

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

UNIVERSITAS
Miguel Hernández

EFFECTOS DE LA AUSENCIA DEL GEN *LIS1* EN INTERNEURONAS PARVALBÚMINA EN EL HIPOTÁLAMO DE RATÓN

TRABAJO DE FIN DE GRADO

CURSO ACADÉMICO 2023-2024

Departamento de Histología y Anatomía

Área de Anatomía y Embriología Humana

Instituto de Neurociencias de Alicante – CSIC-UMH – Campus San Juan



Autora: Irene Valverde Hernández

Tutores: Pilar Madrigal Verdú

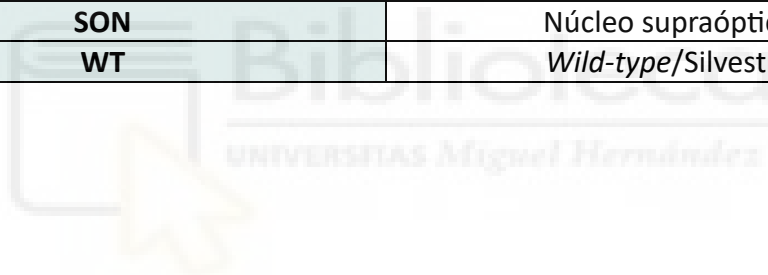
Co-Tutor: Nicanor Morales Delgado

ÍNDICE

1.	RESUMEN	4
2.	ABSTRACT	5
3.	INTRODUCCIÓN	6
3.1.	SISTEMA NERVIOSO (SN)	6
3.1.1.	CORTEZA CEREBRAL E INTONEURONAS PARVALBÚMINA (PV)	7
3.2.	HIPOTÁLAMO (HYPT)	8
3.2.1.	OXITOCINA (OXT)	9
3.2.2.	ARGININA VASOPRESINA (AVP)	10
3.3.	GEN <i>LIS1</i> Y LIENCEFALIA	10
4.	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1.	MODELO ANIMAL	12
5.2.	GENOTIPADO MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	13
5.3.	OBTENCIÓN DE CORTES HISTOQUÍMICOS: CRIOTOMO	14
5.4.	INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	14
5.5.	TRANSPARENTADO DE MUESTRAS: TÉCNICA iDISCO (SOLVENT-CLEARED ORGAN PROTOCOL)	15
5.6.	ADQUISICIÓN DE IMÁGENES: MICROSCOPIA CONFOCAL Y ULTRAMICROSCOPIO	16
5.7.	CUANTIFICACIÓN CELULAR: IMARIS E IMAGEJ	17
5.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
6.	RESULTADOS	18
6.1.	AUMENTO DE LA ACTIVIDAD NEURONAL EN EL HYPT EN RATONES CARENTES DE <i>LIS1</i> EN PV+ A P21.	18
6.2.	LAS POBLACIONES OXITOCINÉRGICAS Y VASOPRESINÉRGICAS NO MUESTRAN VARIACIONES EN EL PVN ENTRE LOS RATONES MUTANTES Y LOS CONTROLES	20
6.3.	NEURONAS OXITOCINÉRGICAS ESTÁN MÁS ACTIVAS (CFOS+) EN EL PVN DE LOS RATONES <i>LIS1</i> ^{FLOX} / <i>PV</i> ^{CRE}	22
6.4.	NEURONAS VASOPRESINÉRGICAS ESTÁN MÁS ACTIVAS (CFOS+) EN EL PVN DE LOS RATONES <i>LIS1</i> ^{FLOX} / <i>PV</i> ^{CRE}	23
7.	DISCUSIÓN	24
8.	CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	27
9.	BIBLIOGRAFÍA	28

ABREVIATURAS

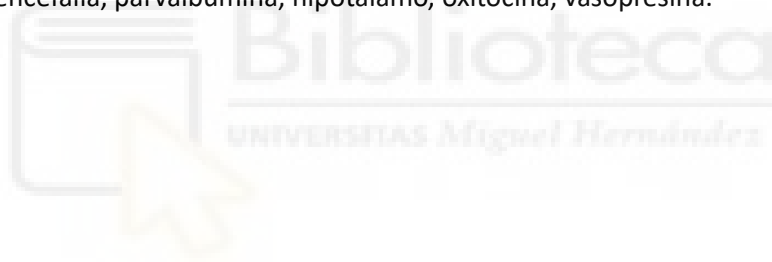
SIGLAS	SIGNIFICADO
ACC	Corteza cingular anterior
AVP	Vasopresina
E/I	Excitación/inhibición
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
HYPT	Hipotálamo
IHC	Inmunohistoquímica
MUT	Mutante
OXT	Oxitocina
PV	Parvalbúmina
PVN	Núcleo paraventricular
RSC	Corteza retrosplenial
SCH	Núcleo supraquiasmático
SEM	Error estándar a la media
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SON	Núcleo supraóptico
WT	<i>Wild-type</i> /Silvestre



1. RESUMEN

La lisencefalia tipo 1 es un trastorno del desarrollo cerebral provocado principalmente por mutaciones en el gen *Lis1*. Se caracteriza por una migración neuronal defectuosa, que conlleva a la alteración de la organización cortical y a la ausencia o disminución de las circunvoluciones cerebrales y surcos. Esta anomalía ha sido relacionada con epilepsia, microcefalia, hidrocefalia, retraso en el desarrollo mental y/o parálisis cerebral. Sin embargo, estudios centrados en el hipotálamo relacionados con *Lis1* son reducidos. Por lo tanto, este trabajo se ha centrado en el estudio de los posibles efectos en el hipotálamo provocados por la ausencia del gen *Lis1* en interneuronas parvalbumina. En concreto, se emplearon técnicas de inmunohistoquímica para analizar de los neuropéptidos más relevantes estudiados en el comportamiento social como la oxitocina y vasopresina en el núcleo paraventricular y en el núcleo supraóptico. Este trabajo aborda la importancia de estudiar la lisencefalia tipo 1 en el control de la actividad neuronal en el hipotálamo, así como el análisis de ciertos neuropéptidos, con el fin de comprender otro tipo de alteraciones neuronales.

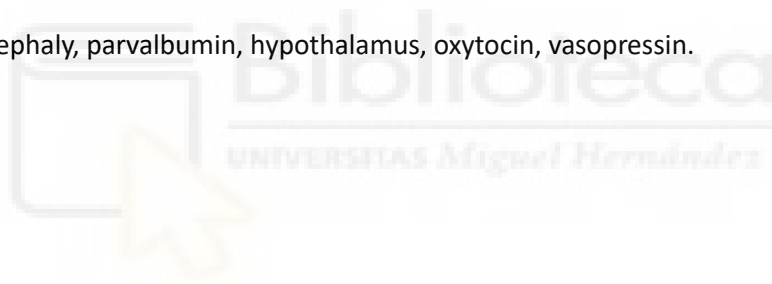
Palabras clave: lisencefalia, parvalbúmina, hipotálamo, oxitocina, vasopresina.



2. ABSTRACT

Lissencephaly type 1 is a brain development disorder mainly caused by mutations in the *Lis1* gene. It is characterized by defective neuronal migration, leading to altered cortical organization and the absence or reduction of brain gyri and sulci. This anomaly has been associated with epilepsy, microcephaly, hydrocephalus, mental development delay, and/or cerebral palsy. However, studies focused on the hypothalamus related to *Lis1* are limited. Therefore, this work has focused on studying the possible effects on the hypothalamus caused by the absence of the *Lis1* gene in parvalbumin interneurons. Specifically, immunohistochemistry techniques were used to analyse the most relevant neuropeptides studied in social behaviour, such as oxytocin and vasopressin, in the paraventricular nucleus and the supraoptic nucleus. This work addresses the importance of studying lissencephaly type 1 in the control of neuronal activity in the hypothalamus, as well as the analysis of certain neuropeptides, to understand other types of neuronal alterations.

Keywords: lissencephaly, parvalbumin, hypothalamus, oxytocin, vasopressin.



3. INTRODUCCIÓN

3.1. SISTEMA NERVIOSO (SN)

El sistema nervioso (SN) es uno de los sistemas más complejos de un organismo, tiene la capacidad de transmitir señales de un lugar a otro del cuerpo con excesiva rapidez, y permite recibir estímulos tanto internos como externos (Silverthorn, 1997). Estos estímulos son analizados y procesados para generar respuestas, asegurando una coordinación precisa entre todos los órganos, sistemas y aparatos del organismo.

El SN en vertebrados se puede dividir en dos sistemas: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). La primera subdivisión consiste en la médula espinal y el encéfalo, que se encarga de procesar la información sensorial, sincronizar las respuestas motoras y regular diversas funciones corporales involuntarias, como por ejemplo la respiración y la digestión. Por otro lado, el SNP está formado por las neuronas aferentes (o sensitivas) y por las neuronas eferentes (o ectoras). Su papel consiste en llevar la información sensorial desde los órganos sensoriales hacia el SNC, así como en transportar las señales motoras desde el SNC hacia los músculos y glándulas periféricas (Silverthorn, 1997).

El tejido nervioso se compone de las neuronas y de las células gliales que brindan soporte y alimentación. La neurona, la unidad básica del SN, consta de tres partes principales: un cuerpo celular o soma, dendritas que reciben señales, y axones que transmiten estas señales a otras células (**Figura 1**). Estas células especializadas son las responsables de recibir, procesar y transmitir información, gracias a que generan impulsos nerviosos. Su transmisión se realiza a través de estructuras llamadas sinapsis, donde los neurotransmisores almacenados en vesículas se liberan y permite la comunicación de una neurona a otra (Silverthorn, 1997). Este último proceso conocido como sinapsis química es el más común. Sin embargo, también existe la sinapsis eléctrica, donde las neuronas están directamente conectadas eléctricamente a través de proteínas específicas en sus membranas.

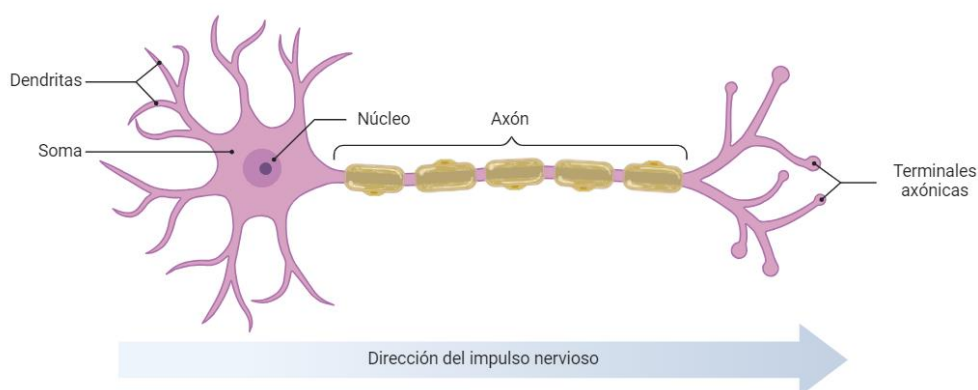


Figura 1. Anatomía de una neurona. Se muestran las partes de una neurona del SN. Figura adaptada de Biorender.

3.1.1. CORTEZA CEREBRAL E INTERNEURONAS PARVALBÚMINA (PV)

La corteza (córtex) cerebral (del griego palio, «manto») es una delgada lámina de materia gris que cubre ambos hemisferios cerebrales. Tiene un grosor que varía de 2 a 4 mm; siendo más delgada en la corteza visual primaria y más gruesa en el área motora primaria. Su diseño potencia la entrada desde el tálamo e integra información con las proyecciones de otras áreas para llevar a cabo funciones complejas como el procesamiento sensorial, el aprendizaje y la memoria (Freitas et al., 2011; LeMessurier & Feldman, 2018).

La corteza cerebral posee una organización laminar y otra yuxtapuesta e interconectada, columnar. Los dos tipos básicos de células son las piramidales y las no piramidales (interneuronas). En concreto, las piramidales son aquellas que liberan neurotransmisores excitatorios (glutamato), y aquellas que liberan neurotransmisores inhibitorios (ácido gamma-aminobutírico (GABA) y/o glicina), incluyen a las interneuronas (Gradwell et al., 2021). Estas últimas residen exclusivamente dentro del SNC y su nombre proviene de la abreviación de neuronas de interconexión. A menudo, presentan una estructura con ramificaciones complejas que les permite establecer comunicación con múltiples neuronas. Aunque varían en forma, algunas de estas interneuronas son considerablemente más pequeñas que una neurona típica (Silverthorn, 1997).

Existen diferentes clases de interneuronas según las diversas características morfológicas, sinápticas y conectivas, tales como las que contienen parvalbúmina (PV+), somatostatina (SST) y serotonina (5HT), entre otras (Gradwell et al., 2021). Las neuronas PV constituyen la mayor clase de neuronas inhibitorias GABAérgicas en el SNC. En la corteza cerebral, ejercen una inhibición sináptica tanto hacia sobre una variedad de tipos celulares, incluyendo las células piramidales, otras interneuronas inhibitorias, e incluso sobre sí mismas. Gracias a la liberación de GABA, permite la apertura de los canales iónicos en neuronas postsinápticas, causando una hiperpolarización y, por lo tanto, son capaces de inhibir a otras. Además, son esenciales tanto en el desarrollo como en la edad adulta para la plasticidad neuronal, y también, están implicadas en la salida cortical y la regulación de la migración neuronal (Rupert et al., 2022).

No obstante, existen muchas más neuronas excitatorias que neuronas inhibitorias en la corteza cerebral, estas últimas representan solo alrededor del 10-20 % del total. A pesar de esta diferencia en densidad, la actividad inhibitoria cortical tiende a equilibrar la actividad excitatoria, lo que sugiere que los cambios en la conectividad sináptica, la morfología y la actividad de las neuronas inhibitorias desempeñan un papel crucial en la regulación del tiempo y la especificidad de las respuestas corticales (DeFelipe et al., 2013).

3.2. HIPOTÁLAMO (HYPT)

El hipotálamo (HYPT), situado en la región ventral del cerebro anterior, es el área del cerebro que mantiene la homeostasis y regula el equilibrio de fluidos, el estrés, el crecimiento, el comportamiento reproductivo, la emoción y los ritmos circadianos. Está compuesto por células neurosecretoras, generando neurohormonas, que se transportan a través de las neuronas hasta la neurohipófisis, donde controlan la liberación de diversas hormonas neurohipofisarias. Por lo tanto, las hormonas generadas en el hipotálamo son secretadas al torrente sanguíneo, lo que se conoce con el nombre de eje hipotálamo-hipofisario, crucial en la regulación hormonal (Silverthorn, 1997). A su vez, el hipotálamo se compone por varios núcleos esenciales pequeños, incluyendo el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y el núcleo supraóptico (SON), entre otros (Qin et al., 2018; **Figura 2**).

El PVN localizado en el hipotálamo ventral adyacente al tercer ventrículo, desempeña un papel vital en la regulación de la alimentación, el metabolismo, la actividad autonómica y las funciones neuroendocrinas. Está compuesto por neuronas magnocelulares, parvocelulares y de largo alcance. (Qin et al., 2018). Además, otras neuronas dentro del PVN tienen la función de regular el sistema nervioso autónomo (SNA) y diversas funciones fisiológicas mediante conexiones que descienden hacia la médula espinal y la médula (Dos Santos et al., 2019).

El SON es una región crucial del sistema hipotalámico-neurohipofisario, específicamente, se encuentra en la parte anterior y ventral del hipotálamo, cerca del tercer ventrículo cerebral. Su función es regular la homeostasis corporal, el equilibrio hídrico, la función hormonal y la respuesta al estrés. Se compone de células neuroendocrinas magnocelulares y astrocitos, que juegan un papel crucial en la plasticidad cerebral (Liu et al., 2023).

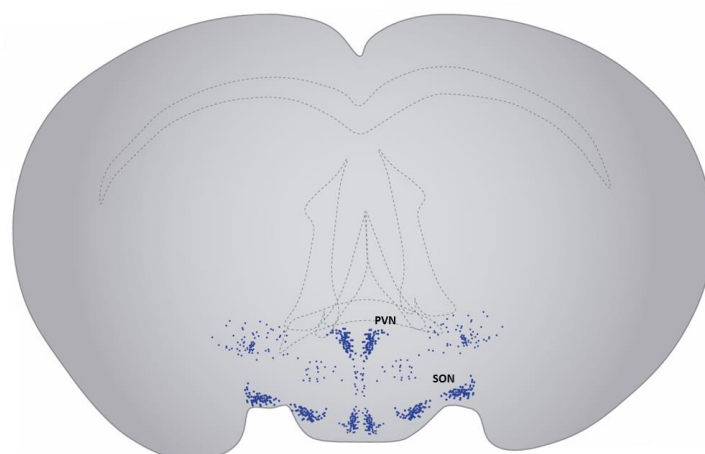


Figura 2. Representación de un corte coronal del cerebro de ratón adulto. Se muestra la expresión de OXT y AVP en los núcleos comentados: el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo supraóptico (SON).

3.2.1. OXITOCINA (OXT)

La oxitocina (OXT) fue la primera hormona peptídica cuya estructura se determinó y la primera en ser sintetizada químicamente en una forma biológicamente activa (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Está asociada con el comportamiento parental, como el parto y la lactancia. La OXT se produce en neuronas localizadas en el PVN y el SON del hipotálamo, y es liberada a la circulación sistémica por la hipófisis posterior. Su acción es dirigida hacia diversas estructuras neuronales, incluida la corteza cerebral (Liu et al., 2023).

El gen OXT codifica una pre-pro-hormona, la pre-pro-OXT-neurofisisina I, la cual es procesada por diversas enzimas que producen formas intermedias de la OXT y neurofisisina I. Por último, se genera la OXT madura que es una forma amidada. Además, la estabilidad del nivel de OXT madura puede ser influenciada por una enzima denominada oxitocinasa, la cual es generada tanto en el cuerpo como en el cerebro por las neuronas magnocelulares, aunque también está presente en otras regiones del cerebro. Posteriormente, se empaqueta en vesículas neurosecretoras al igual que otros neuropéptidos (Grinevich et al., 2015). Es relevante mencionar, que, en roedores, la OXT varía en el SNC durante el desarrollo. Antes del nacimiento, no se encuentran formas maduras y amidadas de OXT. Por lo tanto, experimenta una maduración gradual durante las primeras etapas de vida después del nacimiento, y no alcanza su plena madurez hasta después del destete (Grinevich et al., 2015).

Las neuronas productoras de OXT pueden ser categorizadas según diversos criterios como su forma, tamaño, ubicación subnuclear, nivel de producción de OXT o su implicación en distintas funciones y circuitos. De esta manera, se distinguen las neuronas magnocelulares y parvocelulares. Las primeras envían proyecciones hacia la hipófisis posterior, donde liberan la OXT producida en la circulación sistémica, actuando como hormona. Por otro lado, las neuronas parvocelulares proyectan hacia varios núcleos cerebrales, áreas del tronco encefálico y diferentes regiones de la médula espinal. Se postula que la OXT liberada por las neuronas parvocelulares contribuye a regular funciones como la respiratoria, la cardiovascular, el comportamiento alimentario y la percepción del dolor (Grinevich et al., 2015).

Esta hormona evolutivamente antigua, además de estar relacionada con el parto y la lactancia, es importante en la señal molecular para el comportamiento maternal. En los mamíferos, la OXT también actúa en el cerebro para aumentar la relevancia de la información social y permitir el cuidado parental en ratones. Además, incluye aspectos como la formación de vínculos de pareja, la regulación de la agresión, la ansiedad y el miedo (Carcea et al., 2021).

3.1.1. ARGININA VASOPRESINA (AVP)

La arginina vasopresina (AVP) es un neuropéptido encargado de regular la osmolaridad plásmatica, la presión arterial, los ritmos circadianos y los comportamientos sociales. Se produce especialmente en las neuronas magnocelulares del PVN o del SON, donde estas proyectan hacia la hipófisis. Mientras las neuronas magnocelulares de AVP envían sus proyecciones principalmente hacia la parte posterior de la hipófisis, las neuronas parvocelulares de AVP las dirigen hacia otras áreas fuera del hipotálamo (Burbach et al., 2001; Otero-García et al., 2014).

La AVP y la OXT provienen de la duplicación de un gen ancestral, por lo que guardan una estrecha relación entre ellas. Ambos neuropéptidos se producen en núcleos específicos del hipotálamo. Al igual que la OXT, el gen AVP produce pre-pro-AVP, una proteína precursora que contiene el péptido señal, AVP, neurofisiina y un glicopéptido de llamado copeptina. Tras la eliminación del péptido señal, la proteína precursora se empaqueta en vesículas neurosecretoras en el aparato de Golgi. Por último, experimenta escisión post-traducciona por enzimas y se empaqueta en vesículas junto con ellas durante su transporte axonal hacia los terminales (Burbach et al., 2001; Davies et al., 2003).

Las neuronas que contienen AVP en el PVN desempeñan un papel crucial en la regulación de diversos comportamientos sociales, como el acercamiento social, el juego social, la cognición social y la monogamia. No obstante, la desregulación de estos neuropéptidos ha sido asociada con trastornos mentales como ansiedad, agresividad o esquizofrenia. Estas funciones se llevan a cabo mediante proyecciones directas en varias áreas cerebrales clave (Woodson & Bergan, 2023).

3.3. GEN *LIS1* Y LIENCEFALIA

Las propiedades funcionales del cerebro de un adulto son el resultado de un correcto desarrollo cortical que comienza desde el periodo prenatal hasta estadios postnatales. El gen *Lis1*, también conocido como *PAFAH1B1*, juega un papel importante en este proceso. En 1993, se clonó por primera vez y se determinó que, en humanos, se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17, mientras que en ratones está ubicado en el cromosoma 11 (Dobyns et al., 1993).

Este gen codifica la proteína Lis1, que posee 410 aminoácidos. Esta última tiene dos funciones importantes. Por un lado, regula los niveles del factor activador de plaquetas (PAF), eliminando su grupo acetilo. El PAF desempeña diversas funciones en el SNC, incluida la modulación de la transmisión sináptica excitatoria. Por otro lado, LIS1 desempeña un papel como regulador del motor citoplasmático de la dineína, la cual es fundamental para la migración neuronal pero también en procesos como el transporte axonal, la polaridad celular, la dinámica de los microtúbulos, la neurogénesis y para la supervivencia neuronal (Domínguez-Sala et al., 2022; Wynshaw-Boris, 2007).

Una mutación en el gen *Lis1* provoca una patología conocida como lisencefalia clásica o de tipo 1. Principalmente, los fallos relacionados con la dineína y el PAF se relacionan con una migración neuronal defectuosa en la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario. Las neuronas post-mitóticas son incapaces de alcanzar la placa cortical de la corteza cerebral, generando un grosor cortical anormal. Fenotípicamente se manifiesta por la ausencia (agiria) o reducción (paquigiria) de las circunvoluciones cerebrales, ventrículos grandes y capas corticales anormales. Esta modificación durante el desarrollo ocasiona síntomas severos que abarcan convulsiones, retraso intelectual, microcefalia, hidrocefalia y un aumento en la probabilidad de padecer trastornos psicóticos como la esquizofrenia (Dobyns et al., 1993).

4. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Actualmente, existen numerosos estudios relacionados con las interneuronas parvalbúmina positivas y su relevancia neuropatológica. Sin embargo, su rol con regiones subcorticales no está todavía bien descrito. Datos preliminares en el laboratorio de Salvador Martínez (Instituto de Neurociencias de Alicante UMH-CSIC), muestran una disminución de células PV+ en la corteza cerebral, en concreto, en la corteza cingular anterior (ACC) y en la corteza retrosplenial (RSC) en ratones carentes de la proteína *Lis1* en interneuronas PV (datos no publicados). Por lo tanto, este Trabajo de Fin de Grado se centrará en estudiar cómo la ausencia de interneuronas PV afecta al hipotálamo, estructura subcortical relevante para múltiples funciones esenciales como la homeostasis o conducta social, entre otras. Para ello, se desarrollarán los siguientes objetivos específicos.

Objetivos principales del trabajo son:

1. Análisis tridimensional de la actividad neuronal en el hipotálamo en ratones carentes de *Lis1* en interneuronas parvalbúmina positiva y controles a P21.
2. Análisis cuantitativo de marcadores de actividad neuronal en el principal núcleo hipotalámico, el núcleo paraventricular, en ratones mutantes y controles a P21.
3. Estudio del neuropéptido OXT en neuronas del PVN y su actividad neural en ratones mutantes y controles a P21.
4. Estudio del neuropéptido AVP en neuronas del PVN y su actividad neural en ratones mutantes y controles a P21.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MODELO ANIMAL

Los ratones utilizados fueron obtenidos de la empresa Jackson Laboratories y alojados en el animalario del Instituto de Neurociencias, que forma parte del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo con las normativas españolas y de la Unión Europea que regulan el cuidado de los animales en experimentación (Directiva del Consejo 86/609/EEC). Cabe destacar que su manipulación fue llevada a cabo por personal cualificado y acreditado con las funciones necesarias para ello.

Este estudio ha sido aprobado y sometido a revisión por parte de la Oficina de Investigación de la UMH (OIR), bajo el Código de Investigación Responsable (COIR): **TFG.GBI.NMD.IVH.231106**.

Para realizar este estudio se empleó un modelo de ratón dirigido específicamente a la pérdida de *Lis1* en las interneuronas con expresión de parvalbúmina (PV+), denominado Lis1cKO-PV+. En concreto, la línea transgénica de ratón empleada proviene del cruce entre dos cepas de ratones modificadas genéticamente con el sistema Cre-LoxP. En este estudio los ratones empleados fueron *Lis1^{flox/+}-PV^{Cre/+}* cruzados con *Lis1^{flox/flox}-PV^{+/+}* (**Figura 3**). Los individuos *Lis1^{flox/+}-PV^{Cre/+}* expresan la enzima recombinasa Cre bajo el control del promotor endógeno de PV, de esta forma, el gen *Lis1*, el cual está flanqueado por dos secuencias loxP (secuencias diana de Cre), es inactivado en las neuronas que expresan PV positiva. Además, esta cepa específica contiene el gen reportero *Tomato*, el cual genera una proteína fluorescente de color rojo (RFP, del inglés “Red protein fluorescent”). Sin embargo, en el caso del parental *Lis1^{flox/+}-PV^{Cre/+}*, aguas arriba del gen *Tomato* hay un codón de parada flanqueado por secuencias loxP (**Figura 3**). Los ratones usados de las camadas para los experimentos englobados en este trabajo presentarán los genotipos *Lis1^{flox/flox}-PV^{Cre/+}* (*Lis1^{Flox}/PV^{Cre}*; mutante).

Por lo tanto, los parentales seleccionados fueron:

- Ratón parental 1: *Lis1^{flox/flox}, PV^{+/+}, Tomato^{flox/flox}*
- Ratón parental 2: *Lis1^{flox/+}, PV^{Cre/+}, Tomato^{+/+}*

$Lis1^{flox/flox} - PV^{+/+} - Tomato^{flox/flox}$

$Lis1^{flox/+} - PV^{Cre/+} - Tomato^{+/+}$

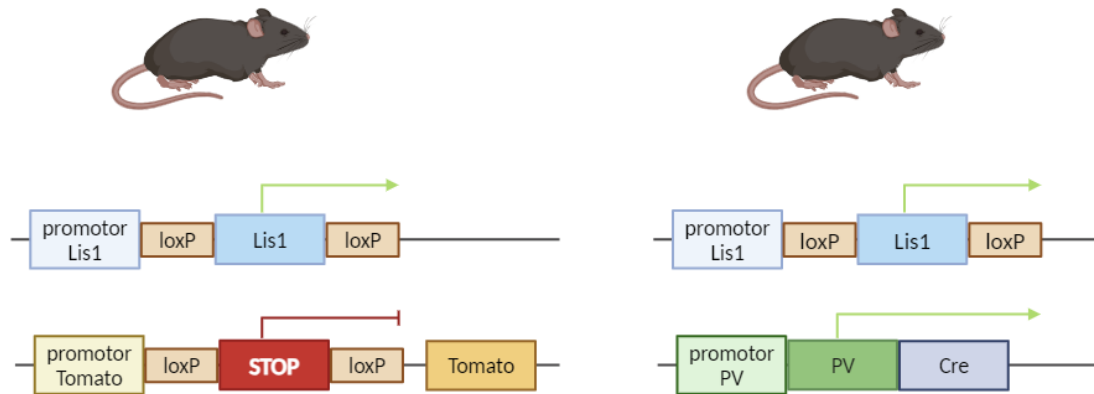


Figura 3. Representación esquemática de los genotipos parentales de la línea transgénica de ratón empleada.

Como resultado del cruce de los parentales, se obtuvieron diferentes líneas, diferenciándose ratones con fenotipo “wild-type” (de aquí en adelante WT), con ambos alelos originales para PV, y como resultado no se inactiva el gen *Lis1* ($Lis1^{flox/+} - PV^{+/+} - Tomato^{flox/+}$; $Lis1^{flox/flox} - PV^{+/+} - Tomato^{flox/+}$); ratones heterocigotos, que poseen la enzima Cre y, además, un alelo con secuencias loxP y otro original de *Lis1* ($Lis1^{flox/+} - PV^{Cre/+} - Tomato^{flox/+}$); y ratones mutantes, con ambos alelos inactivados, debido a que poseen secuencias loxP y la enzima Cre ($Lis1^{flox/flox} - PV^{Cre/+} - Tomato^{flox/+}$). En cuanto a los caracteres fenotípicos, los individuos mutantes y heterocigotos se diferenciaban del resto de líneas al presentar las interneuronas parvalbúmina de color rojo (detectable con microscopía), gracias a que poseen la recombinasa Cre, y, por lo tanto, existe recombinación.

Los animales fueron mantenidos en jaulas ventiladas en una instalación libre de patógenos, con acceso constante a comida y agua, y condiciones ambientales controladas, incluyendo temperatura (23 °C), humedad (40 – 60 %), y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

Para el sacrificio de los ratones, se utilizó el método de dislocación cervical realizado por personal acreditado. Posteriormente, los cerebros fueron diseccionados y fijados en paraformaldehído (PFA) al 4 % durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS 1X (una solución salina tamponada con fosfato 10X: 137 mM NaCl, 2,7 mM HCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,5) y almacenadas en PBS a 4 °C hasta el momento del experimento.

5.2. GENOTIPADO MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Para confirmar el genotipo de los ratones experimentales, se utilizó la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), permitiendo así conocer el genotipo de cada animal de forma específica. El primer paso fue la extracción del ADN, para ello, un extremo de la cola de cada individuo fue recogido, durante la perfusión. Se procesó con sosa 50 mM durante 25 minutos a 95 °C.

Posteriormente, para la PCR la cual amplifica fragmentos de ADN, se añadió 1 μ L de ADN aislado, 1 μ L de los cebadores (**Tabla 1**) y 13 μ L de *Kappa mix* (una mezcla comercial de H₂O, polimerasa, dNTP y cofactores). Finalmente, se incluyeron las muestras en el termociclador.

Después de completar la PCR, se llevó a cabo una electroforesis para analizar los resultados. Las muestras se colocaron en un gel de agarosa al 2 % preparado con tampón TAE1X, al cual se le añadieron 15 μ L de agente intercalante Safeview. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100V durante 30 minutos, y luego se observó el resultado bajo una lámpara ultravioleta.

PV (WT)	Cebador "Forward" (FW): CAGAGCAGGCATGGTGACTA
	Cebador "Reverse" (RV): AGTACCAAGCAGGCAGGAGA
PV-Cre	Cebador "Forward" (FW): AAATGCTTCTGTCCGTTTGC
	Cebador "Reverse" (RV): ATGTTTAGCTGGCCCAAATG
Lis1-flox	Cebador "Forward" (FW): TGAATGCATCAGAACCATGC
	Cebador "Reverse" (RV): CCTCTACCACTAAAGCTTGTTTC

Tabla 1. Secuencias específicas de los cebadores empleados en el estudio.

5.3. OBTENCIÓN DE CORTES HISTOQUÍMICOS: CRIOTOMO

Los cortes de cerebro tanto de los animales silvestres como de los mutantes fueron obtenidos mediante criotomo. Se colocó la muestra en la posición de interés, en este caso coronal, en una plataforma cubierta con un medio de inclusión, llamado OCT (Optimum Cutting Temperature), que proporciona estabilidad y protección. Luego, esta plataforma se enfría a bajas temperaturas para congelar la muestra (-24 °C). Después de cada corte, la plataforma se eleva 40 μ m para lograr el grosor deseado. Los cortes resultantes se recogieron en 4 series y se suspendieron en PBS, lo que permite trabajar con ellos en flotación.

5.4. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Se utilizaron muestras compuestas por cortes seriados de tejido cerebral de animales silvestres y mutantes en un estadio posnatal de 21 días (P21). Inicialmente, se realizaron tres lavados de 7 minutos con una solución de PBS 1x – Tritón 0,1 %, en agitación. A continuación, las muestras se incubaron en una solución de bloqueo compuesta por 5 % de albúmina sérica bovina (BSA), 0,1 % de azida y 10 % de lisina 1M durante una hora a RT (temperatura ambiente, del inglés “Room Temperature”), con agitación constante. Posteriormente, los anticuerpos primarios (**Tabla 2**), diluidos previamente en una solución de bloqueo del laboratorio DAKO, se incubaron O/N (durante la noche, del inglés “over-night”) a 4 °C. Al día siguiente, se recuperaron y se hicieron tres lavados de las muestras con PBS 1x – Tritón 0,1 % y se incubaron los anticuerpos secundarios (**Tabla 2**). Las muestras se lavaron cuatro veces y se añadió PBS-DAPI como marcador nuclear durante 10 minutos. Por último, las muestras se montaron sobre un portaobjetos de vidrio y se añadió una sustancia, llamada Mowiol, que permite mantener la fluorescencia y fijar el cubreobjetos.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	HUÉSPED	PROVEEDOR	DILUCIÓN EN TEJIDO
AVP	Ratón	NIH PS38	1:800
OXT	Ratón	NIH PS41	1:800
cFos	Conejo	Synaptic Systems	1:500

ANTICUERPOS SECUNDARIOS	HUÉSPED	PROVEEDOR	DILUCIÓN EN TEJIDO
Ratón IgG Cy5 647 nm	Mono	Jackson Inmuno Research	1:500
Conejo Alexa 488 nm	Mono	Invitrogen	1:500

Tabla 2. Listado de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en el estudio.

5.5. TRANSPARENTADO DE MUESTRAS: TÉCNICA IDISCO (SOLVENT-CLEARED ORGAN PROTOCOL)

La técnica iDISCO permite elaborar una inmunotinción de un órgano completo mediante su clarificación (**Figura 4**). En este trabajo, se utilizaron cerebros de ratón P21 mutantes y silvestres. En primer lugar, se realizó un pretratamiento con metanol de las muestras a temperatura ambiente y en movimiento. Para ello, se deshidrataron las muestras con varios lavados de metanol/agua: 50 %, 80 %, 100 % (2 veces); una hora cada lavado. A continuación, se dejaron incubar en movimiento las muestras con una solución de 66 % DCM (diclorometano) y 33 % metanol a temperatura ambiente. Al día siguiente,

se hicieron dos lavados de 100 % metanol a temperatura ambiente. Las muestras fueron blanqueadas con 5 % H₂O₂ en metanol (1 volumen al 30 % de H₂O₂ a 5 volúmenes de MeOH), a 4 °C O/N. Tras el blanqueo, las muestras fueron rehidratadas con varios lavados de metanol/agua: 50 %, 80 %, 100 % (2 veces) y un lavado de PBS. Cada lavado fue de 1 hora, a temperatura ambiente y en movimiento. Finalmente, se realizaron dos lavados con PTx.2 de una hora cada uno y en movimiento.

A continuación, las muestras fueron tratadas con una solución de permeabilización, y posteriormente con una solución bloqueo, durante 2 días a 37 °C, respectivamente. Tras este paso, se incubó el anticuerpo primario para el cFos en PTwH/ 5 % DMSO (dimetilsulfóxido)/3 % suero de mono, a 37 °C durante una semana. Se realizaron 6 lavados en PTwH y, al día siguiente, se incubó el anticuerpo secundario en PTwH/ 5 % DMSO/3 % suero de mono, a 37 °C durante una semana. Tras esta incubación se hicieron 6 lavados en PTwH.

Con el fin de transparentar las muestras, se deshidrataron con lavados de metanol/agua: 50 %, 80 %, 100 % (2 veces); una hora cada lavado en movimiento. A continuación, se incubaron durante 3 horas en una solución compuesta por un 66 % de DCM y un 33 % de metanol, seguido de un lavado en DCM 100 % durante 30 minutos a RT con agitación. Posteriormente, las muestras se sumergieron en DBE (dibencil éter) hasta su transparentado completo a RT y protegidas de la luz para evitar su oxidación.

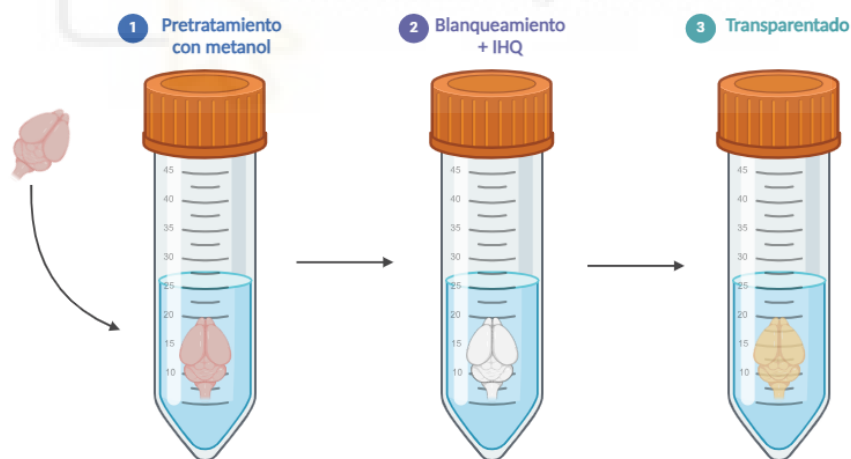


Figura 4. Representación esquemática de los pasos de la técnica iDISCO. Tras la perfusión de los cerebros, se realiza un pretratamiento con metanoles (Paso 1); a continuación, se lleva a cabo la IHQ junto con un blanqueamiento (Paso 2), y finalmente, se realiza el transparentado completo de las muestras (Paso 3).

5.6. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES: MICROSCOPIA CONFOCAL Y ULTRAMICROSCOPIO

Con el fin de adquirir las imágenes, se utilizaron los portaobjetos que contenían los cortes del tejido cerebral fijado. Las imágenes fueron adquiridas de forma secuencial mediante microscopía confocal

láser empleando un microscopio Leica SPEll situado en las instalaciones de imágenes del Instituto de Neurociencias de Alicante. Durante la adquisición, se utilizó un objetivo de 10X y otro objetivo de inmersión de 40X. Además, se eligió un ancho de 6 micras aproximadamente para las imágenes a 40X. Los canales de fluorescencia empleados fueron verde (488 nm), rojo lejano (647 nm) y DAPI (405 nm), lo que permitió la visualización de los marcadores de estudio: actividad neuronal (cFos), células positivas de AVP y células positivas OXT.

Por otro lado, para la visualización tridimensional de las muestras clarificadas (técnica iDISCO), se utilizó un ultramicroscopio (UltramicroscopeII LaVisionBiotec), también incluido en el servicio de microscopía de instituto de neurociencias. El primer paso, fue asegurar la muestra con un tornillo a una plataforma especial para evitar que se desplace y se colocó dentro de una cámara llena de etil cinamato. Una vez preparada, se procedió a la adquisición de imágenes, ofreciendo un amplio campo de visión y se utilizó el láser rojo lejano. Asimismo, el objetivo de adquisición se ajustó a un zoom de 1.25X.

5.7. CUANTIFICACIÓN CELULAR: IMARIS E IMAGEJ

Para realizar la cuantificación celular de las imágenes procesadas con el ultramicroscopio, en primer lugar se convirtieron las imágenes bidimensionales adquiridas con el ultramicroscopio mediante el programa `imaris.file.convert` para reconstruir una imagen tridimensional de cada muestra. Para el análisis de estas muestras se empleó el software Imaris x64 (versión 9.3.1, Bitplane), mediante el cual gracias a una herramienta llamada "Imaris spots" se cuantificó automáticamente la cantidad de células positivas para cFos en el núcleo PVN. Primero, se aisló la región de estudio con la herramienta "Surface", con el objetivo de estudiar y realizar el conteo de núcleos celulares presentes en esa zona. Además, para garantizar una cuantificación adecuada y precisa de las células que expresan cFos, se excluyeron del análisis final, los falsos positivos con la herramienta "Imaris spots". El mismo criterio fue considerado en todas las muestras para asegurar resultados más consistentes.

Para realizar el contaje celular y cuantificar la colocalización de cFos con AVP o con OXT, se utilizó el programa ImageJ. En primer lugar, las fotos realizadas con microscopía confocal a 40x de los individuos P21 mutantes y silvestres fueron importadas. Posteriormente, gracias a una opción llamada "Counter cell" asociamos un color a cada tipo de célula, para poder de esta forma diferenciar cada tipo celular: células que expresaban OXT y AVP (células OXT+; células AVP+), células que expresaban cFos (células cFos+) y células que expresan cFos y AVP (células cFos+; AVP+) o cFos y OXT (células cFos+; OXT+). Cabe destacar, que se tuvieron en cuenta los mismos criterios, para disminuir el margen de error.

5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico, se utilizó el programa Office Excel, donde pudimos comparar entre mutantes y silvestres la cantidad de cFos, OXT o AVP y la colocalización entre OXT o AVP y cFos. Cada uno de los análisis estadísticos tuvieron en cuenta, al menos, una muestra de 3 animales por condición. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media, este último realizado con el comando "SEM". Por otro lado, mediante la prueba t de Student (comando "PRUEBA.T"), se determinaron las diferencias estadísticamente significativas, considerando un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Además, gracias a estos datos, se representaron gráficos circulares y de barras de los individuos silvestres y mutantes.

6. RESULTADOS

6.1. AUMENTO DE LA ACTIVIDAD NEURONAL EN EL HYPT EN RATONES CARENTES DE LIS1 EN PV+ A P21.

La actividad neuronal fue analizada en el HYPT mediante el marcador de actividad neuronal cFos. La proteína que produce este protooncogén se utiliza comúnmente como marcador de actividad neuronal en estudios histológicos. La activación neuronal induce la expresión rápida de cFos en las estructuras cerebrales, permitiendo estudiar regiones funcionales del cerebro (Herrera & Robertson, 1996). Este análisis se llevó a cabo mediante el protocolo de iDISCO para su análisis tridimensional en ratones wt y mut. En concreto, este experimento y los siguientes, se elaboraron en individuos a P21.

En primer lugar, mediante el análisis tridimensional se observó un aumento de intensidad de la fluorescencia cFos+ de forma específica en el PVN de los mutantes. Sin embargo, esta diferencia con respecto a los ratones wt no se observó en otros núcleos hipotalámicos como el SON o el supraquiasmático (SCH) (**Figura 5A y 5B**).

A continuación, el número de células positivas para cFos fue cuantificado en el PVN de individuos wt (n=2) y mut (n=2). Para ello, se realizó la cuantificación mediante la función automática del software Imaris, sin embargo, para disminuir el margen de error, finalmente, se realizó su contaje mediante una función manual del programa. La cantidad de células cFos+ fue mayor en el grupo de los individuos mut (2778 ± 26 células) que en el de los silvestres (1707 ± 11 células) (**Figura 5C**). Además, se cuantificó el volumen del PVN y la densidad de cFos donde también se observó una mayor tendencia en los mutantes comparado con los controles (**Figura 5D y 5E**).

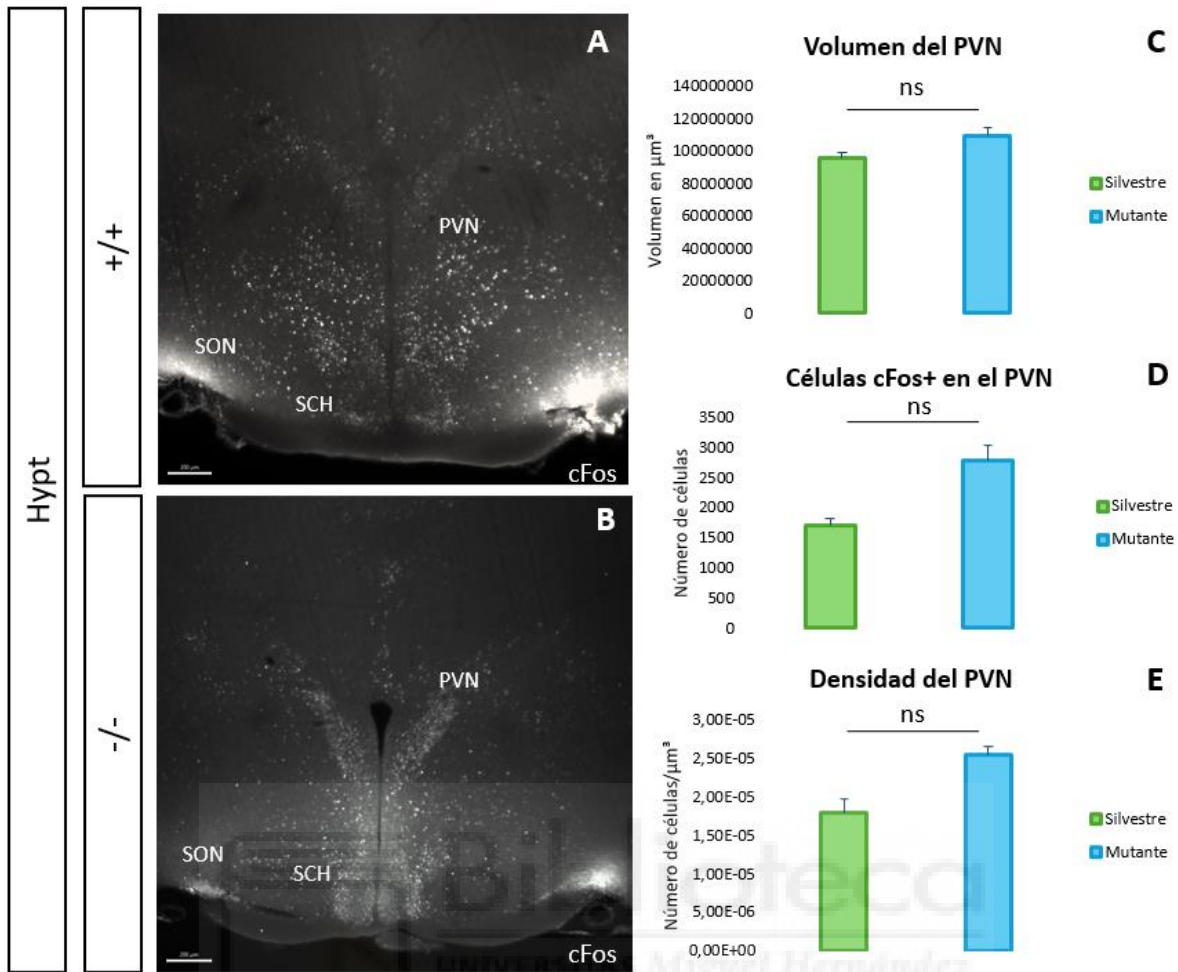


Figura 5. Aumento de células positivas a cFos en PVN. A la izquierda (A y B), se muestran imágenes, capturadas mediante Imaris, de la expresión de cFos en el HYPT de ratones silvestres (+/+) y mutantes (-/-), donde aparecen los núcleos PVN, SON y SCH. Barra de escala = 200 μ m. A la derecha (C, D y E), se muestra el volumen, células cFos+ y densidad del PVN de cada grupo. Las barras de las gráficas representan las medias de cada medida con el error SEM. Prueba T de Student (ns $p > 0,05$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$).

Esta tendencia, sin embargo, no fue significativa al aplicar la prueba estadística T de Student, es decir, hay una tendencia, pero no es significativa pues el valor de p fue mayor a 0,05. Por este motivo, a continuación, se realizó la misma IHQ utilizando el anticuerpo de actividad neuronal (cFos) en tejido.

El conteo de células cFos+ en el PVN en cortes de tejido cerebral, se realizó mediante el programa ImageJ con la función "Counter cell". En este caso, se emplearon ratones mut (n=3) y wt (n=4) a P21.

Los resultados fueron similares a lo observado con el análisis tridimensional. Visiblemente, con el DAPI se observó un mayor número de cuerpos celulares en los mutantes (Figura 6E) comparado con los wt (Figura 6A), claramente observable al visualizar únicamente el marcador cFos (Figura 6F y 6B), acompañado de una elevada intensidad. Sin embargo, en otros núcleos como el SON, visiblemente no

se detectaron cambios (**Figuras 6C y 6G**). Por otro lado, los resultados demostraron un significativo aumento de la actividad neuronal en los mutantes ($53,25 \pm 13,79$ células cFos+), mientras que para el otro grupo fue menor ($18,33 \pm 1,09$ células cFos+) (**Figura 6D**). Además, se normalizó el número de células con respecto al área de la zona cuantificada ($361,61 \mu\text{m}^2$), y se observaron diferencias significativas (**Figura 6H**). Por lo tanto, los mutantes muestran una mayor actividad neuronal que los silvestres de manera específica en el núcleo PVN.

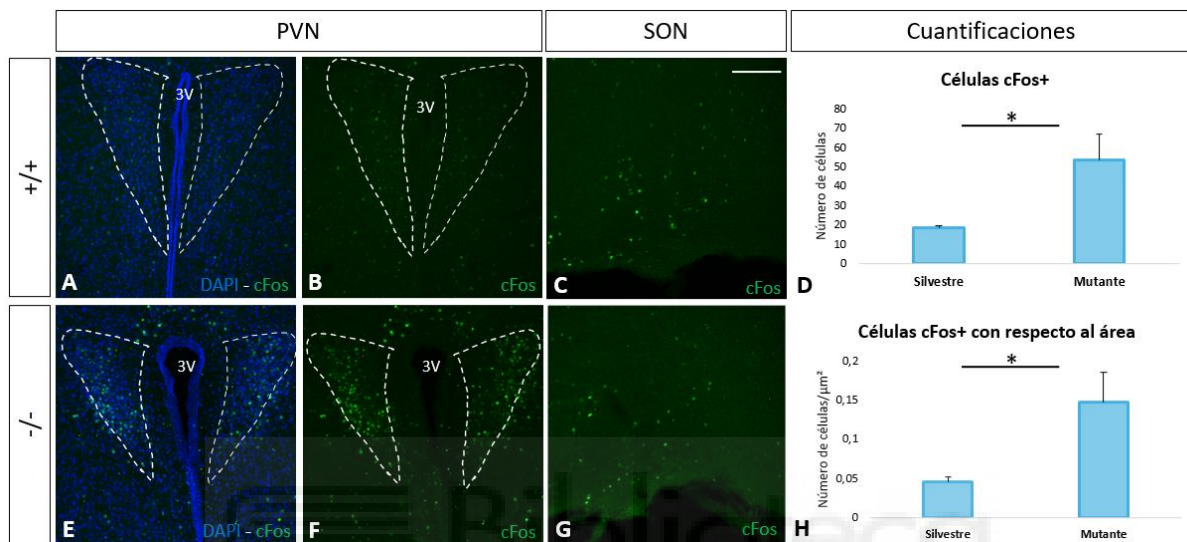


Figura 6. Aumento de cFos en PVN en los mutantes, pero no en otros núcleos hipotalámicos como SON. A la izquierda, se muestran imágenes a 10X, del PVN (**A, B, E y F**) y del SON (**C y G**) de wt (+/+) y mut (-/-). Se muestra la presencia de células cFos+ (verde), mientras que el DAPI muestra los núcleos celulares (azul). Barra de escala 10X = 150 μm . A la derecha, se muestran las cuantificaciones de células cFos+ (**D**) y de células cFos+ con respecto al área (**H**) de la zona cuantificada ($361,61 \mu\text{m}^2$). Las barras de las gráficas representan las medias de cada medida con el error SEM. Prueba T de Student (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

Además, la prueba T de Student determinó que hubo diferencias estadísticamente significativas de cFos total (**Figura 6D**) y, por lo tanto, con respecto al área de la zona cuantificada (**Figura 6H**), pues el valor de p fue menor a 0,05.

6.2. LAS POBLACIONES OXITOCINÉRGICAS Y VASOPRESINÉRGICAS NO MUESTRAN VARIACIONES EN EL PVN ENTRE LOS RATONES MUTANTES Y LOS CONTROLES.

La expresión de OXT y AVP fueron analizadas en el PVN debido a que es son neuropéptidos que se sintetizan específicamente en distintos núcleos del hipotálamo (ver Introducción). Para ello, se emplearon individuos de genotipo wt (n=4) y mut (n=3) a P21. El objetivo fue estudiar la posible

variación de OXT (células OXT+) y AVP (células AVP+). Para el conteo, se empleó el programa ImageJ, con la función “Counter cell”.

La cuantificación llevada a cabo de la expresión de OXT en el PVN no mostró diferencias entre ambos grupos, como se percibe en las Figuras 7B y 7D. En el caso de los ratones wt la media fue de $15 \pm 3,0$ células OXT+ y en los mutantes fue de $18,5 \pm 1,3$ células OXT+ (**Figura 7G**). Cabe destacar, que la prueba T de Student determinó que no existen diferencias significativas entre ambos grupos.

Por otra parte, en el caso de la cuantificación de las células AVP+ presentó grandes similitudes con la OXT. Al igual que para la OXT, se estudió bajo las mismas condiciones, es decir, en ratones mutantes (n=3) y wt (n=4) a P21. Para ello, se analizó la posible variación AVP (células AVP+) mediante el programa ImageJ, con la función “Counter cell”. En primer lugar, al observar las Figuras 7C y 7G, se percibe que no hay cambios cualitativos en la expresión de AVP entre ambos grupos.

El análisis cuantitativo reveló que, en ambos grupos, la presencia de células AVP fue prácticamente igual. La media de células que expresaron AVP en los mutantes fue de $25,67 \pm 0,88$ células AVP+, mientras que en los wt fue de $18,5 \pm 2,84$ células AVP+ (**Figura 7H**). Sin embargo, el análisis estadístico confirmó la ausencia de diferencias significativas. Por lo que, tanto la población de células OXT+ y AVP+ en el PVN no muestra diferencias significativas entre los ratones wt y mut.

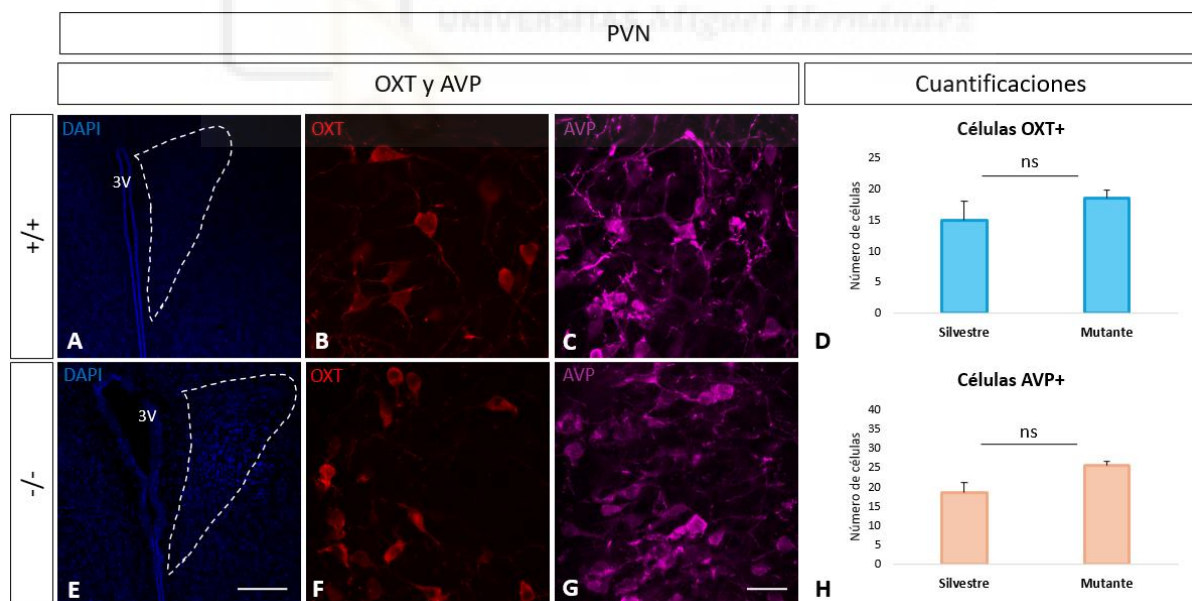


Figura 7. Cuantificación de células que producen los neuropéptidos OXT y AVP en el PVN. De izquierda a derecha, se muestra la presencia de DAPI en el PVN a 10X (**A** y **E**), el cual muestra los núcleos celulares (azul), células OXT+ a 40X (rojo; **B** y **F**) y células AVP+ a 40X (violeta, **C** y **G**). Barra de escala 10X (**A** y **E**) = 150 μ m. Barra de escala 40X (**B**, **C**, **F** y **G**) = 30 μ m. A la derecha, se muestran las gráficas mostrando en el número de células OXT+ (**D**) y células AVP+ (**H**) totales en el PVN. Las barras de las gráficas representan las medias de cada medida con el error SEM. Prueba T de Student (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

6.3. NEURONAS OXITOCINÉRGICAS ESTÁN MÁS ACTIVAS (CFOS+) EN EL PVN DE LOS RATONES LIS1^{FLOX}/PV^{CRE}.

Dado que los datos previos mostraban un aumento de la actividad neuronal (cFos+) en la corteza cerebral, este análisis también fue llevado a cabo en el PVN de estos ratones. Por lo tanto, a continuación, se realizó el estudio histológico de doble marcaje para identificar cFos y OXT. De manera cualitativa las imágenes a baja resolución (10X), se percibe un aumento de cFos en los mut comparado con los wt (**Figura 8A y 8E**) observable también en las imágenes a mayor resolución (40x; **Figura 8B y 8F**).

En análisis cuantitativo en este núcleo revelaron que, en el caso de los wt, no existía colocalización de células OXT+ con cFos+, indicando que en los ratones controles la población oxitocinérgica no está activa de manera basal (0 células cFos+; OXT+), mientras que en los mutantes sí que se observaban en todos los casos analizados células cFos+; OXT+ (**Figura 8C**).

Esta cuantificación mostró que los ratones wt presentaban un 100 % de las células fueron cFos+ que eran negativas para OXT, es decir, que todas sus células OXT+ no estaban activas en el momento de su análisis, debido a que ningún wt presentó colocalización de ambos marcadores (**Figuras 8C y 8D**). Mientras que, este estudio en el PVN demostró que en el grupo de los mutantes existe un 17,6 % de células cFos+; OXT+ del cFos total (**Figuras 8G y 8H**). Por lo tanto, en los ratones mutantes, las células que expresan OXT están activas (OXT+; cFos+) comparando con los controles.

En cuanto al análisis estadístico, gracias a la prueba T de Student, se confirma que la diferencia en el porcentaje de colocalización de OXT y de cFos entre los mutantes y los silvestres es significativa (**Figura 8G**).

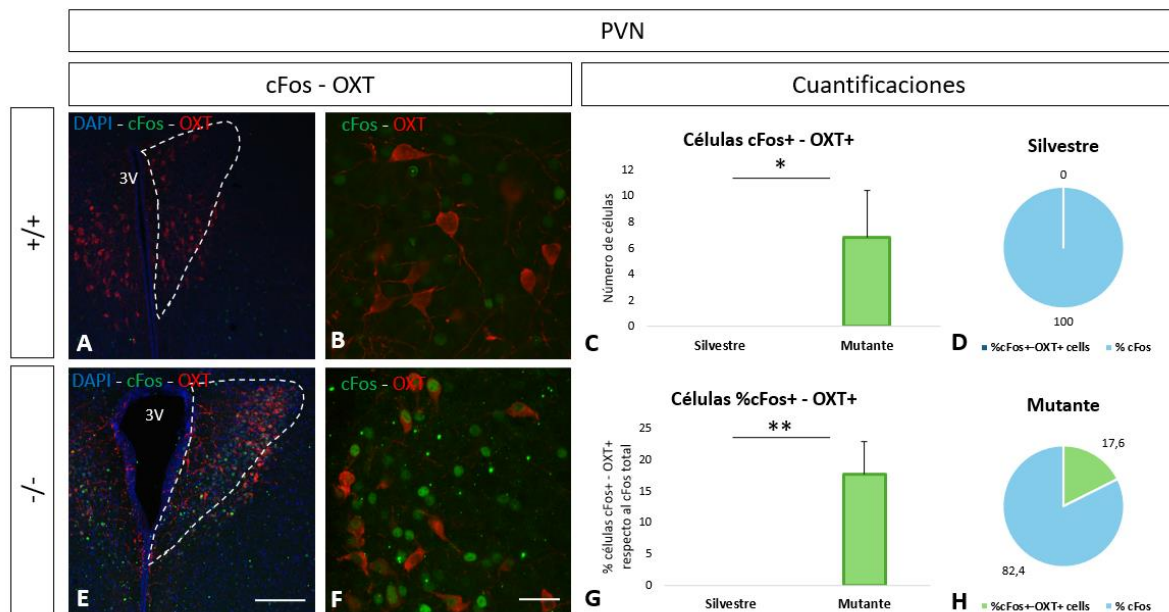


Figura 8. Aumento de actividad en células de OXT en el PVN en los mutantes. A la izquierda, se muestra el PVN a 10X (A y E) y a 40X (B y F) de los mut (-/-) y wt (+/+). Se observa el DAPI, el cual muestra los núcleos celulares (azul), células OXT+ (rojo) y células cFos+ (verde). Barra de escala 10X (A y E) = 150 μ m. Barra de escala 40X (B y F) = 30 μ m. A la derecha, se muestran las cuantificaciones de células cFos+; OXT+ (C) y su porcentaje con respecto al cFos total (cFos+ y cFos+; OXT+) (G), en los mutantes y en los silvestres. En D y H, se observa las proporciones del porcentaje de las células cFos+; OXT+ con respecto al cFos total en wt y mut. Las barras de las gráficas representan las medias de cada medida con el error SEM. Prueba T de Student (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

6.4. NEURONAS VASOPRESINÉRGICAS ESTÁN MÁS ACTIVAS (CFOS+) EN EL PVN DE LOS RATONES LIS1^{FLOX}/PV^{CRE}.

La AVP al ser un neuropéptido parecido a la OXT, se realizó también su análisis. Se llevó a cabo el estudio histológico de doble marcaje para identificar cFos y AVP. De la misma manera que para la OXT, cualitativamente se observó un mayor número de células que expresaban cFos en los mut que en los wt en las imágenes a baja resolución (10X) (Figuras 9A y 9E), también observable a 40X (Figuras 9B y 9F).

Por otro lado, el análisis cuantitativo de los datos en el PVN demostró que existe colocalización en las células de AVP de los mutantes, es decir, que el sistema vasopresinérgico está activo de manera basal ($15 \pm 0,88$ células) en los mut (Figura 9C). Por el contrario, en los wt solamente se observó este fenómeno en un caso ($0,25 \pm 2,75$ células) (Figura 9G).

En concreto, la cuantificación demostró que los ratones mut presentaban un 22,70 % de las células fueron cFos+; AVP+ del cFos total, es decir, las células AVP+ estaban activas en el momento del análisis, debido a que presentaron colocalización de ambos marcadores en diferentes células (**Figuras 9C y 9D**). En cambio, en los individuos wt, existe un 1,67 % de células cFos+; AVP+ del cFos total (**Figuras 9G y 9H**). Por las razones anteriormente mencionadas, los ratones mut que expresan AVP tienen el sistema vasopresinérgico activo.

Respecto al análisis estadístico, la prueba T de Student demostró que el porcentaje de colocalización de AVP y cFos entre los mut y los wt es significativa (**Figura 9G**).

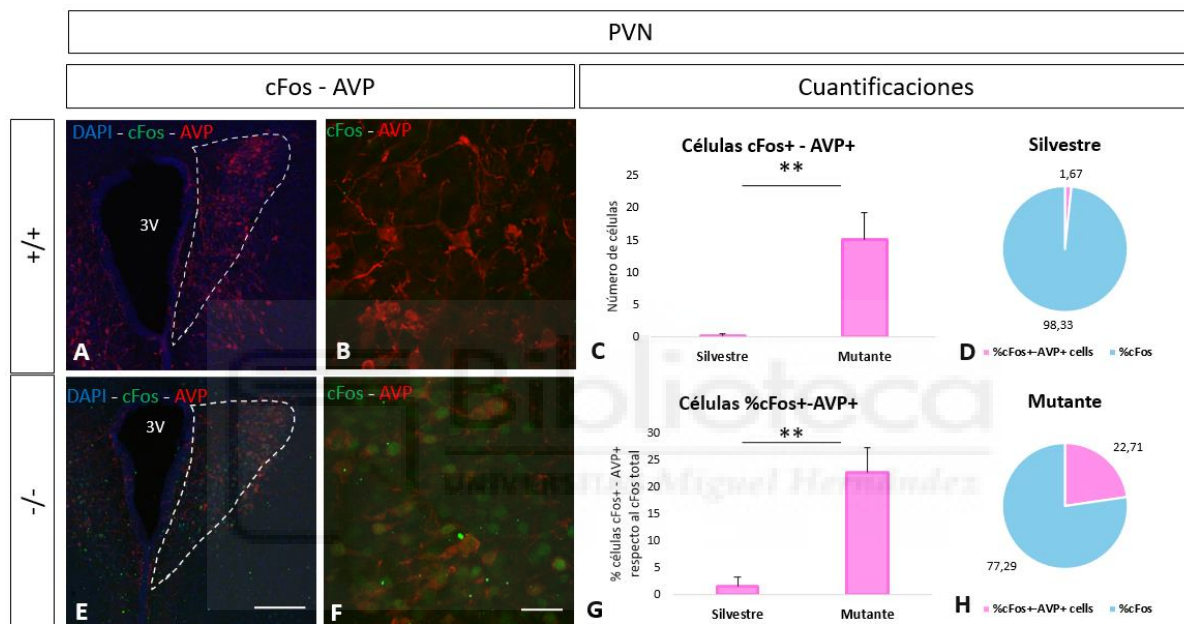


Figura 9. Aumento de actividad en células de AVP en el PVN en los mutantes. A la izquierda, se muestra el PVN a 10X (**A y E**) y a 40X (**B y F**) de los mut (-/-) y wt (+/+). Se muestra la presencia de DAPI, el cual marca los núcleos celulares (azul), células AVP+ (rojo) y células cFos+ (verde). Barra de escala 10X (**A y E**) = 150 μ m. Barra de escala 40X (**B y F**) = 30 μ m. A la derecha, se muestran las cuantificaciones de células cFos+; AVP+ (**C**) y su porcentaje con respecto al cFos total (cFos+ y cFos+; AVP+) (**G**), en los mutantes y en los silvestres. En **D** y **H**, se observa las proporciones del porcentaje de las células cFos+; AVP+ con respecto al cFos total en wt y mut. Las barras de las gráficas representan las medias de cada medida con el error SEM. Prueba T de Student (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

7. DISCUSIÓN

La mutación de la proteína Lis1 provoca una migración neuronal defectuosa generando un conjunto de malformaciones corticales (Donato et al., 2015). Por lo tanto, esta alteración, la lisencefalia tipo 1, provoca a su vez la presencia de ciertos trastornos neurológicos como por ejemplo epilepsia y/o

esquizofrenia (McManus et al., 2004; Reiner et al., 2006). Resultados previos del laboratorio del Dr. Salvador Martínez demuestran que la ausencia del gen *Lis1* específica en interneuronas PV+, provoca la disminución de esta población en la corteza cerebral en ACC y RSC. Este TFG ha tenido como objetivo examinar sus efectos en otras regiones cerebrales como es el HYPT, región nunca antes estudiada en este modelo animal, incluyendo alteraciones en la actividad y el estudio de neuropéptidos que se expresan en esta región cerebral.

En este estudio, por un lado, se detectó por primera vez la actividad neuronal anormal que causa la mutación del gen *Lis1* en el hipotálamo a P21. Gracias a la realización de diferentes IHQ, se analizó mediante el protooncogén cFos, y se pudo demostrar que existe un aumento significativo de actividad en los individuos mut en el PVN.

En primer lugar, es sabido que la eliminación del gen *Lis1* provoca la reducción de las interneuronas PV en la corteza cingular de los individuos mutantes (datos todavía no publicados). Por lo tanto, es posible que los circuitos corticales estén alterados y no se esté dando la inhibición propia de las células piramidales por parte de las interneuronas como ocurre en el mutante *Lis1-KO* (Domínguez-Sala et al., 2022). Este efecto podría provocar como consecuencia el aumento de actividad neuronal en ciertas regiones cerebrales donde las piramidales estén proyectando, como por ejemplo es el HYPT (Gabbott et al., 2005). En concreto, este trabajo ha identificado que de forma específica en el PVN está ocurriendo ese desajuste de actividad neuronal. Por lo tanto, es posible que la reducción de interneuronas PV+ esté provocando una activación superior a la basal de las neuronas piramidales y, como consecuencia, las piramidales estén provocando una hiperactivación de las neuronas del PVN.

Asimismo, se sabe que las interneuronas PV tienen un rol importante en los procesos cognitivos asociados con el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, el equilibrio entre las acciones excitatorias e inhibitorias, conocido como E/I, es esencial para el correcto funcionamiento neuronal. Numerosos estudios demuestran que un desajuste entre la proporción de excitación e inhibición de estas se ha relacionado con la aparición de afecciones cognitivas, como puede ser el Alzheimer (Li et al., 2024) o la esquizofrenia (Lewis et al., 2012). Es por ello, que en personas con Alzheimer y en los modelos animales de esta enfermedad, esta actividad anormal en los sistemas GABAérgicos indica la implicación de las interneuronas PV.

Igualmente, hay un creciente interés en investigar el papel de estas interneuronas durante las etapas iniciales, antes de que la enfermedad se manifieste por completo. En concreto, se ha enfocado la atención en los cambios tempranos en la cognición y la memoria sociales, con el objetivo de vincular los déficits iniciales con la actividad anómala de las interneuronas PV (Černotová et al., 2023). Al igual que estos autores, este TFG se centra en analizar estadios postnatales, por su importancia en el

desarrollo y la escasa supervivencia de los ratones a edades adultas. La relación identificada por distintos autores de las interneuronas PV con ciertas enfermedades, indica que este modelo animal podría ser un buen candidato para seguir estudiando ciertas enfermedades del neurodesarrollo en fases iniciales, con el fin de tratar su progresión (Černotová et al., 2023; Li et al., 2024).

Dado que la desregulación de la actividad neuronal identificada en el modelo Lis-PV fue específica en el PVN, algunas funciones de este núcleo podrían estar afectadas. La OXT y la AVP son dos neuropéptidos que se expresan en distintos núcleos del HYTP, uno de los más principales el PVN. Estas hormonas desempeñan un papel crucial en diversos aspectos de las conductas sociales, como la empatía o el reconocimiento social. Además, están implicados en la regulación de varios comportamientos, como la ansiedad, el establecimiento de vínculos sociales, el estrés y la agresión (ver Introducción). En cuanto a estos sistemas, la población oxitocinérgica y vasopresinérgica en el modelo animal estudiado en este trabajo, no mostraron que estuvieran alterados en los ratones carentes de Lis1. Por ello, se podría decir que tanto la expresión de OXT como de AVP no está alterada por la alteración de los circuitos neuronales, debido a que los niveles de ambos en wt y mut fueron prácticamente iguales.

Sin embargo, ambas poblaciones, células positivas a AVP y OXT, se detectaron estar más activas en mut comparado con los wt. Ciertos autores sugieren que existe relación entre la OXT y el mantenimiento del equilibrio E/I fisiológico, por lo que un desbalance puede llevar a trastornos neuroconductuales (Ripamonti et al., 2017). No obstante, en este estudio se ha comprobado que las interneuronas PV no modulan la expresión de AVP y de OXT, debido a que no hubo ningún cambio en los niveles de OXT y AVP. En cambio, sí hubo un aumento de actividad, lo que puede indicar que sí existe relación indirecta entre las células que expresan estas hormonas y las interneuronas PV. Además, estas células ahora activas en el PVN representan aproximadamente el 20 % de todas las células que expresan cFos en el PVN. Por todo ello, los datos sugieren que la actividad de las neuronas que expresan OXT y AVP en el PVN puede estar regulada por las neuronas piramidales de ACC y RSP, que se sabe que proyectan al HYPT (Gabbott et al., 2005).

Por otro lado, la AVP es un neuropéptido muy similar a la OXT, lo que motiva su estudio en relación con alteraciones neuronales. En este trabajo, se ha observado los mismos cambios que los observados para la OXT. Muchos trabajos previos sugieren que la AVP y sus receptores también modulan el comportamiento social, así como el aprendizaje y la memoria, funciones que también dependen del equilibrio E/I (Hammock et al., 2012). Por lo tanto, también existiría una relación indirecta entre la AVP y las interneuronas PV. Este estudio propone que la AVP, podría estar relacionada con otras

alteraciones cerebrales, ofreciendo un modelo experimental para estudiar estas enfermedades mediante este neuropéptido.

En resumen, este trabajo ha mostrado la relevancia de Lis1 para el correcto funcionamiento de las PV+ en la corteza cingular. Ya que la ausencia específica de Lis1 en las células PV+ provoca un desajuste en la actividad de las neuronas responsables de producir ciertos neuropéptidos esenciales para una correcta conducta social, entre otras funciones. Sin embargo, llevar a cabo más estudios de colocación de actividad neuronal (cFos) con otros marcadores sigue siendo necesario para conocer qué otras poblaciones neuronales están también desreguladas por esta mutación y contribuir así en el conocimiento de las bases moleculares involucradas para ciertas enfermedades asociadas a estos desajustes como la enfermedad de Alzheimer entre otras.

8. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Tras el análisis y discusión de los resultados, se puede concluir que:

1. Debido a la ausencia del gen *Lis1*, existe un aumento de actividad neuronal en el PVN de los ratones que no expresan Lis1 en las interneuronas PV+.
2. Los ratones mutantes a P21, poseen las células que expresan AVP y OXT activas en el PVN.
3. El número de células que expresan AVP y OXT, tanto en wt como en mut, no varía.

Considerando los nuevos datos presentados en este TFG, las siguientes estrategias ayudarán a fortalecer los datos anteriores y alcanzar nuevos objetivos. Para ello, se proponen los siguientes experimentos:

1. Estudio de la actividad neuronal en otros núcleos del HYPT como SON (OXT y AVP) y SCH (AVP).
2. Realizar el estudio en los receptores de OXT y AVP mediante IHQ o iDISCO, con anticuerpos para estos.
3. Analizar otras hormonas o marcadores en estos núcleos como puede ser la serotonina. El objetivo sería observar si las células que la expresan están más activas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Burbach, J. P., Luckman, S. M., Murphy, D., & Gainer, H. (2001). Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system. *Physiological Reviews*, 81(3), 1197–1267. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1197>
- Carcea, I., Caraballo, N. L., Marlin, B. J., Ooyama, R., Riceberg, J. S., Navarro, J. M. M., Opendak, M., Diaz, V. E., Schuster, L., Torres, M. I. A., Lethin, H., Ramos, D., Minder, J., Mendoza, S. L., Bair-Marshall, C. J., Samadjopoulos, G. H., Hidema, S., Falkner, A., Lin, D., . . . Froemke, R. C. (2021). Oxytocin neurons enable social transmission of maternal behaviour. *Nature*, 596(7873), 553-557. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03814-7>
- Černotová, D., Hružová, K., Levčík, D., Svoboda, J., & Stuchlík, A. (2023). Linking Social Cognition, Parvalbumin Interneurons, and Oxytocin in Alzheimer’s Disease: An Update. *Journal Of Alzheimer’s Disease*, 96(3), 861-875. <https://doi.org/10.3233/jad-230333>
- Davies, J., Waller, S., Zeng, Q., Wells, S., & Murphy, D. (2003). Further delineation of the sequences required for the expression and physiological regulation of the vasopressin gene in transgenic rat hypothalamic magnocellular neurones. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(1), 42–50 doi:865.
- DeFelipe, J., López-Cruz, P. L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larrañaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fitzpatrick, D., Freund, T. F., González-Burgos, G., Hestrin, S., Hill, S., Hof, P. R., Huang, J., Jones, E. G., Ascoli, G. A. (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(3), 202-216. <https://doi.org/10.1038/nrn3444>
- Dobyns, W. B., Reiner, O., Carrozzo, R., & Ledbetter, D. H. (1993). Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA*, 270(23), 2838-2842. <https://doi.org/10.1001/jama.270.23.2838>
- Domínguez-Sala, E., Valdés-Sánchez, L., Canals, S., Reiner, O., Pombero, A., García-López, R., Estirado, A., Pastor, D., Geijo-Barrientos, E., & Martínez, S. (2022). Abnormalities in Cortical GABAergic Interneurons of the Primary Motor Cortex Caused by Lis1 (Pafah1b1) Mutation

Produce a Non-drastic Functional Phenotype. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.769853>

- Donato, F., Chowdhury, A., Lahr, M., & Caroni, P. (2015). Early- and Late-Born Parvalbumin Basket Cell Subpopulations Exhibiting Distinct Regulation and Roles in Learning. *Neuron*, 85(4), 770-786. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.011>
- Dos-Santos, R. C., Reis, L. C., Perello, M., Ferguson, A. V., & Mecawi, A. S. (2019). The actions of ghrelin in the paraventricular nucleus: energy balance and neuroendocrine implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1455(1), 81-97. <https://doi.org/10.1111/nyas.14087>
- Freitas, C., Perez, J., Knobel, M., Tormos, J. M., Oberman, L., Eldaief, M., et al. (2011). Changes in cortical plasticity across the lifespan. *Front. Aging Neurosci.* 3:5. doi: 10.3389/fnagi.2011.00005
- Gabbott, P. L., Warner, T. A., Jays, P. R., Salway, P., & Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *Journal Of Comparative Neurology*, 492(2), 145-177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- Gimpl, G., & Fahrenholz, F. (2001). The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiological Reviews*, 81(2), 629-683. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.629>
- Gradwell, M. A., Boyle, K. A., Browne, T. J., Bell, A. F., Leonardo, J., Reyes, F. S. P., Dickie, A. C., Smith, K. M., Callister, R. J., Dayas, C. V., Hughes, D. I., & Graham, B. A. (2021). Diversity of inhibitory and excitatory parvalbumin interneuron circuits in the dorsal horn. *PAIN*, 163(3), e432-e452. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002422>
- Grinevich, V., Desarménien, M., Chini, B. M. P., Tauber, M., & Muscatelli, F. (2015). Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders. *Frontiers In Neuroanatomy*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00164>

- Hammock, E. A. D., & Hammock, E. A. D. (2012). Modulation of parvalbumin interneuron number by developmentally transient neocortical vasopressin receptor 1a (V1aR). *Neuroscience*, 222, 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.025>
- Herrera, D., & Robertson, H. (1996). Activation of in the brain. *Progress In Neurobiology*, 50(2-3), 83-107. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(96\)00021-4](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(96)00021-4)
- Hoftman, G. D., and Lewis, D. A. (2011). Postnatal developmental trajectories of neural circuits in the primate prefrontal cortex: identifying sensitive periods for vulnerability to schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 37, 493–503. doi: 10.1093/schbul/sbr029
- LeMessurier, A. M., and Feldman, D. E. (2018). Plasticity of population coding in primary sensory cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 53, 50–56. doi: 10.1016/j.conb. 2018.04.029
- Li, R., Zeng, Q., Ji, M., Zhang, Y., Mao, M., Feng, S., Duan, M., & Zhou, Z. (2024). Oxytocin ameliorates cognitive impairments by attenuating excitation/inhibition imbalance of neurotransmitters acting on parvalbumin interneurons in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy. *Journal of Biomedical Research/Journal of Biomedical Research*, 38, 1. <https://doi.org/10.7555/jbr.37.20230318>
- Liu, Y., Li, A., Bair-Marshall, C., Xu, H., Jee, H. J., Zhu, E., Sun, M., Zhang, Q., Lefevre, A., Chen, Z. S., Grinevich, V., Froemke, R. C., & Wang, J. (2023). Oxytocin promotes prefrontal population activity via the PVN-PFC pathway to regulate pain. *Neuron*, 111(11), 1795-1811.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.03.014>
- McManus, M. F., Nasrallah, I. M., Pancoast, M. M., Wynshaw-Boris, A., & Golden, J. A. (2004). Lis1 Is Necessary for Normal Non-Radial Migration of Inhibitory Interneurons. *The American Journal of Pathology*, 165(3), 775-784. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63340-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63340-8)
- Otero-Garcia, M., Martin-Sanchez, A., Fortes-Marco, L., Martinez-Ricos, J., Agustin-Pavon, C., Lanuza, E., & Martinez-Garcia, F. (2014). Extending the socio-sexual brain: Arginine-vasopressin immunoreactive circuits in the telencephalon of mice. *Brain Structure & Function*, 219(3), 1055–1081. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0553-3>

- Qin, C., Li, J., & Tang, K. (2018). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: development, function, and human diseases. *Endocrinology*, 159(9), 3458-3472. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00453>
- Rae, M., Duarte, M. L., Gomes, I., Camarini, R., & Devi, L. A. (2021). Oxytocin and vasopressin: Signalling, behavioural modulation and potential therapeutic effects. *British Journal Of Pharmacology*, 179(8), 1544-1564. <https://doi.org/10.1111/bph.15481>
- Reiner, O., Sapoznik, S., & Sapir, T. (2006). Lissencephaly 1 linking to multiple diseases. *NeuroMolecular Medicine*, 8(4), 547-565. <https://doi.org/10.1385/NMM:8:4:547>
- Ripamonti, S., Ambrozkiwicz, M. C., Guzzi, F., Gravati, M., Biella, G., Bormuth, I., Hammer, M., Tuffy, L. P., Sigler, A., Kawabe, H., Nishimori, K., Toselli, M., Brose, N., Parenti, M., & Rhee, J. S. (2017). Transient oxytocin signaling primes the development and function of excitatory hippocampal neurons. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.22466>
- Rupert, D. D., & Shea, S. D. (2022). Parvalbumin-positive interneurons regulate cortical sensory plasticity in adulthood and development through shared mechanisms. *Frontiers in neural circuits*, 16. <https://doi.org/10.3389/fncir.2022.886629>
- Silverthorn, D. U. (1997). *Human Physiology: an integrated approach*. Panamericana.
- Woodson, J., & Bergan, J. F. (2023). Uncovering the brain-wide pattern of synaptic input to vasopressin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal Of Comparative Neurology*, 531(10), 1017-1031. <https://doi.org/10.1002/cne.25476>
- Wynshaw-Boris, A. (2007). Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clinical Genetics*, 72(4), 296-304. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00888.x>