia por bandas de frecuencia entre capa 2/3 y capa 5 (izquierda), capa 2/3 y capa 6 (centro) y capa 5 y capa 6 (derecha) en WT (barras negras; n=8 animales) y animales *Lis1/sLis1* (barras rojas; n=11 animales). El espectro de frecuencia se dividió siguiendo las siguientes bandas; alfa (8-13Hz), beta (13-30Hz), bajo-gamma (30-60Hz) y alto-gamma Gamma (60-100Hz).

La Figura R3.2 muestra los resultados de la coherencia obtenida entre la actividad de capas corticales. En la Figura R3.2A se muestra la coherencia promedio de cada genotipo obtenida al comparar los LFP registrados en capa 2/3 y capa 5, en capa 2/3 y capa 6 y en capas 5 y capa 6. En primer lugar podemos observar que, en animales WT, la coherencia es relativamente mayor entre capas 5-6 y capas 2/3-5 respecto a la obtenida para capas 2/3-6; esto es especialmente claro para frecuencias de hasta ~ 75 Hz. En cuanto los valores promedio de coherencia entre capas obtenidos en animales *Lis1/sLis1*, estos conservaron las mismas diferencias relativas entre sí, pero en general fueron mayores que los obtenidos en animales WT.

En la Figura R3.2B se muestran los valores promedio de coherencia para cada banda de frecuencia. Debido a que se observa un descenso relativamente brusco en la coherencia a partir de ~ 60 Hz (Figura R3.2A) se decidió dividir la banda de frecuencias gamma en “bajo-gamma (30-60Hz)” y “alto-gamma (60-100Hz)”. Además, la coherencia de las frecuencias inferiores a las de la banda beta (< 13 Hz) fue idéntica en animales WT y *Lis1/sLis1* y por eso no se muestra en la figura. En términos generales como se puede ver en la Figura R3.2B, estos valores promedio de coherencia fueron mayores para cada banda de frecuencia en animales *Lis1/sLis1* respecto animales WT. En concreto, la coherencia entre capas 2/3 y 5 fue superior significativamente en regiones del espectro de frecuencias media-alta, incluyendo las bandas Beta, bajo-Gamma y alto-Gamma. Por el contrario, para la coherencia entre capas 2/3 y 6 ninguno de los incrementos cuantificados para cada banda de frecuencia fue significativamente superior en animales *Lis1/sLis1*. En el caso de la coherencia entre capas 5 y 6, este aumento de coherencia generalizado fue significativamente superior en las bandas de frecuencia beta y alto-gamma.

DISCUSIÓN

1. Estudio de las propiedades de la ASE en la corteza cingular del animal *Lis1/sLis1*.

La ASE producida por el bloqueo específico de sinapsis inhibitorias mediadas por receptores GABA_A ha sido bien caracterizada desde principios de los años 80 en distintos modelos experimentales (Connors, 1984; Castro-Alamancos, 2000). Las propiedades de la ASE obtenida mediante el bloqueo de receptores GABA_A en rodajas coronales de ratón, y que se muestra en la primera sección de resultados, se corresponde con aquellas descritas previamente en distintas investigaciones (Connors, 1984; Alefeld y col., 1998; Rovira y Geijo-Barrientos, 2016).

En primer lugar, los valores de velocidad de propagación ipsilateral obtenidos en animales WT en ACC y RSC son muy semejantes a aquellos descritos previamente en respectivas regiones de la corteza (Rovira y Geijo-Barrientos, 2016). Estos se situaron en torno a 50-100mm/s, intervalo en el cual también se describió la velocidad de propagación de la ASE generada por bloqueo de GABA_A en corteza somatosensorial en ratones de 3 semanas postnatales (Alefeld y col., 1998). Esto lleva a pensar que el valor promedio de velocidad de propagación en corteza de ratón podría situarse alrededor de este rango. Aún situándose dentro de un rango relativamente acotado, en animales WT el valor de velocidad de propagación en la RSC se determinó significativamente mayor que en la ACC (alrededor del doble), lo cual nos revela que debe existir una organización a nivel de circuito local muy diferente entre ambas regiones corticales. Además estas diferencias deben radicar, al menos, a nivel de conexiones sinápticas excitadoras mediadas por receptores de AMPA, ya que estas son las encargadas de mediar la propagación de la ASE a lo largo de una misma capa cortical (Golomb y Amitai, 1997; Pinto y col., 2005). En cuanto a la propagación de la ASE en la corteza del ratón *Lis1/sLis1* esta se determinó significativamente disminuida en ambas regiones cingulares, lo cual indica claramente que en la corteza de este animal existe una alteración de conexiones excitadoras mediadas por receptores AMPA entre circuitos locales a lo largo de la capa 2/3 de un mismo hemisferio cortical. Otra evidencia en la misma dirección es el hecho de que la modulación de la latencia mediante el bloqueo parcial de dichas conexiones excitadoras

por CNQX produce un aumento de la latencia significativamente mayor en el ratón WT en ambas regiones cingulares, lo cual indica una clara pérdida de la sensibilidad al bloqueo específico por CNQX de conexiones mediadas por receptores AMPA en el animal *Lis1/sLis1* y por tanto que existe un funcionamiento anómalo de estas.

La propagación de la ASE a regiones homotópicas del hemisferio contralateral ha de ser un proceso a priori más complejo que la propagación a lo largo de una capa cortical en un mismo hemisferio. A parte de la propia generación de ASE en el hemisferio ipsilateral, la propagación de esta al hemisferio contralateral implica también su conducción a través del cuerpo caloso y su generación de nuevo en este. Además en caso de no generarse exactamente en la misma región homotópica, se ha de incluir la propagación hacia dicha zona. Por tanto, debido a que la ASE se trasmite a través de diferentes estructuras las comparaciones sobre la propagación de la ASE al hemisferio contralateral es más idóneo realizarlas en términos de latencia en lugar de velocidad de propagación. En cuanto a la propagación de la ASE al hemisferio contralateral en animales WT, los valores obtenidos para ambas regiones fueron muy similares a aquellos ya descritos (Walker y col., 2012; Rovira y Geijo-Barrientos, 2016). En general, en la corteza cingular se produce una disminución de la latencia en la propagación interhemisférica a lo largo del eje anteroposterior. Así pues, los valores de latencia en la ACC fueron en promedio varias veces superiores a los de la RSC, lo cual refleja de nuevo una diferencia en términos de circuito local y probablemente en la forma en cómo la ASE se origina en el hemisferio contralateral. Otro hecho que igualmente sugiere una diferencia tanto a nivel de circuito local como de conectividad interhemisférica es el distinto patrón dorso-ventral de latencias en la propagación al lado contralateral. Si bien en la RSC estas parecen ser semejantes en las distintas posiciones de registro contralateral, en la ACC existe un claro y progresivo incremento en la latencia desde posiciones más ventrales a posiciones dorsales. Por lo que respecta a la latencia en la propagación de la ASE al hemisferio contralateral en el ratón *Lis1/sLis1*, este muestra un claro aumento en toda la región cingular siendo este significativo en la RSC, lo cual podría también sugerir, al menos, una alteración de las conexiones excitadoras mediadas por AMPA, tipo de receptores que media la transmisión excitadora interhemisférica (Kumar y Huguenard, 2001).

En cuanto a las postdescargas, estas presentan una frecuencia considerablemente homogénea en ambas regiones cingulares ($\approx 16\text{Hz}$). Este valor es similar al ya descrito en condiciones de desinhibición, tanto en la región cingular como en otras (Castro-

Alamancos y Rigas, 2002; Rovira y Geijo-Barrientos, 2016). Esto sugiere un mecanismo subyacente común de sincronización en condiciones de desinhibición, conservado entre diferentes regiones corticales. De hecho diversos estudios farmacológicos llevados a cabo en distintas regiones corticales han demostrado que la aparición de postdescargas se debe a conexiones excitadoras locales recurrentes mediadas por receptores AMPA y también, aunque en una considerable menor proporción, por receptores de NMDA (Alefeld y col., 1998; Castro-Alamancos y Rigas, 2002; Walker y col., 2012), lo cual concuerda perfectamente con la observación realizada en nuestros registros en los que a concentraciones de CNQX de 0.5-1 μ M las postdescargas desaparezcan completamente tanto en animales WT como *Lis1/sLis1*. Por otro lado, en animales *Lis1/sLis1* la frecuencia de postdescargas se vio disminuida, aunque no drásticamente (\approx 4Hz), si de forma muy clara, indicando una deficiencia del circuito local en cuanto a su capacidad de generar postdescargas. De forma similar a la propagación, este defecto se encuentra íntimamente ligado a sinapsis excitadoras.

Respecto al estudio de la proporción de rodajas que presentaban postdescargas, este reveló una presencia diferencial entre ACC y RSC. Aunque la mayoría de casos las diferencias entre ACC y RSC no se determinaron como significativas (solo se encontraron entre ACC secundaria y gRSC, ambas zonas ventrales de sus respectivas regiones) esto puede ser debido a un sesgo en el establecimiento de los criterios de inclusión, ya que se determinó como rodaja capaz de generar postdescargas, todas aquellas capaces de generar alguna postdescarga asociada a la descarga inicial, tanto en el caso de espontáneas como evocadas. De hecho, como se especifica en el correspondiente apartado de resultados, la cuantificación de la frecuencia de postdescargas en la gRSC fue imposible de realizar, debido a la escasa presencia y amplitud de las postdescargas. Por tanto existe una clara diferencia entre las regiones ACC y RSC en cuanto a la capacidad de generar este tipo de actividad sincrónica y las postdescargas asociadas, aunque una vez generadas estas se establezcan en idénticos valores de frecuencia. Esta capacidad diferente a la hora de generar ASE entre ambas regiones debe tener un correlato a nivel de circuito local en la capa 2/3, como mínimo en cuanto a la organización de sus conexiones excitadoras.

En términos generales hay una tendencia a hablar de patrones conservados en cuanto a la organización cortical a pesar de que desde tiempos de Cajal se sabe que existen diferencias importantes entre distintas regiones. De hecho las diferencias en términos de

citoarquitectura y conectividad entre las distintas regiones de la corteza cingular son claras y estas existen a lo largo de la filogenia de mamíferos (Vogt y Paxinos, 2014). Aunque la corteza retrosplenial presenta una organización en capas muy semejante, a grandes rasgos, a la del resto de regiones neocorticales, esta deriva de una región palial distinta, y por tanto tiene un origen embrionario distinto a la ACC (Witter y Amaral, 2004). De acuerdo con esto, en la capa 2/3 de la gRSC existe una población de células piramidales de pequeño tamaño y con un patrón de disparo retardado muy característico por el cual reciben el nombre de *Late-Spiking*, las cuales también se encuentran en una proporción considerable en el subículo (Kurotani y col., 2013). Sin embargo en la ACC y en el resto de zonas neocorticales las células piramidales de capa 2/3 presentan el típico patrón de disparo regular (McCormick y col., 1985). Debido a que la ASE generada en condiciones de desinhibición en la capa 2/3 se propaga y genera postdescargas mediante conexiones excitadoras mayoritariamente entre células piramidales, puede que exista una correlación entre la presencia de esta considerable población de piramidales de tipo *Late-Spiking* en corteza retrosplenial y la menor capacidad de sincronización de los circuitos locales presentes en esta. Futuras investigaciones son requeridas para desdeñar cual es el rol de los distintos tipos de poblaciones celulares y sus conexiones entre si durante la aparición y propagación de la ASE, lo cual ayudaría también a la comprensión de la organización y sincronización del circuito local y las diferencias en este entre distintas regiones cingulares. En cuanto a la corteza de animales *Lis1/sLis1*, no se determinaron diferencias respecto a la presencia de postdescargas en la ACC. En la RSC, si se intuye una disminución de la presencia de estas en rodajas *Lis1/sLis1*, aunque en ningún caso estas diferencias fueron significativas.

En términos generales la relación de resultados obtenidos en la primera sección evidencia una alteración de las conexiones sinápticas excitadoras que forman los circuitos locales de la región cingular en la corteza del ratón *Lis1/sLis1*. Este hecho podría ser fácilmente achacado a defectos en alguno de los procesos biológicos en los que esté implicado la proteína LIS1. Muchos de ellos están directamente relacionados con la formación y maduración de sinapsis, como por ejemplo la regulación de la dinámica de los microtúbulos durante el crecimiento axonal y la formación de filopodios durante la sinaptogénesis, o el transporte axonal. De acuerdo con esto, se han descrito anomalías durante el proceso de formación de sinapsis excitadoras sobre dendritas de interneuronas debido a una reducción de la expresión de LIS1 (Kawabata y col., 2012). También bajo

esta situación se ha descrito una alteración en la formación de espinas dendríticas en células piramidales de capa 5 (Sudarov y col., 2013). Por otro lado, también se ha descrito previamente en el ratón *Lis1/sLis1* una alteración en el proceso de sustitución de subunidades del receptor de GABA_A durante la maduración de sinapsis inhibitorias sobre neuronas piramidales de capa 2/3 de corteza (Valdés-Sánchez y col., 2007). Alteraciones de este tipo producidas por carencias de LIS1 podrían explicar una alteración en la transmisión sináptica excitadora en la región cingular. Semejantemente se han descrito algunos defectos en sinapsis de este tipo de naturaleza en el hipocampo del ratón *Lis1^{+/-}*. Una reducción de la dosis de LIS1 de alrededor de un 50% conlleva una disfunción de la sinapsis de las colaterales de Schaffer procedentes de piramidales de CA3 sobre células piramidales de CA1 (Greenwood y col., 2009). Estos axones presentaban una distribución anómala. Adicionalmente se determinó un aumento de la frecuencia de corrientes excitadoras en las piramidales de CA1, además de un aumento de la facilitación sináptica sobre estas. Por otro lado, y de forma similar, en rodajas de hipocampo en las que se aisló el giro dentado junto al tracto perforante del resto de la formación hipocampal se determinó una alteración funcional de la sinapsis excitadora de dichas fibras procedentes de la corteza entorrinal sobre las células granulares (Hunt y col., 2012). Estos defectos descritos en distintos tipos de conexiones excitadoras en el hipocampo del ratón *Lis1^{+/-}* sugieren que esto podría ocurrir perfectamente en conexiones de semejante naturaleza en la neocorteza de un animal con déficits en la proteína LIS1. Por último, aunque para desdeñar de forma concreta los mecanismos por los cuales la alteración en los niveles de LIS1 afecta este tipo de conexiones requeriría de futuras investigaciones, queda claro que una alteración de esta proteína conlleva una disrupción generalizada de las conexiones excitadoras en la corteza cingular del ratón, lo cual debe traducirse en una alteración de los procesos cognitivos mediados por dicha región.

De forma similar a lo determinado en la corteza del ratón *Lis1/sLis1*, una alteración generalizada de la funcionalidad de las cortezas ACC y RSC y de su conectividad de larga distancia ha sido descrita en pacientes con distintas alteraciones psiquiátricas. Alteraciones en la conectividad interhemisférica en la ACC, así como con hipocampo y corteza prefrontal han sido descritas en pacientes de esquizofrenia (Cui y col., 2015). De forma similar en pacientes con el mismo trastorno psiquiátrico se determinó en la RSC una alteración de la actividad espontánea y de la conectividad con la ACC, en estado de reposo (Bluhm y col., 2009).

2. Estudio de las propiedades de las interneuronas de tipo Fast-Spiking en la corteza motora primaria del ratón *Lis1/sLis1*.

En primer lugar, la delección del primer exón en uno de los alelos que codifican para la proteína LIS1 no afecta de manera específica a la proliferación y/o migración de las interneuronas de tipo FS, ya que la proporción de este grupo respecto al total de interneuronas se determinó igual en ambos genotipos, lo cual se correlaciona con la expresión ubicua y elevada de LIS1 en todo el SNC (Reiner y col., 1995).

El grupo de interneuronas FS supone alrededor de un 40-50% del total de interneuronas y presenta una considerable homogeneidad en sus propiedades electrofisiológicas, permitiendo su estudio como conjunto (Kawaguchi y Kubota, 1997). Congruentemente, las propiedades electrofisiológicas descritas en las interneuronas de tipo FS en corteza motora primaria en animales WT fueron claramente homogéneas. Respecto a las propiedades electrofisiológicas de este grupo en la corteza del ratón *Lis1/sLis1*, no se encontraron grandes diferencias, en coherencia con lo descrito entre poblaciones de piramidales de capa 2/3 de corteza parietal en el mismo animal modelo (Valdés-Sánchez y col., 2007). Interesantemente, la única diferencia encontrada en este trabajo fue una reducción en la duración del potencial de acción. Similarmente, las únicas alteraciones encontradas en células FS en las distintas capas fueron también en el potencial de acción. En concreto en la capa 2/3 se determinó una disminución de la amplitud en el potencial de acción, lo cual debe estar asociado a una alteración en los canales iónicos responsables de las corrientes subyacentes. En la capa 6 se determinó una disminución en la significatividad del umbral del potencial de acción. El umbral del potencial de acción determina la magnitud que debe tener un evento despolarizante, y por tanto excitador, para provocar que la célula dispare. Así pues, esta disminución del umbral debe estar asociado a una alteración en cómo este tipo de interneuronas integran eventos excitadores, y por tanto son reclutadas. Esto podría conllevar una alteración del balance excitación-inhibición y de la forma en que estas interneuronas procesan los distintos impulsos eléctricos que convergen en ella, lo cual es fundamental para el correcto funcionamiento de los circuitos corticales. Diversas alteraciones en el umbral del potencial de acción han sido asociadas a diversos trastornos neurológicos. Un claro ejemplo fue la descripción de

mutaciones en los canales Nav1.1 y 1.2 en pacientes de autismo y epilepsia (Li y col., 2014).

También en las interneuronas FS de la capa 2/3 se determinó un incremento significativo de la frecuencia de disparo de potenciales de acción como respuesta a pulsos cuadrados de corriente, lo que quiere decir que ante un estímulo excitador de una determinada duración, las FS de la corteza del ratón *Lis1/sLis1* dispararán un mayor número de potenciales de acción. Dicho incremento podría estar explicado parcialmente por la disminución significativa en el tiempo de caída del componente lento de la posthiperpolarización del potencial de acción, aunque seguramente estén influyendo otros factores más determinantes ya que en la capa 6, aunque también existe una disminución significativa de este parámetro, no se traduce en un aumento de la frecuencia de disparo. En cualquier caso, el incremento en la frecuencia de disparo podría conllevar una alteración en la frecuencia de llegada de impulsos inhibitorios sobre las células diana y producir en consecuencia una alteración del balance excitación-inhibición sobre otras neuronas, la homeostasis del cual es esencial para el correcto procesamiento de la información. De hecho, un incremento similar se ha descrito en este mismo tipo de interneuronas en la corteza prefrontal de un ratón *Lis1/sLis1* para la proteína ErbB4, el cual ha sido propuesto como posible modelo para el estudio de la patofisiología de la esquizofrenia (del Pino y col., 2014). Desde hace un tiempo viene siendo sugerida la idea de que la diversidad de propiedades electrofisiológicas dentro del grupo de las interneuronas, entre las que el umbral del potencial de acción y la frecuencia de disparo son fundamentales, es uno de los pilares principales en los que se asienta la idea de considerar a las interneuronas como un elemento dinamizador del circuito cortical (Markram y col., 2004).

Las EPSC espontáneas son eventos despolarizantes subumbral generados por la liberación de vesículas de neurotransmisor desde el terminal presináptico, induciendo la apertura de canales iónicos asociados a receptores en el terminal postsináptico. Se ha determinado que cada una de estas corrientes espontáneas es debida a la liberación espontánea de vesículas de neurotransmisor desde el terminal presináptico (Malkin y col., 2013), siendo insignificante la liberación de vesículas debida a la llegada de potenciales de acción al terminal presináptico. Por tanto su estudio puede ofrecernos información sobre el funcionamiento de liberación vesicular sin tener en cuenta posibles variaciones en los niveles de excitabilidad de las células.

En el animal WT se determinó una mayor frecuencia de EPSC espontáneos en capas superiores respecto a las inferiores, lo cual puede tener una estrecha relación con el hecho de que en capas superiores se ha descrito que hay una mayor llegada de aferencias excitadoras procedentes de otras regiones de corteza, tálamo, y capas inferiores de la propia corteza motora, a parte de las sinapsis recibidas por neuronas piramidales vecinas. Sin embargo, las capas inferiores mayormente recibe conexiones excitadoras de capas superiores (Weiler y col., 2008). El animal *Lis1/sLis1* presenta una disminución de la frecuencia de EPSC espontáneas significativa de aproximadamente un 50% en capas 2/3 y 5. Dicha disminución podría ser debido a una reducción en el número de contactos sinápticos y/o un defecto en el mecanismo de liberación de vesículas desde el terminal presináptico. En relación con esto hace pocos años se demostró que una reducción de en la expresión de LIS1 de alrededor de un 50% producía una alteración en la organización de contactos sinápticos excitadores sobre interneuronas (Kawabata y col., 2012). De forma similar y en el ratón *Lis1/sLis1*, también se ha determinado una reducción de en la frecuencia de corrientes postsinápticas inhibitoras espontáneas en células piramidales de corteza parietal (Valdés-Sánchez y col., 2007).

La distribución en la frecuencia de amplitudes que se muestra en el apartado de resultados muestra en todas las capas un desplazamiento hacia la izquierda, indicando que existe una mayor cantidad de eventos de baja amplitud, en coherencia con lo descrito en corteza prefrontal de rata (Malkin y col., 2015). En este trabajo se sugiere que esta distribución es debida a la coexistencia de dos poblaciones de corrientes excitadoras, una muy numerosa y de amplitudes bajas, y otra minoritaria formada por aquellas de gran amplitud, lo cual podría deberse a la coexistencia de distintas poblaciones de receptores de glutamato en el terminal postsináptico. En las FS de la capa 2/3 de ratones *Lis1/sLis1* se encontró un aumento en la amplitud de las EPSC espontáneas, observándose un claro aumento en la frecuencia relativa de eventos de amplitud mayor respecto de células WT. Esta alteración podría ser explicada por una modificación en las propiedades de los receptores de glutamato en las FS de capa 2/3 del ratón *Lis1/sLis1*. De hecho, en este modelo ya se han descrito alteraciones en receptores presentes en el terminal postsináptico de neuronas piramidales (Valdés-Sánchez y col., 2007).

En cualquier caso, las distintas alteraciones descritas reflejan una alteración de la sinapsis excitadora sobre las interneuronas FS, lo cual puede tener consecuencias sobre el balance

excitación-inhibición en estas neuronas y, por extensión, en el funcionamiento de los circuitos corticales, de los cuales son un elemento clave (Markram y col., 2004).

3. Estudio de las propiedades de la actividad eléctrica cortical en la corteza motora primaria del ratón *Lis1/sLis1*.

Las interneuronas de tipo FS son un elemento esencial del circuito local y están directamente involucradas en el procesamiento de la información y en la transmisión de esta entre distintas regiones corticales, siendo por tanto un elemento básico para el desarrollo correcto de los distintos procesos cognitivos. Subyaciendo a estos, se sabe desde hace tiempo que existen patrones de actividad oscilatoria de distinta frecuencia, que emergen de la actividad sincronizada de las distintas poblaciones neuronales que conforman el circuito local, y en el desarrollo de los cuales las interneuronas FS juegan un papel central (Wang, 2010). Por esto no es descabellado pensar que el grupo de alteraciones descrito en este tipo de interneuronas pueda tener consecuencias en los distintos patrones de actividad cortical. Así pues los estudios de la potencia en los potenciales de campo registrados en corteza motora primaria revelaron un claro incremento de la potencia en la actividad oscilatoria en el animal *Lis1/sLis1* a lo largo de todo el espectro de frecuencias. Este incremento fue especialmente significativo en todo el rango de frecuencia medio-alto, lo cual revela una clara disfunción por parte del circuito local a la hora de generar patrones de actividad sincrónica en rangos de frecuencia media-alta.

Los rangos de frecuencia media-alta han sido asociados tradicionalmente con el procesamiento de información a nivel local, mientras que a los rangos de frecuencias menores se les atribuye la mediación de la sincronización de circuitos corticales distantes. Los patrones de actividad oscilatoria característicos de corteza motora primaria se establecen entre las bandas de frecuencia beta y gamma. Se ha sugerido que el estado basal de la corteza motora primaria se caracteriza por presentar oscilaciones en el rango beta y que la ejecución de órdenes motoras requiere una transición a oscilaciones en el rango gamma (Davis y col., 2012). El incremento significativo de potencia en esas bandas de frecuencia en el animal *Lis1/sLis1* sugiere que podría haber una alteración en la transición entre ambos estados durante el desarrollo de la función motora.

Otro rasgo característico de los circuitos corticales es la presencia de ciertos niveles de sincronización, lo cual se ha asociado a la transmisión de información entre distintas regiones corticales (Buzsaki y Watson, 2012). Los datos obtenidos entre las distintas capas en el animal WT revelan un patrón de coherencia muy concreto. El mayor nivel de coherencia es el descrito entre capas 2/3-5, seguido del de capas 5-6 y por último el de capas 2/3 y 6, deduciéndose que no existe el mismo nivel de sincronización entre las distintas capas de la corteza motora primaria. Teniendo en cuenta que el nivel de sincronización depende en buena parte del grado de conectividad existente entre dos regiones, las relaciones de coherencia entre capas concuerdan en gran medida con el patrón de conexiones interlaminares descritos para la corteza motora primaria (Weiler y col., 2008).

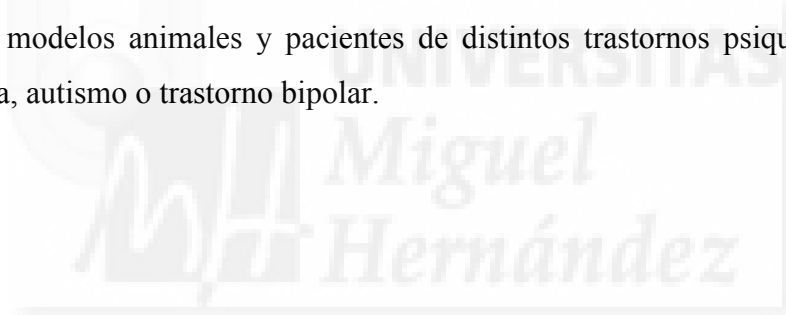
Además, los niveles de coherencia entre capas por lo general fueron mayores en rangos de baja frecuencia, que precisamente son los responsables de mediar la comunicación entre zonas distantes de corteza. También puede deberse a que la actividad eléctrica de baja frecuencia es la predominante en la corteza de un animal anestesiado. En cualquier caso, la coherencia entre capas en el ratón *Lis1/sLis1*, se encontró aumentada de forma a lo largo de todo el espectro de frecuencias, lo cual indica que existe una alteración en la sincronía entre las distintas capas de la corteza motora. Además, como se determina en la sección de resultados, las diferencias significativas en los niveles de coherencia se encontraron entre capa 2/3 y 5 y entre capa 5 y 6, precisamente las que se encuentran más interconectadas. Esto indica claramente una alteración en la conectividad entre las distintas capas de corteza motora primaria, principalmente mediada por conexiones excitadoras, lo cual podría tener repercusiones en el correcto funcionamiento dicha región cortical.

4. La corteza del ratón *Lis1/sLis1* como modelo de estudio de alteraciones asociadas al desarrollo cortical asociadas a enfermedades mentales.

Desde hace una década se viene proponiendo que la alteración de LIS1 no se circunscribe exclusivamente al clásico fenotipo de la lisencefalia, caracterizado por presentar una grave displasia cortical con drásticas consecuencias cognitivas (Dobyns y col., 2003). En base a datos experimentales y clínicos se ha sugerido que alteraciones en la proteína LIS1 podrían subyacer en distintos trastornos psiquiátricos relacionados con alteraciones del

desarrollo como esquizofrenia, autismo o trastorno bipolar (Reiner y Sapir, 2006; Tabarés-Seisdedos y col., 2006), los cuales se sabe desde hace años que comparten rasgos etiológicos, aunque de menor severidad, con la lisencefalia clásica.

Los resultados descritos previamente reflejan una disfunción generalizada de los circuitos corticales que componen las áreas cingular y motora primaria del ratón *Lis1/sLis1*. En los últimos años, alteraciones similares han sido determinadas en pacientes y modelos animales de diversas patologías, como por ejemplo autismo, esquizofrenia o trastorno bipolar (Bluhm y col., 2009; Moran y Hong, 2011; Cornew y col., 2012; Zikopoulos y Barbas, 2013; del Pino y col., 2013; Sauer y col., 2015). Algunas de estas alteraciones, como por ejemplo la alteración en las propiedades de la actividad eléctrica cortical, son consideradas un rasgo característico de dichas patologías y sustrato de las distintas disfunciones cognitivas asociadas estas. Por todo esto, proponemos el ratón *Lis1/sLis1* como modelo de estudio de patologías asociadas a alteraciones del desarrollo cortical de fenotipo menos drástico al que el de la lisencefalia, y en buen grado homólogas a aquellas descritas en modelos animales y pacientes de distintos trastornos psiquiátricos como esquizofrenia, autismo o trastorno bipolar.





CONCLUSIONES

- 1- La corteza cerebral del ratón *Lis1/sLis1* presenta alteraciones en las conexiones excitadoras que conforman los microcircuitos corticales.
- 2- La menor sensibilidad de la propagación de descargas epileptiformes a la aplicación de CNQX en la corteza cerebral en animales *Lis1/sLis1* sugiere que las alteraciones del componente excitador de los circuitos corticales se debe, al menos en parte, a alteraciones de los receptores de glutamato de tipo AMPA/kainato.
- 3- Las interneuronas inhibitoras de tipo FS de la corteza motora primaria de los ratones *Lis1/sLis1* presentan diversas alteraciones electrofisiológicas; estas alteraciones (junto con otras ya descritas) muestran que el sistema inhibitor cortical de los ratones *Lis1/sLis1* está significativamente alterado.
- 4- El conjunto de alteraciones electrofisiológicas de propiedades funcionales neuronales y sinápticas observadas en la corteza cerebral de los ratones *Lis1/sLis1* tienen repercusión en el funcionamiento global de la corteza cerebral, tal como muestra la presencia de alteraciones en la actividad eléctrica global (aumento de potencia y coherencia entre capas) registrada en la corteza cerebral en animales anestesiados.
- 5- Las alteraciones electrofisiológicas observadas en la corteza cerebral del ratón *Lis1/sLis1* son consistentes con alteraciones observadas en enfermedades del sistema nervioso causadas por alteraciones del desarrollo cortical; esto sugiere que el ratón *Lis1/sLis1* podría ser empleado como modelo experimental para el estudio de dichas patologías.



BIBLIOGRAFÍA

Aboitiz F, V. RG. 1997. The evolutionary origin of the language areas in the human brain. A neuroanatomical perspective. *Brain Research Reviews*. 25:381-396.

Alefeld M, Sutor B, Luhmann HJ. 1998. Pattern and Pharmacology of Propagating Epileptiform Activity in Mouse Cerebral Cortex. *Experimental Neurology*. 153:113-122.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. 2001. Classification system for malformations of cortical development: Update 2001. *Neurology*.57:2168-2178.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. 2005. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology*. 65:1873-1887.

Başar E, Güntekin B. 2008. A review of brain oscillations in cognitive disorders and the role of neurotransmitters. *Brain Research*. 1235:172-193.

Bi W, Sapir T, Shchelochkov OA, Zhang F, Withers MA, Hunter JV, Levy T, Shinder V, Peiffer DA, Gunderson KL, Nezarati MM, Shotts VA, Amato SS, Savage SK, Harris DJ, Day-Salvatore D-L, Horner M, Lu X-Y, Sahoo T, Yanagawa Y, Beaudet AL, Cheung SW, Martinez S, Lupski JR, Reiner O. 2009. Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. *Nature Genetics*. 41:168-177.

Bix GJ, Clark GD. 1998. Platelet-activating factor receptor stimulation disrupts neuronal migration in vitro. *Journal of Neuroscience*. 18(1):307-318.

Bland BH. 1986. The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Progress in Neurobiology*. 26:1-54.

Bluhm RL, Miller J, Lanius RA, Osuch EA, Boksmand K, Neufelde RWJ, Théberge J, Schaefer B, Williamson PC. (2009). Retrosplenial cortex connectivity in schizophrenia. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 174:17-23.

Brandon NJ, Handford EJ, Schurov I, Rain JC, Pelling M, Duran-Jimeniz B, Camargo LM, Oliver KR, Beher D, Shearman MS, Whitinga PJ. 2004. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 25:42-55.

Brealy JA, Shaw A, Richardson H, Singh KD, Muthukumaraswamy SD, Keedwell PA. 2014. Increased visual gamma power in schizoaffective bipolar disorder. *Psychological Medicine*. 45:783-794.

Buzsáki G. 2004. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science*. 304:1926-1929.

Buzsáki G, Watson BO. 2012. Brain rhythms and neural syntax: implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 14:345-367.

Cahana A, Escamez T, Nowakowski RS, Hayes NL, Giacobini M, Holst von A, Shmueli O, Sapir T, McConnell SK, Wurst W, Martinez S, Reiner O. 2001. Targeted mutagenesis of *Lis1* disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(11): 6429-6434.

Campbell, AW. 1905. *Histological studies on the localisation of cerebral function*. Cambridge University Press. 10:360.

Carlo CN, Stevens CF. 2013. Structural uniformity of neocortex, revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(4): 1488-1493.

Castro MA. 2000. Origin of synchronized oscillations induced by neocortical disinhibition in vivo. *Journal of Neuroscience*. 20(24):9195-9206.

Castro-Alamancos MA, Rigas P. 2002. Synchronized oscillations caused by disinhibition in rodent neocortex are generated by recurrent synaptic activity mediated by AMPA receptors. *The Journal of Physiology*. 542.2:567-581.

Caviness VS. 1975. Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *The Journal of Comparative Neurology*. 164:247-264.

Chong SS, Pack SD, Roschke AV, Tanigami A, Carrozzo R, Smith ACM, Dobyns WB, Ledbetter DH. 1997. A Revision of the Lissencephaly and Miller-Dieker Syndrome Critical Regions in Chromosome 17p13.3. *Human Molecular Genetics*. 6(2):147-155.

Clark GD, Happel LT, Zorumski CF, Bazan NG. 1992. Enhancement of hippocampal excitatory synaptic transmission by platelet-activating factor. *Neuron*. 9:1211-1216.

Connors BW. 1984. Initiation of synchronized neuronal bursting in neocortex. *Nature*. 310:685-687.

Connors BW. and Amitai Y. 1995. Functions of local circuits in neocortex: synchrony and laminae. *The Cortical Neuron*, 1st edn. Gutnick, M. and Mody, I. Oxford University Press. Book Chapter. 9:123-139.

Cornew L, Roberts TPL, Blaskey L, Edgar JC. 2011. Resting-State Oscillatory Activity in Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 42:1884-1894.

Cotter D, Landau S, Beasley C, Stevenson R, Chana G, MacMillan L, Everall I. 2002. The density and spatial distribution of gabaergic neurons, labelled using calcium binding proteins, in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biological Psychiatry*. 51:377-386.

Cui LB, Liu J, Wang LX, Li C, Xi YB, Guo F, Wang HN, Zhang LC, Liu WM, He H, Tian P, Yin H, Lu H. 2015. Anterior cingulate cortex-related connectivity in first-episode schizophrenia: a spectral dynamic causal modeling study with functional magnetic resonance imaging. 2015. *Frontiers in Human Neuroscience*. 9 (589):1-10.

Davis NJ, Tomlinson SP, Morgan HM. 2012. The Role of Beta-Frequency Neural Oscillations in Motor Control. *Journal of Neuroscience*. 32(2):403-404.

DeFelipe J, Fariñas I. 1992. The Pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology*. 39:563-607.

De La Peña E, Geijo E. 1996. Laminar localization, morphology, and physiological properties of pyramidal neurons that have the low-threshold calcium current in the guinea-pig medial frontal. *Journal of Neuroscience*. 16(17):5301-5311.

del Pino I, García-Frigola C, Dehorter N, Brotons-Mas JR, Alvarez-Salvado E, de Lagrán MM, Ciceri G, Gabaldón MV, Moratal D, Dierssen M, Canals S, Marín O, Rico B. 2013.

ErbB4 Deletion from *Fast-Spiking* Interneurons Causes Schizophrenia-like Phenotypes. *Neuron*. 79:1152-1168.

Dobyns WB, Gilbert EF, Opitz JM, Reynolds JF. 1985. Further comments on the lissencephaly syndromes. *American Journal of Medical Genetics*. 22:197-211.

Dobyns WB. 1993. Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 270(23):2838-2842.

Dobyns WB, Berry-Kravis E, Havernick NJ, Holden KR, Viskochil D. 1999. X-linked lissencephaly with absent corpus callosum and ambiguous genitalia. *American Journal of Medical Genetics*. 86:331-337.

Dominguez E, Valdés-Sánchez L, Reiner O, Canals S, Geijo-Barrientos E, Martínez S. 2017. LIS1 neuronal heterotopia impairs the inhibitory system of the neocortex, producing a non-drastic functional phenotype. *Cerebral Cortex*. Under revision.

Douglas RJ, Martin KAC, Whitteridge D. 1989. A Canonical Microcircuit for Neocortex. *Neural Computation*. 1:480-488.

Douglas RJ, Martin KAC. 2010. Canonical Cortical Circuits. *The Handbook of the Brain Microcircuits*. Oxford University Press. Book Chapter. 2:15-21.

Escámez T, Bahamonde O, Tabarés-Seisdedos R, Vieta E, Martinez S, Echevarria D. 2012. Developmental dynamics of PAFAH1B subunits during mouse brain development. *Journal of Comparative Neurology*. 520:3877-3894.

Felleman DJ, Van Essen DC. 1991. Distributed Hierarchical Processing in the Primate Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex*. 1(1):1-47.

Fenton GW, Fenwick PBC, Dollimore JL, Dunn TL, Hirsch SR. 1977. EEG spectral analysis in schizophrenia. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 43(4):418.

Gambello MJ, Darling DL, Yingling J. 2003. Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. *Journal of Neuroscience*. 23(5):1719-1729.

Garcia-Lopez R, Pombero A, Dominguez E, Geijo-Barrientos E, Martinez S. 2015. Developmental alterations of the septohippocampal cholinergic projection in a lissencephalic mouse model. *Experimental Neurology*. 271:215-227.

Gelman DM, Marín O. 2010. Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *European Journal of Neuroscience*. 31: 2136-2141.

Goldman-Rakic PS, Selemon LD. 1997. Functional and Anatomical Aspects of Prefrontal Pathology in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 23(3):437-458.

Golomb D, Amitai Y. 1997. Propagating neuronal discharges in neocortical slices: computational and experimental study. *Journal of Neurophysiology*. 78: 1199-1211.

Gopal PP, Simonet JS, Shapiro W, Jeffrey AG. 2009. Leading Process Branch Instability in Lis1^{+/-} Nonradially Migrating Interneurons. *Cerebral Cortex*. 20:1497-1505.

Greenwood JSF, Wang Y, Estrada RC, Ackerman L, Ohara PT, Baraban SC. 2009. Seizures, Enhanced Excitation, and Increased Vesicle Number in *Lis1* Mutant Mice. *Annals of Neurology*. 66:644-653.

Guerrini R, Parrini E. 2010. Neuronal migration disorders. *Neurobiology of Disease*. 38:154-166

Guidotti A, Auta J, Davis JM. 2000. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (*GAD67*) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Archives of general Psychiatry*. 57:1497-1505.

Gutnick MJ, Connors BW, Prince DA. 1982. Mechanisms of neocortical epileptogenesis in vitro. *Journal of Neurophysiology*. 48(8):1321-1335.

Hendry SHC, Jones EG. 1991. GABA neuronal subpopulations in cat primary auditory cortex: co-localization with calcium binding proteins. *Brain Research*. 543:45-55.

Herculano-Houzel S, Collins CE, Wong P, Kaas JH, Lent R. 2008. The basic nonuniformity of the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(34): 12593-12598.

Hirotsune S, Pack SD, Chong SS, Robbins CM, Pavan WJ, Ledbetter DH, Wynshaw-Boris A. 1997. Genomic Organization of the Murine Miller–Dieker/Lissencephaly Region: Conservation of Linkage with the Human Region. *Genome Research*. 7:625-634.

Hirotsune S, Fleck MW, Gambello MJ, Bix GJ, Chen A. 1998. Graded reduction of *Pafah1b1* (*Lis1*) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nature Genetics*. 19:333-339.

Horton JC, Adams DL. 2005. The cortical column: a structure without a function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 360:837-862.

Hubel DH, Wiesel TN. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of Physiology*. 160:106-154.

Hunt RF, Dinday MT, Hindle-Katel W, Baraban SC. 2012. LIS1 Deficiency Promotes Dysfunctional Synaptic Integration of Granule Cells Generated in the Developing and Adult Dentate Gyrus. *Journal of Neuroscience*. 32(37):12862-12875.

Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN, Pappas GD, Tueting P, Sharma RP, Costa E. 1998. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95:15718-15723.

Jones DL, Baraban SC. 2007. Characterization of Inhibitory Circuits in the Malformed Hippocampus of Lis1 Mutant Mice. *Journal of Neurophysiology*. 98: 2737-2746.

Jones DL, Baraban SC. 2009. Inhibitory Inputs to Hippocampal Interneurons Are Reorganized in Lis1 Mutant Mice. *Journal of Neurophysiology*. 102: 648-658.

Kalus P, Senitz D, Beckmann H. 1997. Altered distribution of parvalbumin-immunoreactive local circuit neurons in the anterior cingulate cortex of schizophrenic patients. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 75:49-59.

Kam JW, Bolbecker AR, O'Donnell BF, Hetrick WP, Brenner CA. 2013. Resting state EEG power and coherence abnormalities in bipolar disorder and schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*. 47(12):1893-1901.

Kapitein LC, Hoogenraad CC. 2015. Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron*. 87:492-506.

Kawabata I, Kashiwagi Y, Obashi K, Ohkura M, Nakai J, Wynshaw-Boris A, Yanagawa Y, Okabe S. 2012. LIS1-dependent retrograde translocation of excitatory synapses in developing interneuron dendrites. *Nature Communications*. 3:722.

Kirkcaldie. 2012. Neocortex. *The Mouse Nervous System*, 1st edn. Paxinos, G., ed. Elsevier Academic Press. 4:52-111.

Kumar SS, Huguenard JR. 2001. Properties of excitatory synaptic connections mediated by the corpus callosum in the developing rat neocortex. *Journal of Neurophysiology*. 86:2973-2985.

Kurotani T, Miyashita T, Wintzer M, Konishi T, Sakai K, Ichinohe N, Rockland KS. 2012. Pyramidal neurons in the superficial layers of rat retrosplenial cortex exhibit a late-spiking firing property. *Brain Structure and Function*. 218:239-254.

Li T, Tian C, Scalmani P, Frassoni C, Mantegazza M, Wang Y, Yang M, Wu S, Shu Y. 2014. Action Potential Initiation in Neocortical Inhibitory Interneurons. *Plos Biology*. 12(9): e1001944.

Lorente de Nó R. La Corteza Cerebral: arquitectura, conexiones intracorticales, y proyecciones motoras. 1941. Fisiología del Sistema Nervioso. Fulton, J. Editorial Atlante, Mexico DF. Capítulo de libro.15:283-326.

Lund JS. 2003. Anatomical Substrates for Functional Columns in Macaque Monkey Primary Visual Cortex. *Cerebral Cortex*. 12:15-24.

Malkin SL, Kim KK, Tikhonov DB, Zaitsev AV. 2014. Properties of spontaneous and miniature excitatory postsynaptic currents in neurons of the rat prefrontal cortex. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 50(6):506-514.

Malkin SL, Kim KK, Tikhonov DB, Magazanik LG, Zaitsev AV. 2015. Statistical models suggest presence of two distinct subpopulations of miniature EPSCs in *Fast-spiking* interneurons of rat prefrontal cortex. *Neuroscience*. 301:508-519.

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience*. 5:793-807.

Martinez, S., Puellas, E., Puellas, L., Echevarria, D. 2012. Molecular regionalization of the developing neural tube. *The Mouse Nervous System*. Watson, C. Elsevier Academic Press. Book Chapter. 1:2-18.

Marín, O. 2012. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 13(2):107-120.

Marín O, Müller U. 2014. Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in the neocortex. *Current Opinion in Neurobiology*. 26:132-141.

Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA, Mewborn SK, Dudlicek LL, Ramocki MB, Pilz DT, Mills PL, Das S, Ross ME, Ledbetter DH, Dobyns WB. 2001. Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *European Journal of Human Genetics*. 9, 5-12.

McCarroll SA, Altshuler DM. 2007. Copy-number variation and association studies of human disease. *Nature Genetics*. 39:37-42.

McCormick DA, Connors BW. 1985. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *Journal of Neuroscience*. 5(4):782-806.

McManus MF, Nasrallah IM, Pancoast MM, Wynshaw-Boris A, Golden JA. 2004. Lis1 Is Necessary for Normal Non-Radial Migration of Inhibitory Interneurons. *The American Journal of Pathology*. 165(3):775-783.

Medina L, Legaz I, González G, De Castro F, Puelles L. 2004. Expression of Dbx1, Neurogenin 2, Semaphorin 5A, Cadherin 8, and Emx1 distinguish ventral and lateral pallial histogenetic divisions in the developing mouse claustramygdaloid complex. *Journal of Comparative Neurology*. 474:504-523.

Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CAM, Devon RS, Clair DMS, Muir WJ, Blackwood DHR, Porteous DJ. 2000. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Human Molecular Genetics*. 9(9):1415-1423.

Miyashita-Lin EM, Hevner R, Wassarman KM, Martinez S, Rubenstein JLR. 1999. Early Neocortical Regionalization in the Absence of Thalamic Innervation. *Science*. 285:906-909.

Moran LV, Hong LE. 2011. High vs Low Frequency Neural Oscillations in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 37(4):659-663.

Mountcastle VB. 1957. Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *Journal of Neurophysiology*. 20:408-434.1

Mountcastle VB. 1997. The columnar organization of the neocortex. *Brain*. 1978:7-50.

Nadarajah B, Parnavelas JG. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*. 3:423-432.

Nigro Lo C, Chong SS, Smith ACM, Dobyns WB, Carrozzo R, Ledbetter DH. 1997. Point Mutations and an Intragenic Deletion in LIS1, the Lissencephaly Causative Gene in Isolated Lissencephaly Sequence and Miller-Dieker Syndrome. *Human Molecular Genetics*. 6(2): 157-164.

NothwanG HG, Kim HG, Aoki J, Geisterfer M, Kübart S, Wegner RD, van Moers A, Ashworth LK, Haaf T, Bell J, Arai H, Tommerup N, Ropers HH, Wirth J. 2001. Functional hemizyosity of PFAH1B3 due to a PFAH1B3-CLK2 fusion gene in a female with mental retardation, ataxia and atrophy of the brain. *Human Molecular Genetics*. 10(8):797-806.

Palomero-Gallagher, N. and Zilles, K. 2004. Isocortex. In *The Rat Nervous System*, 3rd edn. Paxinos, G., ed. Elsevier Academic Press. Book Chapter. 22:601-625.

Paylor R, Hirotsune S, Michael JG, Yuva-Paylor L, Crawley JN, Wynshaw-Boris A. 1999. Impaired Learning and Motor Behavior in Heterozygous Pafah1b1 (Lis1) Mutant Mice. *Learning & Memory*. 6:521-537.

Paxinos, G., Franklin, KBJ. 2001. *The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates*. 2nd edn. Academic Press.

Petilla Interneuron Nomenclature Group. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*. 9:557-568.

Pinto DJ, Patrick SL, Huang WC, Connors BW. 2005. Initiation, Propagation, and Termination of Epileptiform Activity in Rodent Neocortex In Vitro Involve Distinct Mechanisms. *Journal of Neuroscience*. 25(36):8131-8140.

Puelles L, Kuwana E, Puelles E. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *Journal of Comparative Neurology*. 424:409-438.

Puelles L. 2001. Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 356:1583-1598.

Puelles L, Harrison M, Paxinos G, Watson C. 2013. A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends in Neurosciences*. 36(10):570-578.

Rakic P. 2008. Confusing cortical columns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(34):12099-12100.

Rakic P. 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nature Reviews Neuroscience*. 10:724-735.

Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH. 1993. Isolation of a Miller–Dicker lissencephaly gene containing G protein β -subunit-like repeats. *Nature*. 364:717-721.

Reiner O, Albrecht U, Gordon M. 1995. Lissencephaly gene (LIS1) expression in the CNS suggests a role in neuronal migration. *Journal of Neuroscience*. 15(5):3730-3738.

Reiner O, Cahana A, Escamez T, Martinez S. 2002. LIS1-no more no less. *Molecular Psychiatry*. 7:12-16.

Reiner O, Sapoznik S, Sapir T. 2006. Lissencephaly 1 Linking to Multiple Diseases. *Neuromolecular Medicine*. 8:547-565.

Reiner O, Sapir T. 2013. LIS1 functions in normal development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*. 23:951-956.

Roberts AJ, Kon T, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA. 2013. Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 14(11): 713-726.

Rockel AJ, Hiorns RW, Powell TP. 1980. The basic uniformity in structure of the neocortex. *Brain: a journal of neurology*. 103:221-244.

Rovira, V., Geijo-Barrientos, E. 2016. Intra- and Interhemispheric Propagation of Electrophysiological Synchronous Activity and Its Modulation by Serotonin in the Cingulate Cortex of Juvenile Mice. Plos One. 11(3): e0150092.

Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. 2010. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. Developmental Neurobiology. 71: 45-61.

Sauer JF, Strüber M, Bartos M. 2015. Impaired *Fast-spiking* interneuron function in a genetic mouse model of depression. Elife. 4:e04979.

Söderfeldt B, Kalimo H, Olsson Y, Siesj BK. 1983. Bicuculline-induced epileptic brain injury. Acta Neuropathologica. 62: 87-95.

Stolp HB, Turnquist C, Dziegielewska KM, Saunders NR, Anthony DC, Molnar Z. 2011. Reduced ventricular proliferation in the foetal cortex following maternal inflammation in the mouse. Brain. 134:3236-3248.

Sudarov A, Gooden F, Tseng D, Gan W-B, Ross ME. 2013. Lis1 controls dynamics of neuronal filopodia and spines to impact synaptogenesis and social behaviour. EMBO Molecular Medicine. 5:591–607.

Tabarés-Seisdedos R, Escamez T, Martínez-Giménez JA, Balanzá V, Salazar J, Selva G, Rubio C, Vieta E, Geijó-Barrientos E, Martínez-Arán A, Reiner O, Martínez S. 2006. Variations in genes regulating neuronal migration predict reduced prefrontal cognition in schizophrenia and bipolar subjects from mediterranean Spain: A preliminary study. Neuroscience. 139:1289-1300.

Tabarés-Seisdedos R, Mata I, Escámez T, Vieta E, López-Ilundain JM, Salazar J, Selva G, Balanza V, Rubio C, Martínez-Arán A, Valdés-Sánchez L, Geijo-Barrientos E, Martínez S. 2008. Evidence for association between structural variants in lissencephaly-related genes and executive deficits in schizophrenia or bipolar patients from a Spanish isolate population. *Psychiatric Genetics*. 18(6):313-317.

Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J-I, Obata K, Kaneko T. 2003. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *The Journal of Comparative Neurology*. 467:60-79.

Troca-Marín JA, Geijo-Barrientos E. 2010. Inhibition by 5-HT of the synaptic responses evoked by callosal fibers on cortical neurons in the mouse. *Pflügers Archive - European Journal of Physiology*. 460:1073-1085.

Valdés-Sánchez L, Escámez T, Echevarria D, Ballesta JJ, Tabarés-Seisdedos R, Reiner O, Martínez S, Geijo-Barrientos E. 2007. Postnatal alterations of the inhibitory synaptic responses recorded from cortical pyramidal neurons in the *Lis1/sLis1* mutant mouse. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 35:220-229.

Valverde F. 2002. Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Revista de Neurología*. 34 (8): 758-780.

Vogt BA, Paxinos G. 2012. Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies. *Brain Structure and Function*. 54:719-728.

Walker J, Storch G, Quach-Wong B, Sonnenfeld J, Aaron G. 2012. Propagation of Epileptiform Events across the Corpus Callosum in a Cingulate Cortical Slice Preparation. PLOS ONE. 7(2): e31415.

Walsh CA, Morrow EM, Rubenstein JLR. 2008. Autism and Brain Development. Cell. 135(3):396-400.

Wang XJ. 2010. Neurophysiological and Computational Principles of Cortical Rhythms in Cognition. Physiological Reviews. 90:1195-1268.

Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Imaki H, Wegiel J, Marchi E, Ma SY, Chauhan A, Chauhan V, Bobrowicz TW, de Leon M, Saint Louis LA, Cohen IL, London E, Brown WT, Wisniewski T. 2010. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. Acta Neuropathologica. 119:755-770.

Weiler N, Wood L, Yu J, Solla SA, Shepherd GMG. 2008. Top-down laminar organization of the excitatory network in motor cortex. Nature Neuroscience. 11(3):360-366.

Wise SP, Jones EG. 1978. Developmental studies of thalamocortical and commissural connections in the rat somatic sensory cortex. The Journal of Comparative Neurology. 178:187-220.

Witter, M.P. and Amaral, D.G. 2004. Hippocampal formation. The Rat Nervous System, 3rd edn. Paxinos, G. Elsevier Academic Press. Book Chapter. 20:511-573.

Woo T, Shrestha K, Amstrong C, Minns M, Walsh J, Benes F. 2007. Differential alterations of kainate receptor subunits in inhibitory interneurons in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophrenia Research*. 96(1-3): 46–61.

Woo TUW, Shrestha K, Lamb D, Minns MM, Benes FM. 2008. N-Methyl-D-Aspartate-Receptor and Calbindin-Containing Neurons in the Anterior Cingulate Cortex in Schizophrenia and Bipolar Disorder. 64(9):1-15.

Wynshaw-Boris A. 2001. LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes & Development*. 15: 639-651.

Yates D. 2011. Psychiatric disorders: Multiple pathways to DISC1-related disease?. *Nature Reviews Neuroscience*. 13:RH.

Yorke CH, Caviness VS. 1975. Interhemispheric neocortical connections of the corpus callosum in the normal mouse: A study based on anterograde and retrograde methods. *The Journal of Comparative Neurology*. 164:233-246.

Zikopoulos B, Barbas H. 2013. Altered neural connectivity in excitatory and inhibitory cortical circuits in autism. *Frontiers in Human Neuroscience*. 7(609):1-24.