



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN DE INTERNEURONAS QUE EXPRESAN SOMATOSTATINA HACIA LA CORTEZA CINGULADA EN UN MODELO MURINO MUTANTE PARA EL GEN *LIS1*

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Septiembre 2024

Autor: Jorge Navarro Mira

Modalidad: Trabajo experimental

Tutoras: Raquel García López y Ana Pombero García

Área: Anatomía y Embriología Humana

Departamento: Histología y Anatomía

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Estructura y organización del neocórtex.....	4
Desarrollo del neocórtex y migración neuronal.....	5
El gen <i>Lis1</i> y su función en el desarrollo cortical.....	8
Interneuronas SST+: origen, biología y función.....	9
Corteza cingulada.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Cepa de ratones transgénica.....	13
Genotipado de animales transgénicos.....	14
Preparación del tejido y corte de secciones coronales de cerebro.....	16
Ensayo de inmunofluorescencia y montaje de preparaciones.....	16
Cuantificación celular por análisis de imagen: ImageJ.....	17
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	20
RESULTADOS.....	21
Estudio de la migración de interneuronas SST+ en el palio dorsal de ratones control y mutantes <i>Lis1</i> SST-ko en el día E16.5.....	21
Estudio de la distribución y maduración de las interneuronas SST+ en la ACC de ratones control y mutantes <i>Lis1</i> SST-ko en el día P1.....	22
Estudio de la distribución y maduración de las interneuronas SST+ en la RSC de ratones control y mutantes <i>Lis1</i> SST-ko en el día P1.....	26
DISCUSIÓN.....	30
<i>Lis1</i> regula la migración de las interneuronas SST+ a través de la MZ y la SP en el palio dorsal.....	30
<i>Lis1</i> está implicado en la migración de las interneuronas SST+ hacia la corteza cingulada, con un efecto diferencial entre la ACC y la RSC.....	32
La eliminación de <i>Lis1</i> reduce la maduración de las interneuronas SST+ de la capa VI en la corteza cingulada.....	34
Las anomalías en la migración de las interneuronas SST+ y su relación con la etiología de los trastornos del neurodesarrollo.....	35
CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXO.....	41

RESUMEN

El gen *Lis1* cumple un importante rol en la regulación de la migración neuronal y en la organización de la citoarquitectura cortical durante el desarrollo del neocórtex. En este trabajo, se ha estudiado la distribución y maduración de las interneuronas que expresan somatostatina (SST+) en el palio dorsal y en la corteza cingulada durante el desarrollo embrionario y postnatal, respectivamente, empleando para ello un modelo murino mutante selectivo para el gen *Lis1*, con el fin de determinar si la eliminación de la expresión de *Lis1* afecta a los procesos de migración y maduración de este tipo neuronal. Los resultados indican que los ratones mutantes para *Lis1* presentan reducciones en la densidad de interneuronas SST+ en ambos estadios analizados, aunque la magnitud de la variación difiere en función de la región cingulada y la capa cortical estudiada; mientras que la maduración de las interneuronas SST+ parece afectada en la capa VI, lo cual sugiere que *Lis1* puede ser importante para la correcta migración de las interneuronas SST+ hacia la corteza cingulada y su posterior maduración, por lo que su mutación puede asociarse con la etiología de diversos rasgos conductuales o enfermedades neuropsiquiátricas.

ABSTRACT

Lis1 gene plays an important role in regulating neuronal migration and organizing cortical cytoarchitecture during the development of the neocortex. In this study, the distribution and maturation of somatostatin-expressing interneurons (SST+ interneurons) in the dorsal pallium and the cingulate cortex during embryonic and postnatal development, respectively, were examined using a selective mutant murine model for the *Lis1* gene, in order to determine if the elimination of *Lis1* expression affects the migration and maturation processes of this neuronal type. The results indicate that *Lis1* mutant mice show reductions in the density of SST+ interneurons at both analyzed stages, although the magnitude of the variation differs depending on the cingulate region and the cortical layer studied; whereas the maturation of SST+ interneurons seems affected in layer VI, which suggests that *Lis1* may be important for the correct migration of SST+ interneurons to the cingulate cortex and their subsequent maturation. Therefore, its mutation may be associated with the etiology of various behavioral traits or neuropsychiatric disorders.

Palabras clave: *Lis1*, interneuronas SST+, migración neuronal, maduración, corteza cingulada anterior, corteza retrosplenial

INTRODUCCIÓN

La corteza cerebral es una estructura caracterizada por presentar una elevada complejidad estructural y funcional, la cual está constituida por el arcuicórtex, el paleocórtex y el neocórtex¹. Evolutivamente, el neocórtex ha aumentado notablemente su tamaño y complejidad durante la radiación de los mamíferos, lo que ha llevado a su división en más de 50 áreas estructuralmente diferentes que surgen como fruto de un complejo proceso de regionalización que lleva a cada área neocortical a especializarse en la ejecución de tareas concretas^{1,2}. Por ello, comprender con qué regiones cerebrales se conecta cada área y caracterizar los actores que intervienen en su desarrollo y correcto funcionamiento resulta vital para estudiar la etiología, progresión y pronóstico de las enfermedades neuropsiquiátricas, así como su relación con las alteraciones en el neurodesarrollo.

Estructura y organización del neocórtex

El neocórtex es una estructura laminar formada por seis capas que se desarrollan a través de un patrón conocido como “de dentro hacia fuera”, en el que las capas más profundas son las primeras en formarse, mientras que las capas más superficiales se originan posteriormente, a excepción de la capa I, que, a pesar de ser la más superficial, es la primera en desarrollarse^{1,2}. De esta forma, el neocórtex queda formado por la capa molecular (capa I), con un número reducido de somas neuronales; las capas granular y piramidal externa (capas II y III, respectivamente), con un predominio de neuronas piramidales; la capa granular interna (capa IV), donde predominan las células estrelladas; la capa piramidal interna (capa V), con neuronas piramidales de gran tamaño; y la capa multiforme (capa VI)¹.

Asimismo, el neocórtex presenta un segundo tipo de organización en el eje transversal, en el que encontramos columnas cilíndricas radiales que atraviesan las seis capas anteriormente mencionadas y se distribuyen a lo largo de toda la corteza, las cuales reciben el nombre de columnas corticales. Estas columnas son consideradas como la unidad funcional más elemental del neocórtex y cada una de ellas queda formada por un microcircuito local, que contiene el número mínimo de neuronas necesario para llevar a cabo la tarea o función que deben mediar¹.

En el neocórtex, encontramos una diversidad neuronal muy amplia. El tipo neuronal más representado en esta estructura son las neuronas piramidales, que

suponen el 75-85% del total de neuronas corticales, y se caracterizan por presentar actividad excitatoria al emplear el glutamato como neurotransmisor y por proyectar sus axones hacia otras áreas de la corteza o del sistema nervioso central (SNC)^{1,3}. En segundo lugar, encontramos un grupo altamente heterogéneo de neuronas no espinosas que representa el 15-25% de las neuronas presentes en esta estructura: las interneuronas GABAérgicas, las cuales emplean el ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor, lo que les brinda características inhibitorias; además de presentar un axón que arboriza localmente dentro de la propia columna cortical^{1,4}.

Todos estos tipos neuronales presentan una alta densidad de conexiones específicas entre sí, de forma que establecen microcircuitos corticales en los que existe un balance entre excitación e inhibición en función del estímulo y de la proporción y tipo de neuronas que se activan en respuesta a este. Así, la pérdida de este balance en el neocórtex está íntimamente relacionado con la aparición de diversos rasgos conductuales asociados a las enfermedades neuropsiquiátricas¹.

Desarrollo del neocórtex y migración neuronal

El desarrollo del neocórtex (o corticogénesis) es un proceso altamente complejo, debido, principalmente, a la heterogeneidad celular que presenta y a su organización estructural. Durante los estadios más tempranos del desarrollo del SNC, el tubo neural presenta en su región más rostral una estructura llamada telencéfalo, la cual muestra un desarrollo histogénético diferencial en sus porciones nuclear (subpalio) y cortical (palio), siendo el palio el primordio a partir del cual se genera el neocórtex^{1,3}. Así, la corticogénesis comienza en el día 9.5 del desarrollo embrionario murino (9 días después de la fecundación, considerando el día E0.5 como el momento en que se detecta el tapón vaginal en la hembra preñada)¹.

El desarrollo cortical se produce a través de sucesivas etapas de proliferación, migración y diferenciación de los distintos tipos celulares presentes en el neocórtex. Durante el desarrollo temprano, las células neuroepiteliales se organizan en dos capas ubicadas sobre la pared de los ventrículos: la zona ventricular (VZ) y la zona subventricular (SVZ), desde donde se diferencian en neuronas postmitóticas inmaduras (o neuroblastos) entre los días E10.5 y E17.5 del desarrollo murino². Tras ello, los neuroblastos generados migran hacia la región dorsal del palio embrionario en un orden temporal específico, formando en primer

lugar una fina lámina que recibe el nombre de preplaca, la cual, debido a la continua acumulación de neuroblastos, se dividirá en la zona marginal (MZ) en su porción superficial, que dará lugar a la capa I del neocórtex; y en la subplaca (SP) en su porción inferior^{2,5}. En el centro de la preplaca, las neuronas se organizan en capas para conformar la placa cortical (CP), a partir de la cual se desarrollará el futuro neocórtex, de modo que los primeros neuroblastos que alcanzan la CP estructuran las capas más profundas del neocórtex (capas IV-VI) y los neuroblastos generados posteriormente darán lugar a las capas más superficiales del mismo (capas II-III)².

A pesar de que el proceso de desarrollo descrito es común para neuronas piramidales e interneuronas, estas se generan en nichos proliferativos diferentes, por lo que requieren de modos de migración distintos para alcanzar su posición final en la CP. Por un lado, las neuronas piramidales se generan en el palio, accediendo a la CP a través de procesos de migración radial dependientes del contacto con la glía radial. Por otro lado, las interneuronas nacen en diversos nichos proliferativos ubicados en el subpalio, como son las eminencias ganglionares y el área preóptica, desde donde deben migrar tangencialmente, es decir, de forma paralela a la superficie ventricular, sin establecer contacto con la glía radial^{5,6} (**Figura 1A**).

El proceso de migración tangencial ocurre en sucesivas etapas, en las que las interneuronas deben abandonar el nicho proliferativo en el que se originan para ingresar en el palio y alcanzar su posición laminar definitiva en la CP en desarrollo. Para ello, las interneuronas migran hacia su destino siguiendo gradientes de factores guía con acción quimiotrópica que dirigen su salida del subpalio⁵. Una vez alcanzan el palio, las interneuronas se organizan en sucesivas corrientes migratorias para alcanzar la CP entre los días E11-E18, empleando dos rutas de migración tangencial diferentes: una superficial a través de la MZ y la SP, y otra profunda a través de la zona intermedia (IZ) y la SVZ (SVZ/IZ) del palio dorsal, recorriendo en este último caso la IZ, la SP e ingresando finalmente en la CP en desarrollo^{5,6} (**Figura 1A**).

Una vez alcanzan el área del palio dorsal donde deben establecerse, las interneuronas se ven obligadas a modificar su tipo de migración para poder alcanzar la capa correcta dentro de la CP. Por un lado, una subpoblación de interneuronas que migran a través de la IZ emplean un segundo tipo de migración denominada ventrículo-dirigida, por medio de la cual acceden a la VZ para interactuar con la

glía radial presente en la superficie ventricular y obtener así información posicional que les ayude a alcanzar la capa correspondiente⁶ (**Figura 1B**). Por otro lado, las interneuronas que migran a través de la SVZ/IZ ascienden hasta la MZ, ubicada sobre la CP en formación, donde se distribuyen con las interneuronas que migran directamente a través de la MZ⁵⁻⁷. En dicha región, las interneuronas exhiben una migración tangencial multidireccional en la que transitan entre periodos estacionarios y periodos de migración activa, pudiendo moverse tanto de forma dirigida como aleatoria (“*random walk*”), hasta, llegado el momento, descender hacia su capa correspondiente en la CP a través de procesos de migración radial⁷ (**Figura 1A**). Finalmente, las interneuronas alcanzan su posición dentro de la CP en desarrollo, donde maduran y se integran en los microcircuitos corticales correspondientes⁵.

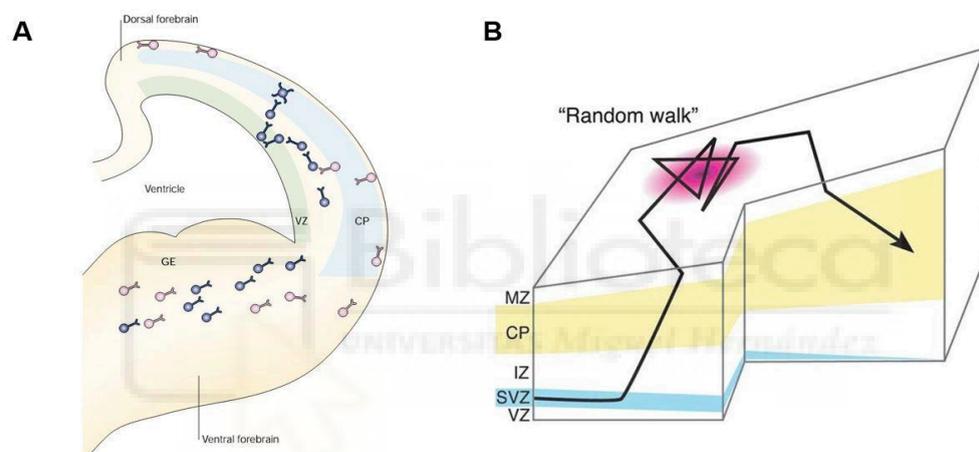


Figura 1. Migración de interneuronas GABAérgicas corticales hacia el neocórtex en desarrollo. (A) Las interneuronas, tras desarrollarse en las eminencias ganglionares (GE) del subpalio, migran tangencialmente a través de corrientes superficiales que recorren la MZ y la SP del palio dorsal (células rosas) así como a través de corrientes más profundas que recorren la IZ y la SVZ (células azules), tras lo cual acceden a la CP en desarrollo. Algunas de las interneuronas que recorren la SVZ/IZ ingresan en la VZ de forma previa a su migración hacia la CP. (B) La mayoría de interneuronas que migran a través de la SVZ/IZ ascienden después hacia la MZ a través de migración radial, se desplazan en el plano tangencial de forma multidireccional (“*random walk*”) y finalmente ingresan en la CP. *Extraído de (A) Nadarajah et al., 2002 y (B) Tanaka et al., 2009.*

En la actualidad, existe una extensa investigación acerca de un conjunto de patologías neuropsiquiátricas conocidas como “*interneuronopatías*”, entre las que se encuentran la lisencefalia ligada al cromosoma X, algunos subtipos de esquizofrenia o el síndrome de Miller-Dieker, causadas por un proceso de migración de interneuronas funcionales deficiente⁵. A nivel molecular, existen diversos genes implicados en su desarrollo, pero nos centraremos en el papel de un único gen: el gen *Lis1*, debido a su relevancia funcional durante la migración neuronal⁸.

El gen *Lis1* y su función en el desarrollo cortical

El gen *PAFAH1B1* (*Lis1* en adelante) es el principal gen asociado a la etiología de la lisencefalia tipo I, una malformación cerebral provocada por una reducción en la migración neuronal que conduce a una alteración profunda de la organización cortical⁸. A nivel clínico, la lisencefalia cursa con retraso mental severo, crisis epilépticas habitualmente intratables, alteraciones motoras, en el aprendizaje y en la memoria; así como una mayor predisposición al desarrollo de trastornos psicóticos, por lo que se estima una esperanza de vida corta para los individuos que la padecen⁹. No obstante, el estado mutacional del gen *Lis1* también ha sido asociado a la etiología de diversos trastornos neuropsiquiátricos de menor gravedad, como son algunas formas poco frecuentes de trastorno bipolar o de esquizofrenia^{10,11}.

El gen *Lis1* está formado por 11 exones, con una región codificante de 1233 pares de bases (pb). El gen está ubicado en el brazo corto del cromosoma 17 humano (cromosoma 17p13.3), en una región conocida como “región crítica de lisencefalia”¹², debido a que, según han demostrado diversos estudios de cartografía genética realizados en pacientes neuropediátricos, concentra múltiples loci necesarios para orquestar el desarrollo del SNC durante la embriogénesis, los cuales son especialmente susceptibles de sufrir mutaciones^{9,12}.

El gen *Lis1* presenta una expresión elevada en el SNC desde el desarrollo embrionario temprano⁹, y su producto génico es una proteína de 46,6 kDa y 410 aminoácidos de longitud, que pertenece a la familia de proteínas WD-40^{9,13}. La función principal de esta familia de proteínas es mediar la formación de complejos multiproteicos que regulan funciones celulares complejas como son el control de la división celular, la determinación del destino celular o el control de la transcripción génica, entre otras¹³. Sin embargo, la función más importante y ampliamente estudiada de LIS1 es la regulación del motor molecular dineína, una proteína de alto peso molecular que estabiliza y controla el comportamiento dinámico de la red de microtúbulos que conforman el citoesqueleto durante los procesos de proliferación y migración neuronal, la integración sináptica y en el transporte axoplasmático^{8,9}.

Para estudiar la función de *Lis1* en el desarrollo cortical, históricamente se han empleado dos modelos animales: una línea que porta un alelo funcional y otro nulo del gen *Lis1*, debido a la delección completa de uno de los dos alelos (*Lis1* +/-); y una segunda línea en la que se ha delecionado el primer exón de uno de los dos alelos

del gen *Lis1*, dando lugar a una proteína LIS1 más corta (*Lis1/sLis1*)¹⁴. La delección homocigótica del gen *Lis1* causa letalidad embrionaria temprana, por lo que el éxito de ambas líneas radica en que los ratones, al ser heterocigotos para la mutación introducida, son viables y fértiles, además de manifestar alteraciones corticales similares a las observadas en pacientes de lisencefalia tipo I^{14,15}.

En la actualidad, los avances en biología molecular han hecho posible el desarrollo de modelos animales más específicos que los anteriores, con los que modificar la expresión de un solo gen en un tipo celular y momento del desarrollo concreto para estudiar su función. Para ello, se emplea la tecnología de recombinación Cre-Lox, con la que se expresa la recombinasa Cre bajo el control de un promotor específico, con el fin de eliminar una secuencia de ADN de interés “floxada” (o flanqueada por dos secuencias *Lox P*)¹⁶. Esta tecnología ha sido empleada para generar el modelo de estudio utilizado en este trabajo, en el cual se ha inactivado la expresión del gen *Lis1* únicamente en interneuronas que expresan somatostatina (o interneuronas SST+) al expresar la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen *Sst*, generando así un ratón mutante *knock-out* (ko) para *Lis1*.

Interneuronas SST+: origen, biología y función

A diferencia de las neuronas piramidales, el conjunto de interneuronas GABAérgicas corticales destaca por exhibir una elevada diversidad de fenotipos morfológicos y propiedades celulares y electrofisiológicas diferentes, lo cual dificulta su categorización en subtipos independientes⁴. Sin embargo, en la actualidad se ha conseguido establecer una clasificación que define tres clases no solapantes de interneuronas en base al marcador neuroquímico que expresan, la cual engloba a la práctica totalidad de las interneuronas GABAérgicas presentes en el neocórtex adulto: las interneuronas que expresan somatostatina (SST+), parvalbúmina (PV+) y la subunidad A del receptor de serotonina 5HT3 (5HT3a+)¹⁷ (**Figura 2**).

Cada clase de interneurona presenta un programa de desarrollo específico. Las interneuronas SST+ y PV+ nacen, mayoritariamente, en la eminencia ganglionar medial (MGE) entre los días E10.5-E16.5 del desarrollo murino, con la diferencia de que las interneuronas SST+ derivan de la división dorsal de la MGE y presentan un pico de desarrollo durante el día E14.5, mientras que las interneuronas PV+ surgen de la división ventral de la MGE y su pico de desarrollo ocurre en el día E15.5^{4,17}. Por

otro lado, las interneuronas 5HT3a+ son consideradas neuronas de desarrollo tardío, ya que nacen en estadios posteriores al día E15.5 en nichos neurogénicos distintos a la MGE, como es el caso de la eminencia ganglionar caudal (CGE)⁴ (**Figura 2**).

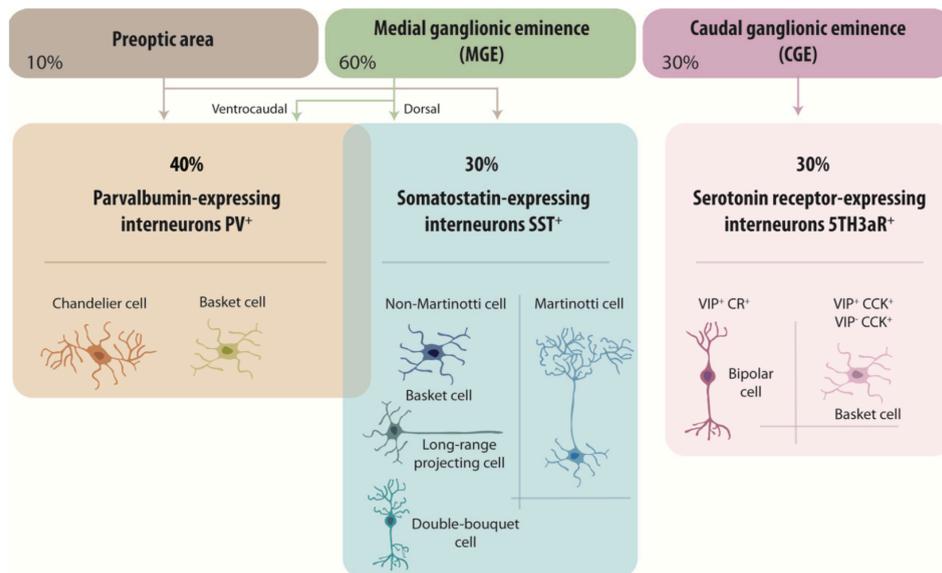


Figura 2. Clasificación de las interneuronas GABAérgicas corticales. Las interneuronas se dividen en tres clases no solapantes que difieren en el marcador neuroquímico que expresan, en su abundancia en el neocórtex y en el nicho proliferativo del que derivan. *Extraído de Mazuir et al., 2021.*

Las interneuronas SST+, objeto de estudio de este trabajo, representan el 30% del total de interneuronas GABAérgicas presentes en el neocórtex y el hipocampo del ratón¹⁷. Estas interneuronas se caracterizan por poseer un axón de proyección local que se extiende dentro del área cortical en que se encuentran para formar sinapsis inhibitorias, así como por expresar un neuropéptido con actividad neuromoduladora e inhibitoria llamado somatostatina (SST), el cual potencia el efecto de GABA en las sinapsis inhibitorias al iniciar su acción más lentamente que GABA y durar su efecto un mayor tiempo^{4,17}. El gen *Sst* comienza a expresarse en interneuronas SST+ a partir del día E13, aumentando su expresión en estadios postnatales¹⁶. Sin embargo, la falta de maduración de la SST durante el desarrollo embrionario y los bajos niveles a los que se expresa en estadios tempranos dificultan su uso como marcador neuroquímico hasta etapas postnatales y adultas^{4,16}.

A nivel funcional, las interneuronas SST+ forman una compleja red que regula la actividad excitatoria de las neuronas piramidales a lo largo del neocórtex, la cual recibe el nombre de **sistema somatostatinérgico**. Estas interneuronas se distribuyen de forma heterogénea en el neocórtex, donde median, principalmente, la inhibición de la actividad excitatoria de las neuronas piramidales de la capa II/III¹⁸.

De esta forma, las interneuronas SST+ son las encargadas de mantener el balance entre activación e inhibición en los circuitos corticales en los que se integran, de modo que la pérdida de este balance puede dar lugar a un fenotipo cognitivo o conductual patológico¹⁸. Sin embargo, dicho fenotipo resultante va a depender del área cortical afectada y de las funciones que medie, de modo que este trabajo ha centrado su atención en el estudio de la corteza cingulada.

Corteza cingulada

La corteza cingulada es una estructura neocortical implicada directamente en el control motor, en la formación de la memoria episódica, en la motivación, en el procesamiento de la información espacial y, en especial, en la vinculación de información de recompensa o castigo al comportamiento, influyendo notablemente en la elección de aquellas acciones que determinan la conducta social¹⁹.

En humanos, la estructura de la corteza cingulada puede dividirse en tres regiones en función de su citoarquitectura y de su patrón de conectividad con otras áreas: la corteza cingulada anterior (ACC) en su porción más rostral, la corteza mediocingulada (MCC) en el tercio intermedio, y la corteza cingulada posterior (PCC) en su porción caudal¹⁹. Sin embargo, los estudios de neuroanatomía actuales concuerdan en que la estructura de la corteza cingulada del ratón presenta diferencias significativas respecto a la de otros mamíferos filogenéticamente superiores, como son la ausencia de una capa IV diferenciada, la existencia de una MCC ubicada dorsalmente respecto a la ACC (en contraposición a la posición caudal que ocupa la MCC respecto a la ACC en humanos) y el desarrollo de una PCC conformada por una única estructura denominada corteza retrosplenial (RSC)²⁰. No obstante, para facilitar el análisis, este estudio ha considerado la MCC como parte de la ACC siguiendo el criterio establecido en las clasificaciones neuroanatómicas convencionales, de modo que sea posible estudiar la estructura de la corteza cingulada de forma integral a través del análisis de la ACC y la RSC (**Figura 3A**).

La ACC es una región de la corteza cingulada formada por las áreas de Broadmann 24, 24', 25 y 32²⁰. Esta estructura presenta un importante número de conexiones recíprocas con el sistema límbico, y en especial con la amígdala y el hipocampo; así como con diferentes estructuras neocorticales, como las cortezas motora y prefrontal¹⁹ (**Figura 3B**). Este hecho le confiere un papel clave en el

procesamiento de la memoria episódica y del aprendizaje acción-resultado, basado en la integración de información emocional para la planificación de conductas^{19,20}.

Por otro lado, la RSC es una región de la corteza cingulada que queda formada por las áreas 29 y 30 de Broadmann en roedores²⁰. La RSC proyecta, al igual que en el caso anterior, hacia diversas estructuras límbicas y neocorticales, siendo importantes las conexiones recíprocas con la región parahipocampal, el hipocampo, la corteza parietal medial y el tálamo límbico¹⁹ (**Figura 3B**). Su función está íntimamente relacionada con la orientación durante el movimiento, con el aprendizaje y con la consolidación de memoria a largo plazo y la memoria espacial¹⁹.

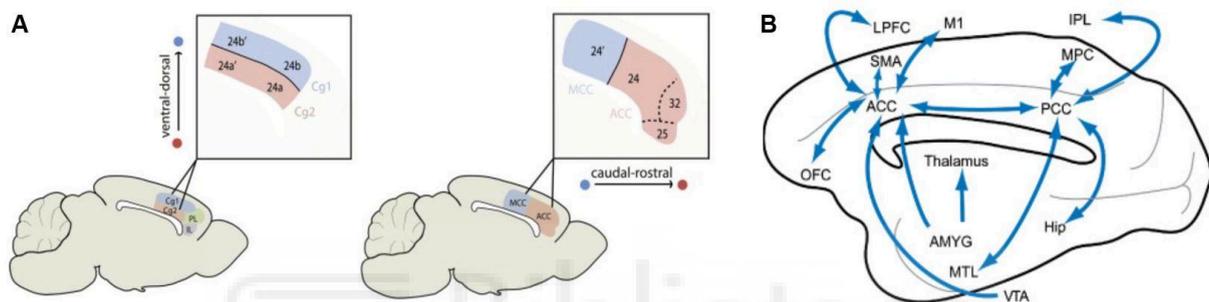


Figura 3. Estructura y función de la corteza cingulada. (A) Interpretación neuroanatómica actual de la estructura de la corteza cingulada (izquierda) e interpretación neuroanatómica convencional (derecha). (B) Conexiones principales de cada región de la corteza cingulada con otras regiones cerebrales. *Extraído de (A) van Heukelum et al., 2020 y (B) Hayden BY & Platt ML, 2009.*

No obstante, el proceso de regionalización del neocórtex se produce de forma paulatina a lo largo del desarrollo cortical, por lo que durante la embriogénesis el palio dorsal se presenta como un conjunto de territorios telencefálicos prospectivos que no adquirirán su identidad definitiva hasta etapas posteriores del desarrollo^{1,2}. Por ello, este trabajo ha analizado la estructura de la corteza cingulada únicamente durante el desarrollo postnatal, mientras que el análisis de la corteza cingulada embrionaria se ha realizado a través del estudio de la estructura del palio dorsal.

Por último, diversos estudios indican que algunos trastornos cognitivos leves y enfermedades neuropsiquiátricas, como la esquizofrenia o la epilepsia, cursan con una pérdida significativa de interneuronas SST+ en la ACC y la RSC, lo cual pone de manifiesto su implicación en la etiología de las entidades clínicas mencionadas²¹⁻²³. Por ello, este trabajo pretende indagar en el papel del gen *Lis1* en la migración y maduración de interneuronas SST+ hacia la corteza cingulada, así como en su posible relación con el desarrollo de un fenotipo estructural y funcional patológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de ratones transgénica

Para realizar los diferentes experimentos, se utilizó una cepa de ratones transgénica denominada SST-*Lis1*-RFP. Esta cepa expresa las siguientes construcciones: SST-*Cre* (donde la recombinasa Cre está regulada por el promotor del gen *Sst*; *Sst*^{tm2.1(cre)Zjh}/*J*, *The Jackson Laboratory*), flox-*Lis1*-flox (gen *Lis1* flanqueado por dos sitios *Lox P*; 129S-*Pafah1b1*^{tm2Aw}, *The Jackson Laboratory*), y CAG-RFP, que codifica para la proteína roja fluorescente (RFP) y se expresa únicamente en presencia de la recombinasa Cre (*B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor*^{tm9(CAG-TDTomato)Hze}/*J*, *The Jackson Laboratory*). En esta última construcción, existe un codón de terminación “aguas arriba” de la secuencia del gen *tdTomato* (RFP) que impide la expresión de RFP en ausencia de Cre. Esta cepa no ha sido descrita previamente en la literatura científica, por lo que en la actualidad no existen datos publicados acerca de su uso.

Los ratones *knock-in* SST-*Lis1*-RFP fueron generados cruzando ratones hembra *Lis1* flox/flox-RFP con ratones macho heterocigotos SST-*Cre*; *Lis1* flox/+, de modo que en la descendencia se obtuvieron ratones *Lis1* flox/flox; Cre/+; RFP+, en los que se eliminó la expresión de las dos copias del gen *Lis1* (grupo mutante *Lis1* SST-ko); y ratones *Lis1* flox/+; Cre/+; RFP+, que mantenían la expresión de una de las dos copias de *Lis1* (ratones control). Asimismo, tanto los ratones del grupo control como los del grupo mutante expresaban la proteína RFP (**Figura 4**).

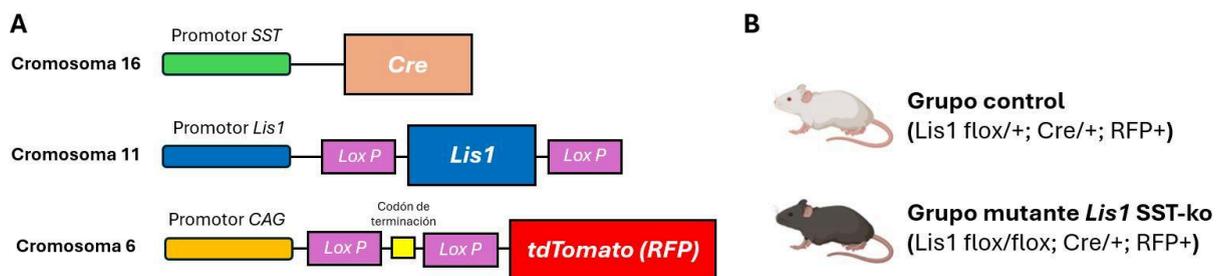


Figura 4. Construcciones génicas empleadas en la generación del modelo animal de estudio. (A) Estructura de las tres construcciones que expresa la cepa murina SST-*Lis1*-RFP, formadas por una secuencia promotora (rectángulos con vértices redondeados), una región codificante (rectángulos grandes con vértices puntiagudos) y las secuencias *Lox P* sobre las que actúa Cre (rectángulos pequeños morados). (B) Genotipo completo de los ratones en función del grupo de estudio.

Todos los animales utilizados en este proyecto fueron mantenidos, manejados y sacrificados según la normativa establecida en la Directiva Española Real Decreto 1201/2005 y la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE, relativas a la protección

de los animales utilizados para fines científicos. Asimismo, de forma previa a la elaboración de este trabajo, la Oficina de Investigación Responsable (OIR) de la Universidad Miguel Hernández de Elche autorizó su realización (**Anexo Figura 1**).

Genotipado de animales transgénicos

Para identificar y discernir entre ratones mutantes y controles se realizó un ensayo de genotipado de todos los animales empleados en el estudio a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite amplificar muestras de ADN directamente extraídas de los animales a través de un proceso iterativo de desnaturalización del ADN, hibridación con cebadores específicos, y elongación y formación de nuevas cadenas de ADN por medio del uso de una ADN polimerasa.

Para realizar la extracción, se obtuvieron muestras biológicas procedentes de la pata de los ratones sacrificados durante el día E16.5 y de la cola de los ratones sacrificados un día después de su nacimiento (día postnatal 1, P1). Cada muestra fue incubada en 100 μ L de NaOH 50 mM en un termobloque en agitación continua durante 25 minutos a 95°C de temperatura, con el fin de provocar la lisis del tejido.

De forma previa a la realización de la PCR, se preparó una disolución madre (o *master-mix*) que contiene todos los reactivos, cofactores y moléculas clave para poder llevar a cabo el ensayo. Para ello, se introdujo en un tubo eppendorf de 1 mL los diferentes componentes: los cebadores *forward* y *reverse* a concentración 10 mM cada uno, así como la disolución Kapa (*Kapabiosystems*, KM5610), que contenía la ADN polimerasa junto con todos los desoxirribonucleótidos trifosfato necesarios para la síntesis del ADN y los cofactores necesarios para el correcto funcionamiento de la ADN polimerasa. De esta forma, para preparar la disolución madre se emplearon 12 μ L de disolución Kapa y 1 μ L de disolución de cebadores por cada muestra biológica a analizar. Las secuencias de los cebadores *forward* y *reverse* empleados para la amplificación de las construcciones génicas SST-Cre y flox-*Lis1*-flox se muestran a continuación: SST Forward (SST FP): 5'-CTGGAAGACATTCACATCCTG-3'; SST Reverse (SST RP): 5'-TATGGCAGCTGTTCCCAATAG-3'; Cre Forward (Cre FP): 5'-CGGTCGATGCAACGAGTGATG-3'; Cre Reverse (Cre RP): 5'-AGCCTGTTTTGCACGTTCCACC-3'; flox-*Lis1*-flox Forward (flox-*Lis1*-flox FP): 5'-TGAATGCATCAGACCATGC-3'; flox-*Lis1*-flox Reverse (flox-*Lis1*-flox RP): 5'-CTCCTACCACTAAAGCTTCTTC-3'.

Una vez preparada y homogeneizada la disolución madre, se introdujeron 13 μL de la misma en cada uno de los tubos de PCR empleados, siendo necesario un tubo por cada animal a genotipar. Por último, se introdujo 1 μL de sobrenadante con ADN procedente del medio de extracción en cada uno de los tubos de PCR. Cada ensayo de genotipado se realizó en presencia de un control positivo, que contenía una muestra de ADN de la cual tenemos la certeza que contiene la región génica a amplificar por PCR; y un control negativo, que contiene agua ultrapura (obtenida por sistema milli-Q) en lugar de la muestra de ADN. Estos controles permiten asegurar que la PCR se ha realizado en las condiciones adecuadas y que no existe contaminación de las muestras a analizar ni de los reactivos empleados. De esta forma, se realizó la PCR siguiendo un programa de temperaturas, tiempos y número de ciclos específico para cada región a amplificar (**Anexo Figura 2**).

Una vez finalizada la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar el resultado de la misma. El gel se preparó previamente diluyendo la agarosa pura en tampón TAE 1x (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M), se calentó hasta su completa disolución y se añadieron 15 μL de Green Safe por cada 100 mL de tampón TAE 1x empleado, dejando enfriar el gel unos 30 minutos hasta su completa solidificación. El Green Safe es un agente que interactúa con el ADN sin intercalarse entre pares de bases, permitiendo la detección del ADN tras la electroforesis al emitir fluorescencia cuando es excitado con luz ultravioleta.

Tras la preparación del gel, se realizó la electroforesis empleando una corriente de 120 V durante 20 minutos para asegurar la correcta separación de las moléculas de ADN por tamaño, observándose el resultado tras exponer el gel a radiación ultravioleta B con una longitud de onda de 312 nm.

Los animales fueron separados en los diferentes grupos de estudio en función del tamaño de las bandas observadas en el gel, puesto que las copias silvestre y mutante de la construcción *flox-Lis1-flox* amplificada presentan un tamaño de 167 pb y de 210 pb, respectivamente; mientras que el tamaño de la copia silvestre y mutante de la construcción *SST-Cre* es de 370 pb y de 320 pb, respectivamente. Así, los animales con al menos una copia silvestre de la construcción *flox-Lis1-flox* fueron incluidos en el grupo control del estudio, mientras que los animales que presentaron las dos copias mutantes para la construcción *flox-Lis1-flox* fueron

incluidos en el grupo mutante. Asimismo, todos los animales debían poseer una copia mutante y otra silvestre de la construcción SST-Cre (**Anexo Figura 3**).

Preparación del tejido y corte de secciones coronales de cerebro

Una vez extraído el cerebro de cada animal, estos se incluyeron en agarosa líquida al 4% en el interior de un molde para obtener un bloque sólido que permita cortar el tejido. Tras preparar el tejido, se realizaron cortes coronales de 40 μm de grosor en un vibratomo Leica VT1000 S, empleando una velocidad de corte 0,175 mm/s y una frecuencia de 50 Hz. Así, los cortes obtenidos fueron recogidos e incluidos en una placa para cultivo celular con fondo plano donde fueron distribuidos en dos series: la serie A y la serie B, de modo que los cortes impares conformaron la serie A y los cortes pares conformaron la serie B. Cada cerebro fue seccionado por completo, depositándose cinco cortes de tejido por pocillo, por lo que el ensayo de inmunofluorescencia se realizó sobre cortes flotantes en disolución. Para evitar que el tejido se secase, todos los pocillos fueron rellenados con PBS.

Este procedimiento se realizó del mismo modo para la preparación del material obtenido del resto de animales, empleándose un total de tres cerebros procedentes de animales control y tres cerebros de animales mutantes por cada estadio analizado. De esta forma, se confeccionaron tres casos de estudio para analizar la migración de interneuronas SST+ a E16.5 y otros tres casos para analizar el día P1, cada uno de ellos conformado por un animal control y por uno mutante.

Ensayo de inmunofluorescencia y montaje de preparaciones

Los ensayos de inmunofluorescencia permiten detectar la expresión de una proteína específica por medio de su marcaje con una sonda fluorescente. Dado que la RFP posee fluorescencia intrínseca, no fue necesario el empleo de técnicas de inmunomarcaje para su detección, por lo que este ensayo se realizó únicamente para detectar la expresión de la SST durante el día P1.

Todos los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron del mismo modo siguiendo un protocolo estándar (**Anexo Figura 4**). Para ello, se escogió una única serie de cortes flotantes y se incubó, en primer lugar, en una disolución de bloqueo formada por tampón fosfato salino (PBS) que contenía un 0,3% del detergente Tritón X-100 (Appllichem), un 5% de albúmina sérica (BSA; Sigma) y lisina al 10% (Sigma)

durante un tiempo mínimo de 90 minutos para evitar que el anticuerpo primario se una al tejido de forma inespecífica. Posteriormente, se retiró la solución de bloqueo y los cortes fueron incubados con un anticuerpo primario policlonal preparado en conejo contra SST (Invitrogen, PA5-85759) diluido en disolución de recuperación DAKO (DAKO, Dinamarca) a una concentración de 1:200. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y los cortes se lavaron durante 30 minutos con una disolución de PBS y detergente Tritón X-100 tamponada con Tris (PBS-T; pH 7,4). Después, los cortes se incubaron con un anticuerpo secundario de clase G (IgG) anti-conejo preparado en burro y conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (*Molecular Probes*, A21206), el cual emite fluorescencia verde al ser excitado con luz a una longitud de onda de 488 nm, diluido en DAKO a una concentración de 1:500. Posteriormente, los cortes fueron nuevamente lavados con PBS-T durante 30 minutos e incubados en una disolución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; *Molecular Probes*) diluido en PBS-T a concentración 1:5000 durante 5 minutos, para contrateñir los núcleos celulares. Por último, los cortes fueron lavados con PBS-T durante 20 minutos y después con PBS durante otros 20 minutos, todo ello en intervalos de 10 minutos.

Una vez finalizado el ensayo de inmunofluorescencia, se procedió al montaje de los cortes procedentes tanto de los animales sacrificados a E16.5 como a P1 sobre portaobjetos de vidrio. Una vez montados, se depositaron unas gotas de medio de montaje Mowiol (Calbiochem)-NPG (Sigma) a una dilución 10:1 sobre cada cubreobjetos y, después, se puso en contacto con los portaobjetos, quedando las preparaciones totalmente sellada y los cortes protegidos. Todas las preparaciones fueron almacenadas en nevera a 4°C de temperatura para su conservación.

Tras finalizar el procedimiento, se empleó un microscopio confocal Leica TCS SPE para obtener imágenes de alta definición del tejido, las cuales fueron analizadas posteriormente a través del software ImageJ (NIH, Estados Unidos).

Cuantificación celular por análisis de imagen: ImageJ

Las imágenes realizadas por microscopía confocal fueron analizadas a través del software ImageJ, con el cual se realizaron contajes celulares de forma manual. Para ello, se escogió en cada cerebro un único corte de una porción anterior y uno de una porción posterior, todas ellas obtenidas al mismo nivel en animales control y mutantes, repitiendo dicho procedimiento en los tres casos a analizar por cada

estadio de desarrollo (**Figura 5**). Las imágenes de cerebros extraídos durante el día E16.5 poseían dos tipos de fluorescencia: azul para núcleos celulares y roja para células que expresan RFP (células RFP+); mientras que las imágenes obtenidas a partir de cerebros extraídos en el día P1 poseían un tercer tipo de fluorescencia: verde para células inmunopositivas para SST (células SST+).

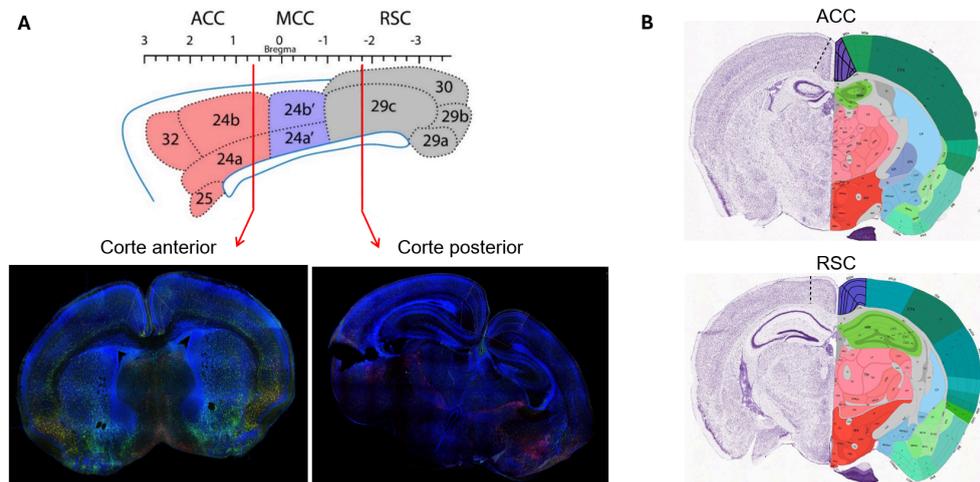


Figura 5. Selección de cortes representativos de la ACC y la RSC en el día P1. (A) Nivel del eje rostrocaudal de la corteza cingulada al que se han realizado los cortes coronales seleccionados para su análisis por inmunofluorescencia, siendo el corte anterior representativo de la ACC (izquierda) y el corte posterior de la RSC (derecha). (B) Imágenes 54/132 (arriba) y 75/132 extraídas del Allen Brain Atlas, empleados para seleccionar los cortes anterior y posterior utilizados para el análisis de la ACC y la RSC, respectivamente, a P1. Las secciones extraídas del Allen Brain Atlas muestran la ACC y la RSC delimitada por una línea discontinua y sombreada en morado.

Posteriormente, el análisis de las imágenes se realizó de diferente forma en función del estadio a analizar, siendo necesario delimitar el área cortical de interés. Por un lado, dado que a E16.5 no es posible delimitar la corteza cingulada en el neocórtex embrionario, se analizó la migración de las interneuronas SST+ a través de todo el palio dorsal embrionario durante el día E16.5, delimitando dentro del palio dorsal todos los estratos que lo conforman: la zona subventricular (SVZ), la zona intermedia (IZ), la subplaca (SP), la placa cortical (CP) y la zona marginal (MZ). Por otro lado, en el caso de los animales sacrificados a P1, se delimitó el área de la ACC en la imagen tomada al corte más rostral y la RSC en la imagen tomada al corte más caudal, haciendo uso del Allen Brain Atlas como material de referencia. Dentro de la ACC y de la RSC, se delimitaron las cuatro capas que conforman su estructura: las capas I, II/III (se consideran como una sola capa), V y VI (**Figura 6**).

Las imágenes fueron separadas por canales y analizadas por separado. En ambos estadios, se realizó un conteo manual de células totales por capas y estratos

de cada una de las imágenes, además de una medición del área de cada una de las capas, obteniendo así valores de células totales, superficie y densidad celular en cada estrato del palio dorsal embrionario (día E16.5) y en cada capa de la CP en formación (día P1). Asimismo, para estudiar la maduración de las interneuronas SST+ en el estadio P1, se calculó la proporción de células SST+ respecto al total de células que expresan la construcción SST-*RFP* (proporción células SST+/RFP+).

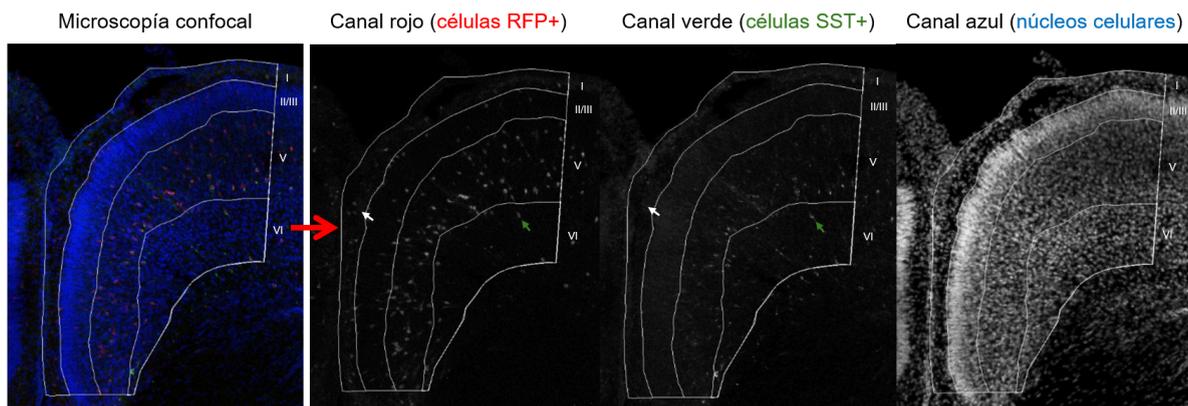


Figura 6. Análisis de imagen por ImageJ. El software ImageJ permite delimitar tanto el área total como el de las capas de una región cerebral (en el caso mostrado se ha hecho con las capas I-VI de la RSC de un ratón del grupo control). Después, las imágenes superpuestas con los tres tipos de fluorescencia se separan por canales (rojo, verde y azul) y se hacen contajes manuales de células RFP+ y SST+ por capas con la función de conteo de ImageJ. En la imagen se muestra una célula que co-expresa RFP y SST (flechas verdes) y un grupo de células que expresan únicamente la proteína RFP, siendo indetectable la presencia de SST (flechas blancas).

Para la realización de este trabajo, se empleó un total de tres animales por cada grupo de estudio y cada estadio: tres ratones en el grupo control y tres ratones en el grupo mutante. Puesto que el neocórtex se divide en dos hemisferios contralaterales, los cuales presentan un desarrollo independiente en un mismo animal, la *N* empleada en este estudio se corresponde con el número total de hemisferios cerebrales analizados en cada grupo, empleándose un total de seis hemisferios en cada estadio del desarrollo (días E16.5 y P1) y en cada grupo de estudio (control y mutante), por lo que $N = 6/\text{grupo de estudio}$ en todos los casos.

Todos los valores expresados representan la media \pm error estándar de la media (SE). Para realizar el análisis estadístico de los resultados se empleó el software Sigma Plot (*Systat Software Inc.*) y la evaluación de la significancia estadística de las diferencias entre grupos se determinó a través de la prueba t-Student. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Los valores de significancia establecidos fueron de $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Las investigaciones realizadas hasta el momento indican que el gen *Lis1* posee un papel crítico en la regulación de los procesos de migración neuronal durante la corticogénesis, siendo fundamental para el mantenimiento de la capacidad migratoria de las interneuronas hacia el neocórtex en desarrollo, de modo que la eliminación de su expresión reduce la velocidad de migración neuronal y provoca disminuciones significativas en la densidad de diversas clases de interneuronas en regiones específicas del cerebro postnatal y adulto, como son la corteza prefrontal medial, el hipocampo o las cortezas entorrinal y perirrinal²³⁻²⁶. Asimismo, el estudio estructural y electrofisiológico de estas regiones muestra una mayor excitabilidad provocada por la pérdida del control inhibitorio que median las interneuronas, las cuales se acompañan de alteraciones en la morfología neuronal y de las proyecciones dendríticas, de reducciones en el número de terminales sinápticos y de una falta de maduración de los microcircuitos corticales^{21,26}.

En este contexto, resulta evidente que la modulación GABAérgica presenta un papel crucial en el mantenimiento del balance entre excitación e inhibición cortical. Sin embargo, existe poca información acerca del efecto que produce la eliminación de la expresión del gen *Lis1* en la migración de cada clase de interneurona hacia la corteza cingulada, lo que dificulta su vinculación con alteraciones funcionales específicas y su aportación al desarrollo de un fenotipo conductual patológico.

Por ello, el objetivo general de este trabajo es analizar el papel del gen *Lis1* en la regulación de la capacidad de migración y maduración de las interneuronas SST+ hacia la ACC y la RSC en un modelo murino mutante selectivo para *Lis1*.

Para alcanzar el objetivo descrito, se han definido 3 objetivos específicos:

- 1) Analizar si existen diferencias en la densidad de interneuronas SST+ a E16.5 en los diferentes estratos del palio dorsal entre los ratones mutantes y los controles.
- 2) Analizar si existen diferencias en la densidad de interneuronas SST+ en cada capa de la ACC y la RSC a P1 entre los ratones mutantes y los controles.
- 3) Analizar si existen diferencias en la maduración de las interneuronas SST+ en cada capa de la ACC y de la RSC a P1 entre ratones mutantes y controles.

RESULTADOS

Estudio de la migración de interneuronas SST+ en el palio dorsal de ratones control y mutantes *Lis1* SST-ko en el día E16.5

En primer lugar, hemos realizado un análisis de la distribución de interneuronas SST+ en el palio dorsal durante el día E16.5 en ratones mutantes *Lis1* SST-ko y en ratones control, con el fin de comprobar si la eliminación de la expresión del gen *Lis1* afecta de algún modo a su migración hacia el neocórtex en desarrollo. Para ello, eliminamos completamente la expresión del gen *Lis1* en las interneuronas SST+ de los ratones *Lis1* SST-ko a través del uso de la construcción SST-Cre, lo cual permitió estudiar la función de *Lis1* durante su migración. Por otro lado, dado que no es posible detectar la SST a través de técnicas de inmunomarcaje a E16.5, analizamos la migración de células que expresaban la construcción SST-RFP en el palio dorsal, ya que esta construcción sólo puede expresarse en interneuronas SST+ tanto de ratones *Lis1* SST-ko como de controles, pudiendo detectarlas por medio de microscopía de fluorescencia al expresar la proteína RFP (células RFP+), que emite fluorescencia roja al ser excitada con luz azul.

Para estudiar la migración de las interneuronas SST+ hacia el neocórtex en desarrollo, determinamos la densidad de células RFP+ en el palio dorsal de ratones control y mutantes *Lis1* SST-ko durante el desarrollo embrionario (día E16.5). Para ello, analizamos un total de seis hemisferios cerebrales por cada grupo de estudio, en los que definimos una región semielíptica en cada hemisferio a lo largo del palio dorsal, ya que este área se corresponde con la principal zona de migración de las interneuronas a E16.5 (**Figura 7A**). Después, delimitamos cada uno de los cinco estratos que conforman el palio dorsal: la zona subventricular (SVZ), la zona intermedia (IZ), la subplaca (SP), la placa cortical (CP) y la zona marginal (MZ); medimos su área, cuantificamos el número de células RFP+ en cada estrato a través del software ImageJ y determinamos su densidad para cada animal de estudio (**Anexo Tabla 1**). Tras ello, calculamos la densidad promedio de células RFP+ para cada estrato del palio dorsal en ambos grupos de estudio y determinamos su variación entre los ratones mutantes *Lis1* SST-ko y los controles (**Figura 7**).

Tras el conteo con ImageJ, los resultados indicaron que las células RFP+ se distribuyeron de forma heterogénea en los diferentes estratos del palio dorsal tanto

en los ratones *Lis1* SST-ko como en los controles, observándose una acumulación especialmente significativa en la MZ y en la SP en ambos grupos de estudio. De hecho, el análisis estadístico de los resultados determinó que estos estratos fueron los únicos que presentaron una reducción significativa en la densidad de células RFP+ ($p < 0,05$) en el caso de los ratones mutantes *Lis1* SST-ko respecto a los controles, con disminuciones del 30,7% en la MZ ($p = 0,005$) y del 35,41% en la SP ($p = 0,01$), ya que las variaciones observadas en la densidad de células RFP+ presentes en la SVZ, la IZ y la CP no fueron significativas ($p < 0,05$) (**Figura 7B**).

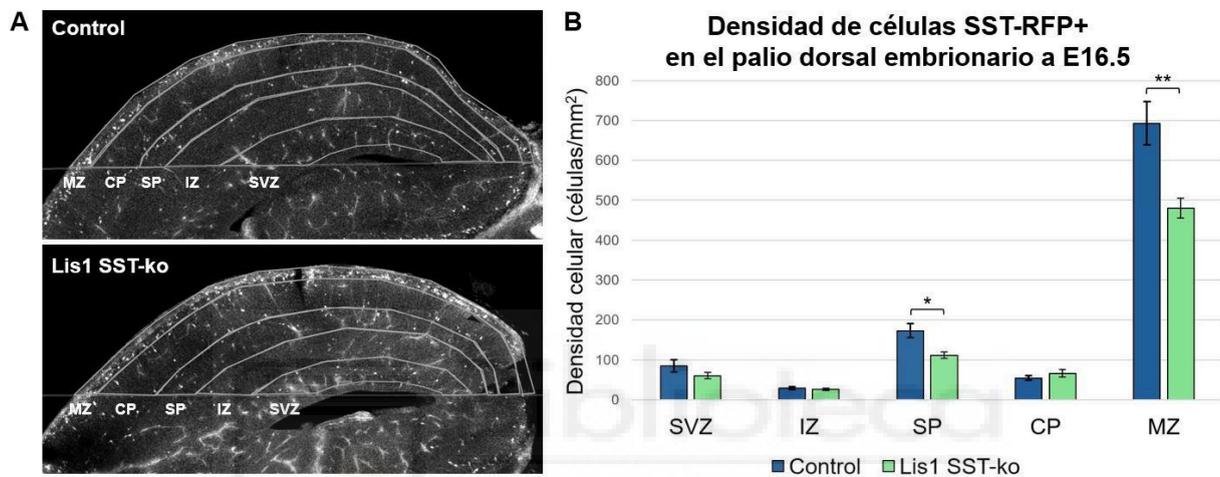


Figura 7. Análisis de la densidad de células RFP+ en el palio dorsal embrionario durante el día E16.5. (A) Sección representativa del palio dorsal durante el día E16.5 que muestra de forma cualitativa la distribución de células RFP+ en el grupo control (arriba) y en el *Lis1* SST-ko (mutante; abajo). (B) El histograma muestra la densidad de células RFP+ en cada estrato del palio dorsal durante el día E16.5 en el grupo control (barras azules, $N = 6$) y en el mutante (barras verdes, $N = 6$). Los valores de densidad de células RFP+ se representan como valores promedio de densidad celular \pm SE expresados en células RFP+/mm², junto con el valor de p correspondiente a la diferencia de las medias: **MZ** (control: $692,98 \pm 54,32$; *Lis1* SST-ko: $480,23 \pm 25,12$; ** $p = 0,006$), **CP** (control: $54,13 \pm 5,99$; *Lis1* SST-ko: $66,15 \pm 9,02$; $p = 0,293$), **SP** (control: $172,59 \pm 17,53$; *Lis1* SST-ko: $111,47 \pm 8,42$; * $p = 0,01$), **IZ** (control: $28,75 \pm 3,62$; *Lis1* SST-ko: $26,12 \pm 3,37$; $p = 0,606$) y **SVZ** (control: $85,16 \pm 15,36$; *Lis1* SST-ko: $59,98 \pm 8,21$; $p = 0,196$). Los valores de significancia estadística establecidos fueron de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Estudio de la distribución y maduración de las interneuronas SST+ en la ACC de ratones control y mutantes *Lis1* SST-ko en el día P1

Una vez analizado el modelo murino a E16.5, procedimos a determinar si existían diferencias en la densidad de células que expresan la construcción SST-RFP en la corteza cingulada entre los ratones mutantes *Lis1* SST-ko y los controles en el día P1, es decir, un día después de su nacimiento. De esta forma, es posible analizar si las interneuronas SST+ (independientemente de su estado de

maduración) que alcanzan la CP durante la embriogénesis son capaces de posicionarse en su capa correspondiente en la corteza cingulada o si por el contrario presentan problemas para alcanzar dicha capa por defectos en su capacidad de migración. En este punto, cabe aclarar que la ACC y la RSC, a pesar de formar la corteza cingulada de manera conjunta, presentan diferencias en su desarrollo y maduración, motivo por el cual se ha decidido analizar cada estructura por separado.

En el caso de la ACC, analizamos un total de seis hemisferios cerebrales en cada grupo de estudio, de modo que seleccionamos en cada hemisferio una sección rostral para su análisis. En cada sección, delimitamos el área correspondiente a la ACC como un área triangular dentro de la corteza cerebral, ubicada a cada lado de la cisura interhemisférica que separa el cerebro en dos hemisferios. Para ello, hicimos uso del Allen Brain Atlas con el fin de establecer los límites anatómicos entre la ACC y otras estructuras adyacentes. Tras ello, delimitamos las cuatro capas que conforman la ACC (capas I, II/III, V y VI), atendiendo a las diferencias de densidad celular que presentan las diferentes capas entre sí y empleando las descripciones del Allen Brain Atlas como guía; medimos el área de cada una de las capas y cuantificamos el número de células que expresan la construcción SST-RFP (células RFP+) y su densidad en cada capa a través del software ImageJ (**Anexo Tabla 2**). Finalmente, calculamos la densidad promedio de células RFP+ en cada capa de la ACC y su variación entre ratones control y mutantes *Lis1* SST-ko (**Figura 8**).

La cuantificación de interneuronas SST+ en la ACC mostró una distribución heterogénea de células RFP+ entre las diferentes capas, con una acumulación especialmente significativa en la capa V tanto de los ratones *Lis1* SST-ko como de los controles; así como una tendencia hacia la reducción en la densidad de células RFP+ en todas las capas de la ACC de los ratones *Lis1* SST-ko. Sin embargo, el análisis estadístico de los resultados indicó que la reducción de la densidad celular solo fue significativa en las capas I, II/III y VI ($p < 0,05$), las cuales presentaron disminuciones de la densidad de células RFP+ del 25,45% en la capa I ($p = 0,009$), del 42,56% en la capa II/III ($p = 0,007$) y del 46,01% en la capa VI ($p = 0,008$), todo ello respecto a los controles; mientras que la densidad de células RFP+ en la capa V no varió de forma significativa entre los grupos de estudio ($p = 0,334$) (**Figura 8B**). Por ello, estos resultados sugieren que el gen *Lis1* puede ser importante para la correcta migración de interneuronas SST+ hacia la ACC.

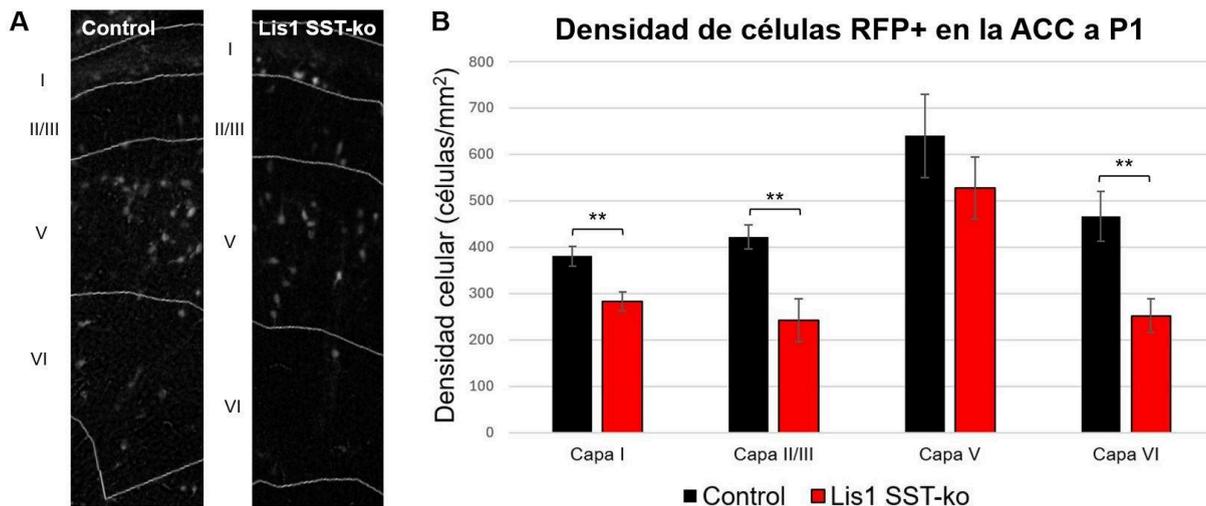


Figura 8. Análisis de la densidad de células RFP+ en la ACC a P1. (A) Sección transversal de la ACC procedente de un ratón del grupo control (izquierda) y del grupo *Lis1* SST-ko (mutante; derecha) en el día P1. (B) El histograma muestra la densidad de células RFP+ en cada capa de la ACC a P1 en el grupo control (barras negras, $N = 6$) y en el mutante *Lis1* SST-ko (barras rojas, $N = 6$). Los valores de densidad de células RFP+ se representan como valores promedio de densidad celular \pm SE expresados en células RFP+/mm², junto con el valor de p correspondiente a la diferencia de las medias: **capa I** (control: $380,4 \pm 21,73$; *Lis1* SST-ko: $283,57 \pm 20,22$; $**p = 0,009$), **capa II/III** (control: $421,97 \pm 25,96$; *Lis1* SST-ko: $242,39 \pm 46,67$; $**p = 0,007$), **capa V** (control: $640,47 \pm 89,57$; *Lis1* SST-ko: $527,06 \pm 66,74$; $p = 0,334$) **capa VI** (control: $466,72 \pm 54,18$; *Lis1* SST-ko: $251,96 \pm 36,41$; $**p = 0,008$). Los valores de significancia establecidos fueron de $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$.

Tras analizar la distribución de las células RFP+ en la ACC, decidimos estudiar el estado de maduración de las interneuronas SST+ en la ACC, puesto que todo tipo neuronal necesita madurar para alcanzar sus propiedades morfológicas, electrofisiológicas y funcionales definitivas, así como para integrarse correctamente en el microcircuito cortical correspondiente⁴. Por ello, resulta interesante determinar si la eliminación de la expresión de *Lis1* afecta a la maduración de las interneuronas SST+ en la ACC, lo cual podría estar vinculado al desarrollo de anomalías en los procesos de inhibición que media el sistema somatostatinérgico en esta estructura.

Continuando con el análisis de la ACC a P1, realizamos un ensayo de inmunofluorescencia con el objetivo de determinar el número de células inmunopositivas para SST (células SST+) y su densidad en cada capa de la ACC a través del software ImageJ, utilizando para ello los mismos cortes empleados anteriormente (**Anexo Tabla 3**). Con estos valores, calculamos la densidad promedio de células SST+ por capas y su variación entre ratones *Lis1* SST-ko y los controles (**Figura 9**).

La cuantificación de células SST+ y el análisis estadístico de los resultados indicaron que los ratones *Lis1* SST-ko presentaban reducciones significativas en la

densidad de células SST+ en las capas II/III y VI ($p < 0,05$), que alcanzaban valores del 43,46% ($p = 0,024$) y del 53,54% ($p = 0,004$), respectivamente. Por otro lado, las variaciones observadas en las capas I ($p = 0,365$) y V ($p = 0,187$) mostraron una tendencia hacia la reducción que carecía de significancia estadística (**Figura 9B**).

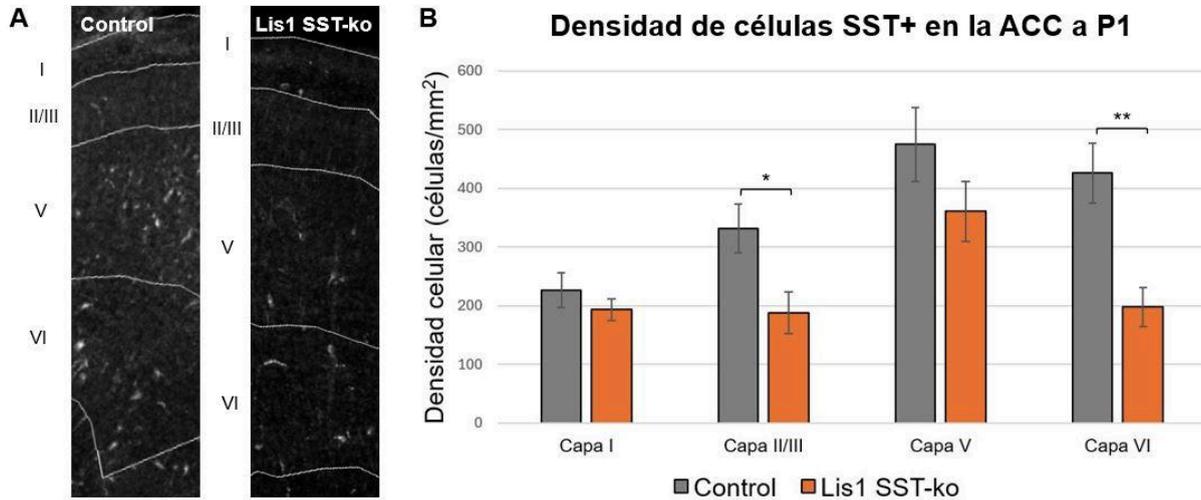


Figura 9. Análisis de la densidad de células SST+ en la ACC a P1. (A) Sección transversal de la ACC procedente de un ratón del grupo control (izquierda) y del grupo *Lis1* SST-ko (mutante; derecha) en el día P1. (B) El histograma muestra la densidad de células SST+ en cada capa de la ACC a P1 en el grupo control (barras grises, $N = 6$) y en el mutante *Lis1* SST-ko (barras naranjas, $N = 6$). Los valores de densidad de células SST+ se representan como valores promedio de densidad celular \pm SE expresados en células SST+/mm², junto con el valor de p correspondiente a las diferencias: **capa I** (control: $226,45 \pm 29,35$; *Lis1* SST-ko: $193,55 \pm 18,48$; $p = 0,365$), **capa II/III** (control: $331,56 \pm 40,83$; *Lis1* SST-ko: $187,48 \pm 35,59$; $*p = 0,024$), **capa V** (control: $474,67 \pm 62,44$; *Lis1* SST-ko: $360,74 \pm 50,77$; $p = 0,187$) y **capa VI** (control: $425,75 \pm 51,68$; *Lis1* SST-ko: $197,79 \pm 33,4$; $**p = 0,004$). Los valores de significancia estadística establecidos fueron de $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$.

No obstante, debemos tener en cuenta que la somatostatina únicamente se sintetiza en células que previamente han comenzado a expresar la construcción SST-RFP, de modo que resulta lógico que los ratones *Lis1* SST-ko presenten valores inferiores tanto en el número como en la densidad de células SST+ respecto a los controles, ya que la densidad de células RFP+ es menor en ratones *Lis1* SST-ko en todas las capas de la ACC. Por ello, un parámetro que puede aportar más información que la variación en la densidad de células SST+ acerca de la tasa de maduración de las interneuronas SST+ en la ACC es la proporción de células que expresan SST respecto al total de células que expresan la construcción SST-RFP, es decir, qué proporción de células RFP+ co-expresan SST y RFP. De esta forma, normalizamos los valores de densidad de células SST+ calculados respecto a la densidad de células RFP+ en cada capa de la ACC (**Anexo Tabla 4**).

Tras calcular la proporción de células SST+/RFP+ en cada capa de la ACC en los ratones *Lis1* SST-ko y los controles, detectamos una reducción significativa del 13,43% en dicha proporción en la capa VI de los ratones *Lis1* SST-ko ($p = 0,006$), mientras que las diferencias observadas en las capas I-V no fueron significativas ($p < 0,05$) (**Figura 10**). Estos resultados sugieren que *Lis1* puede regular específicamente la maduración de las interneuronas SST+ presentes en la capa VI de la ACC.

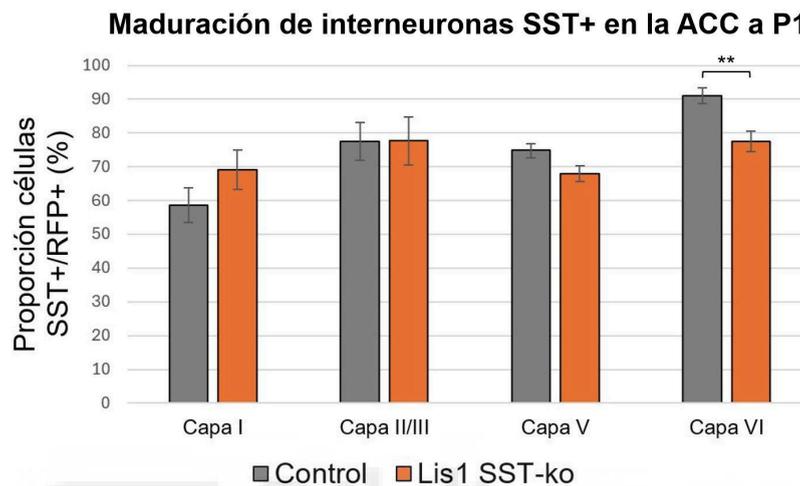


Figura 10. Maduración de interneuronas SST+ en la ACC en el día P1. El histograma muestra la proporción de células que co-expresan SST y RFP respecto al total de células RFP+ (proporción células SST+/RFP+) en cada capa de la ACC a P1 en el grupo control (barras grises, $N = 6$) y en el mutante *Lis1* SST-ko (barras naranjas, $N = 6$). Los valores de proporción de células SST+/RFP+ se expresan como valores porcentuales + SE, junto con el valor de p correspondiente a la diferencia de las medias: **capa I** (control: $58,61 \pm 5,2\%$; *Lis1* SST-ko: $69,07 \pm 5,8\%$; $p = 0,212$), **capa II/III** (control: $77,53 \pm 5,6\%$; *Lis1* SST-ko: $77,72 \pm 7,1\%$; $p = 0,937$), **capa V** (control: $74,82 \pm 2,1\%$; *Lis1* SST-ko: $68,02 \pm 2,3\%$; $p = 0,052$), **capa VI** (control: $90,97 \pm 2,3\%$; *Lis1* SST-ko: $77,54 \pm 3,1\%$; $**p = 0,006$). Los valores de significancia estadística establecidos fueron de $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$.

En resumen, el análisis celular de la ACC a P1 muestra una disminución significativa de la densidad de células RFP+ en las capas I, II/III y VI de los ratones mutantes *Lis1* SST-ko, mientras que la densidad de células SST+ solo se redujo en las capas II/III y VI en los ratones *Lis1* SST-ko en comparación con los controles. Por otro lado, la proporción de células SST+/RFP+ solo mostró una reducción significativa en la capa VI de la ACC de los ratones *Lis1* SST-ko respecto a los controles.

Estudio de la distribución y maduración de las interneuronas SST+ en la RSC de ratones control y mutantes *Lis1* SST-ko en el día P1

Tras analizar la distribución de interneuronas SST+ en la ACC a P1, estudiamos sus procesos de migración y distribución en la RSC en el mismo momento de su desarrollo. Para ello, definimos la RSC como una región rectangular

a cada lado de la cisura interhemisférica en secciones caudales procedentes de seis hemisferios cerebrales por cada grupo de estudio. Con ayuda del Allen Brain Atlas, trazamos nuevamente los límites entre esta estructura y la del resto de estructuras adyacentes, definimos las cuatro capas que conforman la RSC (capas I, II/III, V y VI) siguiendo el mismo criterio que fue empleado para el análisis de la ACC y medimos tanto el área como el número de células RFP+ y su densidad por capas a través de ImageJ (**Anexo Tabla 5**). Finalmente, calculamos la densidad promedio de células RFP+ para cada capa de la RSC y su variación entre grupos de estudio (**Figura 11**).

El análisis de los resultados de la cuantificación de células RFP+ en la RSC mostró una tendencia similar a la observada en la ACC, caracterizada por una distribución heterogénea de células RFP+ y una tendencia hacia la reducción en su densidad en todas las capas de la RSC en los ratones *Lis1* SST-ko en comparación con los controles. Sin embargo, en este caso, la única reducción significativa se observó en la capa II/III, donde la densidad de células RFP+ se redujo un 38,28% ($p = 0,012$), ya que en el resto de capas las diferencias entre grupos de estudio no alcanzaron a ser significativas ($p > 0,05$) (**Figura 11B**). Por ello, nuestros resultados sugieren que las interneuronas SST+ requieren de la expresión de *Lis1* para migrar hacia la RSC, aunque de forma menos dependiente que en el caso de la ACC.

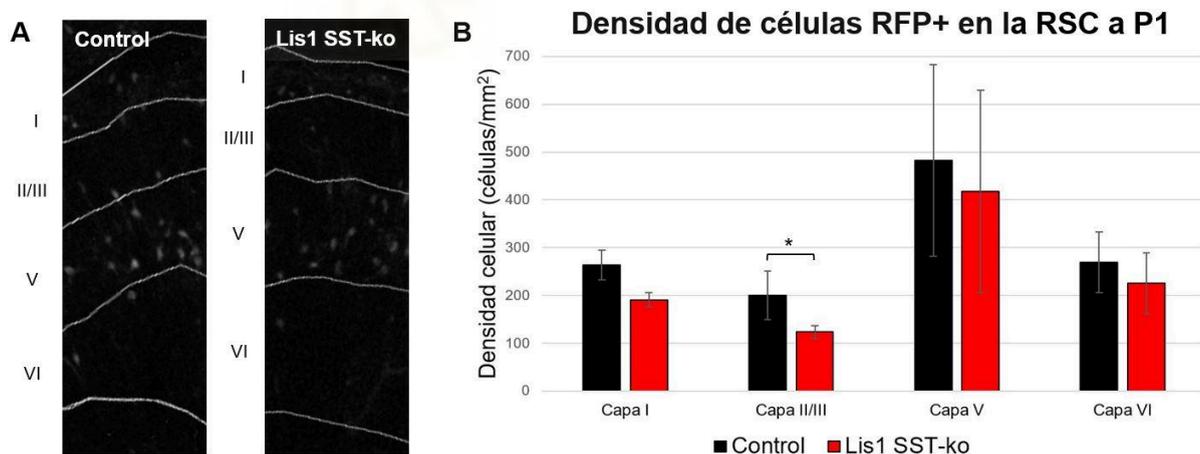


Figura 11. Análisis de la densidad de células RFP+ en la RSC durante el día P1. (A) Sección transversal de la RSC procedente de un ratón del grupo control (izquierda) y del grupo *Lis1* SST-ko (mutante; derecha) en el día P1. (B) El histograma muestra la densidad de células RFP+ en cada capa de la RSC a P1 en el grupo control (barras negras, $N = 6$) y en el mutante (barras rojas, $N = 6$). Los valores de densidad de células RFP+ se representan como valores promedio de densidad celular \pm SE expresados en células RFP+/mm², junto con el valor de p correspondiente a la diferencia de las medias: **capa I** (control: 263,85 \pm 30,96; *Lis1* SST-ko: 190,87 \pm 15,23; $p = 0,065$), **capa II/III** (control: 200,18 \pm 50,71; *Lis1* SST-ko: 123,56 \pm 13,97; $*p = 0,012$), **capa V** (control: 482,39 \pm 200,73; *Lis1* SST-ko: 417,08 \pm 211,64; $p = 0,595$) y **capa VI** (control: 268,94 \pm 63,57; *Lis1* SST-ko: 225,45 \pm 63,29; $p = 0,263$). Los valores de significancia establecidos fueron de $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$.

Tras analizar la distribución de células RFP+ en la RSC, decidimos estudiar la densidad de células que expresan la SST en dicha estructura, del mismo modo que lo hicimos en la ACC. Para ello, cuantificamos el número de células SST+ en cada capa de la RSC a través del software ImageJ tras realizar el ensayo de inmunofluorescencia y obtuvimos sus respectivos valores de densidad celular (**Anexo Tabla 6**). Finalmente, calculamos la densidad promedio de células SST+ para cada capa de la RSC y su variación entre grupos de estudio (**Figura 12**).

El análisis de la distribución de células SST+ en la RSC mostró que estas células se distribuían siguiendo un patrón similar al observado para las células RFP+ en esta misma estructura, ya que la única capa que mostró una reducción significativa en la densidad de células SST+ en los ratones *Lis1* SST-ko fue la capa II/III, con una disminución del 44,32% respecto al grupo control ($p = 0,04$). El resto de capas presentaron una tendencia hacia la reducción en la densidad de células SST+ que no alcanzó a ser significativa en ningún caso ($p > 0,05$) (**Figura 12B**).

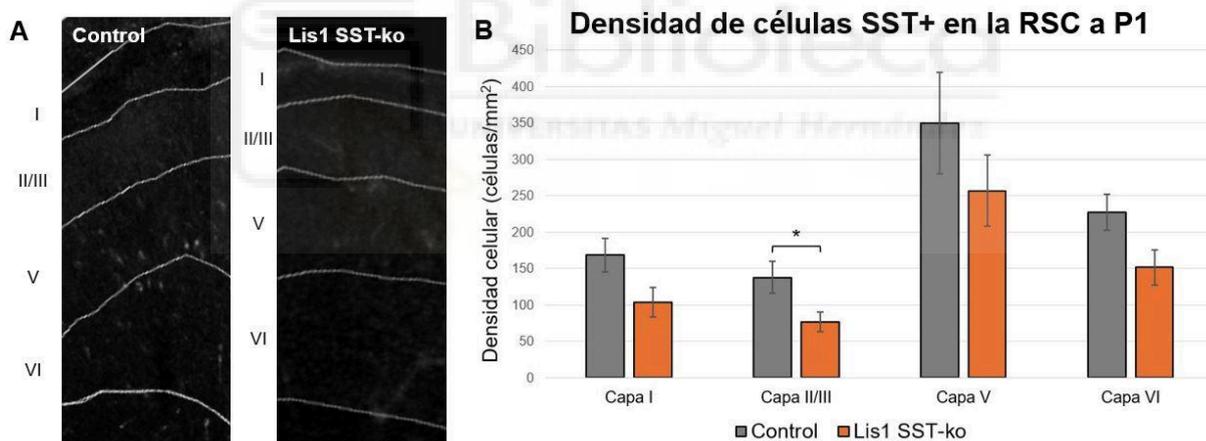


Figura 12. Análisis de la densidad de células SST+ en la RSC a P1. (A) Sección transversal de la RSC procedente de un ratón del grupo control (izquierda) y del grupo *Lis1* SST-ko (mutante; derecha) en el día P1. (B) El histograma muestra la densidad de células SST+ en cada capa de la RSC durante el día P1 en el grupo control (barras grises, $N = 6$) y en el mutante (barras naranjas, $N = 6$). Los valores de densidad de células SST+ se representan como valores promedio de densidad celular \pm SE expresados en células SST+/mm², junto con el valor de p correspondiente a la diferencia de las medias: **capa I** (control: $168,44 \pm 22,83$; *Lis1* SST-ko: $103,63 \pm 20,13$; $p = 0,059$), **capa II/III** (control: $137,56 \pm 21,96$; *Lis1* SST-ko: $76,59 \pm 13,72$; $*p = 0,04$), **capa V** (control: $349,62 \pm 69,54$; *Lis1* SST-ko: $256,95 \pm 49,09$; $p = 0,302$) y **capa VI** (control: $227,46 \pm 24,31$; *Lis1* SST-ko: $151,93 \pm 24,15$; $p = 0,052$). Los valores de significancia establecidos fueron de $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$.

Nuevamente, al igual que hicimos en el análisis de la ACC, normalizamos los valores de densidad de células SST+ calculados para cada capa de la RSC

expresándolos como la proporción de células que co-expresan tanto RFP como SST respecto al total de células RFP+ (proporción células SST+/RFP+) (**Anexo Tabla 7**).

Tras calcular la proporción de células SST+/RFP+ para cada capa de la RSC en ratones control y mutantes *Lis1* SST-ko, detectamos una disminución significativa del 16,92% en de la proporción de células SST+/RFP+ en la capa VI de los ratones *Lis1* SST-ko respecto a los controles ($p = 0,024$), pero no en el resto de capas, donde las diferencias observadas no fueron significativas ($p > 0,05$) (**Figura 13**). Este resultado, en conjunto con el obtenido en la ACC, sugiere que *Lis1* puede ser importante para la maduración de las interneuronas SST+ ubicadas en la capa VI.

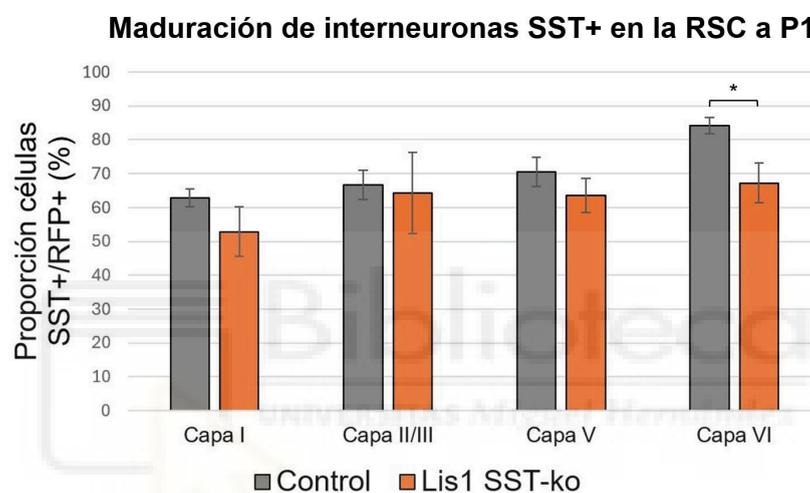


Figura 13. Maduración de interneuronas SST+ en la RSC en el día P1. El histograma muestra la proporción de células que co-expresan SST y RFP respecto al total de células RFP+ (proporción células SST+/RFP+) en cada capa de la RSC a P1 en el grupo control (barras grises, $N = 6$) y en el mutante *Lis1* SST-ko (barras naranjas, $N = 6$). Los valores de proporción de células SST+/RFP+ se expresan como valores porcentuales + SE, junto con el valor de p correspondiente a la diferencia de las medias: **capa I** (control: 62,87 ± 2,6%; *Lis1* SST-ko: 52,86 ± 7,3%; $p = 0,228$), **capa II/III** (control: 66,76 ± 4,3%; *Lis1* SST-ko: 64,29 ± 11,9%; $p = 0,849$), **capa V** (control: 70,47 ± 4,3%; *Lis1* SST-ko: 63,52 ± 5,1%; $p = 0,32$), **capa VI** (control: 84,11 ± 2,4%; *Lis1* SST-ko: 67,19 ± 5,9%; $*p = 0,024$). Los valores de significancia estadística establecidos fueron de $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$.

En definitiva, el análisis celular realizado en la RSC a P1 muestra que los ratones mutantes *Lis1* SST-ko presentan una disminución significativa tanto de la densidad de células RFP+ como de la densidad de células SST+ únicamente en la capa II/III respecto a los controles; mientras que la proporción de células SST+/RFP+, en contraposición con estos resultados, varió únicamente en la capa VI, al igual que ocurre en la ACC.

DISCUSIÓN

***Lis1* regula la migración de las interneuronas SST+ a través de la MZ y la SP en el palio dorsal**

El gen *Lis1* cumple dos funciones importantes durante el desarrollo cortical: mantener los progenitores neurales en proliferación activa y regular la migración neuronal, de modo que la interrupción de su expresión afecta al correcto desarrollo de ambos procesos⁸. Sin embargo, en este estudio se ha eliminado la expresión de *Lis1* en interneuronas postmitóticas, por lo que la proliferación de los progenitores neurales para la generación de interneuronas SST+ no se vio afectada. Por ello, la principal hipótesis que cabe barajar es si la eliminación de la expresión del gen *Lis1* en interneuronas SST+ puede afectar a su migración hacia el palio dorsal a E16.5.

Los resultados obtenidos tras el conteo de células RFP+ en el palio dorsal a E16.5 muestran una reducción significativa en la densidad de interneuronas SST+ en la MZ y la SP del palio dorsal a E16.5, observándose una tendencia a la reducción en el resto de capas salvo en la CP, las cuales no fueron significativas.

Por un lado, las diferencias observadas entre grupos de estudio pueden explicarse en base a los resultados obtenidos en análisis previos de la capacidad migratoria de interneuronas en ratones *Lis1* +/- . Estos estudios informan acerca de alteraciones en los procesos de migración tangencial de interneuronas hacia la CP del palio dorsal durante el desarrollo embrionario, los cuales muestran reducciones superiores al 30% en la velocidad de migración y en las distancias recorridas por parte de interneuronas GABAérgicas totales a E14.5 y E15.5²⁴⁻²⁶, así como aumentos del 26,6% en el tiempo que permanecían pausadas en su migración a E15.5 en comparación con los controles²⁵, lo cual evidencia que *Lis1* es necesario para la migración activa de interneuronas hacia el palio dorsal durante la corticogénesis. Estos trabajos han estudiado la migración de interneuronas con mutaciones en el gen *Lis1* en un contexto en el que todas las células del cerebro presentan la misma mutación, sin demostrar de forma clara si el fenotipo observado es producto de la mutación del gen *Lis1* en las interneuronas, del contexto o de la sinergia entre ambos factores. Nosotros, en este trabajo, eliminamos *Lis1* de forma exclusiva en interneuronas SST+ y demostramos que el papel de *Lis1* es autónomo celular y es requerido para la correcta migración de estas interneuronas.

Por otro lado, el hecho de que la MZ y la SP presenten una mayor densidad de interneuronas SST+ en ambos grupos de estudio puede ser debida al empleo de rutas de migración preferentes en su acceso al palio dorsal. Diversos análisis del comportamiento migratorio de los diferentes tipos de interneuronas han demostrado que las interneuronas SST+, en contraposición a otras clases de interneuronas, se organizan preferentemente en una corriente migratoria que atraviesa la MZ para alcanzar el palio dorsal, mientras que la corriente migratoria subventricular, que guía el acceso de las interneuronas al palio dorsal a través de la SVZ y la IZ, parece presentar un papel secundario en su migración^{4,27}. De hecho, esta última corriente migratoria ha desaparecido en gran medida a E12.5, quedando las interneuronas SST+ dispersas entre la CP y la SP del palio dorsal²⁸, por lo que el aumento relativo en la densidad de interneuronas SST+ observado en la SP a E16.5 respecto a otros estratos probablemente se deba a la acumulación de interneuronas que migran a través de una corriente migratoria superficial así como a través de la SVZ/IZ, las cuales, en este último caso, han abandonado los estratos inferiores del palio dorsal y se encuentran migrando radialmente hacia la CP en formación a través de la SP.

Tal como se ha mencionado, las únicas reducciones en la densidad de interneuronas SST+ que presentan significancia estadística han sido observadas en la MZ y la SP del palio dorsal de los ratones *Lis1* SST-ko a E16.5. De entre las variaciones observadas, la MZ de los ratones *Lis1* SST-ko presenta una disminución más acusada en la densidad de interneuronas SST+ que el resto de estratos del palio dorsal, debido probablemente a que las interneuronas SST+ migran más activamente a través de esta capa a E16.5, lo que explicaría que la eliminación de la expresión de *Lis1* tenga un mayor impacto en la migración neuronal en la MZ. Por otro lado, la reducción en la densidad celular observada en la SP de los ratones *Lis1* SST-ko puede ser debida a un retraso en la migración de las interneuronas SST+ que acceden a la CP a través de la SVZ/IZ, siendo su reducción menos significativa que la observada en la MZ debido a que esta ruta presenta un papel secundario en la migración de las interneuronas SST+ a partir del día E12.5.

En conclusión, las principales diferencias observadas en la densidad de interneuronas SST+ en el palio dorsal se encuentran en aquellos estratos que presentan una migración neuronal más activa a E16.5, como son la MZ y la SP, donde el efecto de la eliminación de la expresión del gen *Lis1* es más acusado.

Lis1 está implicado en la migración de las interneuronas SST+ hacia la corteza cingulada, con un efecto diferencial entre la ACC y la RSC

En los estudios de migración de interneuronas SST+ hacia la corteza cingulada, cuantificamos el número de interneuronas SST+ en cada capa de la ACC y la RSC a P1 en ratones *Lis1* SST-ko y controles para después determinar su densidad celular por capas, con el fin de analizar las diferencias en su distribución entre grupos de estudio. Los resultados obtenidos indican que existe una tendencia a la reducción de la densidad de interneuronas SST+ en todas las capas de la ACC y la RSC, las cuales fueron estadísticamente significativas en las capas I, II/III y VI de la ACC y únicamente en la capa II/III de la RSC de los ratones *Lis1* SST-ko.

Tal como se mencionó anteriormente, la interrupción de la expresión del gen *Lis1* parece estar directamente relacionada con un retraso en la migración tangencial hacia el palio dorsal, la cual se manifiesta como una tendencia a la reducción generalizada en la densidad de interneuronas SST+ en todas las capas de la ACC y la RSC de los ratones *Lis1* SST-ko durante el día P1. Sin embargo, la eliminación de *Lis1* parece tener un efecto diferencial entre ambas regiones cinguladas y entre sus diferentes capas, lo cual puede sugerir que el gen *Lis1* contribuye de forma diferencial a la migración de estas interneuronas hacia cada capa de la ACC y de la RSC, así como a su migración hacia cada una de estas dos regiones.

En el caso de la ACC, la migración de las interneuronas SST+ parece ser dependiente en gran medida de la expresión del gen *Lis1*, provocando reducciones significativas en la densidad de interneuronas SST+ en las capas I, II/III y VI, mientras que la capa V no se vio afectada de forma significativa. Una posibilidad que cabría explorar es que el estudio no cuente con la potencia estadística necesaria para observar una diferencia significativa en dicha capa. Nuestros resultados indican que existe una gran dispersión en los valores de densidad celular obtenidos en la capa V. Por ello, sería recomendable realizar un nuevo estudio con un mayor número de casos (aumentar *N*) para poder así determinar con mayor precisión si *Lis1* regula la migración de las interneuronas SST+ hacia todas las capas de la ACC. Por otro lado, no podemos descartar que las interneuronas SST+ que se integran en la capa V presenten un comportamiento migratorio diferente a las que se posicionan en el resto de capas. En este sentido, se ha comprobado que las células de Martinotti, un subtipo específico de interneuronas SST+, migran preferentemente

hacia la capa V del neocórtex para establecerse en su posición laminar definitiva²⁷. Por ello, cabe la posibilidad de que *Lis1* afecte de forma diferencial a la migración de los distintos subtipos de interneuronas SST+, lo que explicaría que no observemos un fenotipo mutante en la capa V de los ratones *Lis1* SST-ko debido a que las células de Martinotti no presentan anomalías en su migración. No obstante, se requiere un análisis más exhaustivo en el futuro para comprobar esta hipótesis.

En el caso de la RSC, la migración de las interneuronas SST+ parece mostrar una menor dependencia de la expresión del gen *Lis1* que en el caso de la ACC, puesto que la única diferencia significativa en la densidad celular se ha observado en la capa II/III. Tras comparar los valores de densidad celular observados en la ACC y la RSC, comprobamos que la densidad de interneuronas SST+ es menor en la RSC en todas sus capas, lo cual puede dificultar la obtención de un resultado estadísticamente significativo en esta región. Por ello, al igual que en el caso de la ACC, sería interesante analizar un mayor número de casos con el fin de determinar si las reducciones en la densidad celular observadas en las capas I, V y VI son significativas antes de barajar otras hipótesis. A pesar de ello, la falta de resultados significativos en esta región sugiere que las interneuronas SST+ pueden presentar un comportamiento migratorio diferencial hacia la RSC respecto al observado en la ACC, debido a una menor dependencia de la expresión de *Lis1* para su migración o a la existencia de factores capaces de corregir el defecto en la migración provocado por la mutación del gen *Lis1*, lo que explicaría que no observemos un fenotipo estructural mutante y debería ser motivo de análisis en el futuro.

Por último, una hipótesis que no ha sido explorada hasta el momento es si el gen *Lis1* presenta una mayor expresión en la ACC que en la RSC a P1, lo cual podría justificar que observemos una mayor densidad de interneuronas SST+ en todas las capas de la ACC respecto a la RSC y que las reducciones observadas en la ACC sean más significativas que en la RSC. En este sentido, se ha comprobado que *Lis1* presenta una expresión diferencial en los diferentes territorios telencefálicos durante la embriogénesis, aumentando su expresión durante el desarrollo postnatal temprano²⁹. Por ello, sería interesante complementar nuestros resultados con un análisis de expresión del gen *Lis1* en la ACC y la RSC a P1, con el fin de determinar si las diferencias observadas en la densidad de interneuronas SST+ pueden ser causadas por una expresión diferencial de este gen entre ambas regiones.

La eliminación de *Lis1* reduce la maduración de las interneuronas SST+ de la capa VI en la corteza cingulada

Para estudiar la maduración de las interneuronas SST+ que acceden a la ACC y la RSC, se ha determinado la densidad de células SST+ en cada una de sus capas con el objetivo de examinar posibles diferencias en su distribución, ya que la SST es inmunorreactiva únicamente en interneuronas maduras. Dado que la SST solo puede ser detectada en interneuronas que expresan la construcción SST-RFP, se decidió analizar la variación en la proporción de células SST+/RFP+ en cada capa y no la densidad de células SST+, con el fin de normalizar los resultados en base a la densidad de células RFP+ existente, ya que este parámetro tiene en cuenta la pérdida de células RFP+ que se produce en los ratones *Lis1* SST-ko.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que existe una reducción en la proporción de interneuronas SST+ maduras en la capa VI de la ACC y la RSC de los ratones *Lis1* SST-ko en comparación con los controles a P1, lo cual parece indicar que el gen *Lis1* puede ser relevante para la maduración de interneuronas SST+ desde estadios tempranos del desarrollo postnatal.

En la actualidad no existen publicaciones que justifiquen un posible papel del gen *Lis1* en la maduración específica de las interneuronas SST+ de la capa VI en la corteza cingulada. Sin embargo, este resultado puede ser explicado en base a nuestros conocimientos actuales acerca de la corticogénesis y la función que cumple *Lis1* en la formación de circuitos corticales y refinamiento de contactos sinápticos^{8,13}.

Por un lado, las interneuronas SST+ ubicadas en la capa VI son las primeras en generarse y migrar hacia el territorio telencefálico que posteriormente dará lugar a la corteza cingulada, siguiendo el patrón de desarrollo laminar “de dentro hacia fuera” que rige el desarrollo cortical^{1,2}, por lo que es posible que las interneuronas SST+ que alcanzan la capa VI de la corteza cingulada inicien su maduración antes que las que se ubican en las capas superiores de esta estructura. En este sentido, en el caso de que *Lis1* regule de algún modo la maduración neuronal, es posible que podamos observar de forma más clara un defecto en su maduración en la capa VI debido a que este proceso es más prevalente en esta capa que en el resto, lo cual explicaría la reducción en la proporción de células SST+/RFP+ detectada en la capa VI tanto de la ACC como de la RSC de los ratones mutantes *Lis1* SST-ko.

Por otro lado, existen evidencias de que las entradas talamocorticales y la señalización neuromoduladora mediada por diversos neurotransmisores (como la noradrenalina, la dopamina o la acetilcolina), que acceden al neocórtex a través de la capa VI, establecen patrones de actividad que llevan a diversas poblaciones de neuronas corticales a disparar potenciales de acción de forma coordinada^{30,31}. Este fenómeno, conocido como sincronización cortical, cumple un papel importante en el desarrollo de los procesos cognitivos en el cerebro adulto, pero también es fundamental para la maduración neuronal y el establecimiento de contactos sinápticos durante el desarrollo postnatal³¹. Por ello, sería interesante analizar si la reducción en la maduración de las interneuronas SST+ presentes en la capa VI de los ratones *Lis1* SST-ko puede ser debida a que estas interneuronas se ven menos influenciadas por la señalización procedente de otras áreas cerebrales, ya que podría existir una alteración en la comunicación interneuronal en los ratones *Lis1* SST-ko provocada por un defecto en la función que media LIS1 en el transporte axoplasmático, en la arborización dendrítica o en la maduración de circuitos sinápticos.

Las anomalías en la migración de las interneuronas SST+ y su relación con la etiología de los trastornos del neurodesarrollo

Tal como se ha comentado anteriormente, la eliminación del gen *Lis1* da lugar a un espectro de fenotipos de migración neuronal anormal caracterizados por el desarrollo de malformaciones estructurales a nivel cerebral, retraso mental severo, epilepsia, y alteraciones motoras y en el aprendizaje, así como una predisposición a desarrollar trastornos psicóticos^{9,14}. Sin embargo, es difícil determinar el efecto que puede tener la migración aberrante de las interneuronas SST+ en la etiología de los trastornos del neurodesarrollo, aunque sí que existen evidencias que las vinculan con el desarrollo de ciertos rasgos cognitivos y conductuales asociados a estos.

Por un lado, la eliminación de la expresión de *Lis1* ha sido asociada con la etiología de diversos rasgos cognitivos y motores en pacientes de esquizofrenia. Un estudio realizado con ratones mutantes *Lis1/sLis1* observó una reducción significativa en el número de diversas clases de interneuronas en la ACC y el hipocampo, así como un deterioro en las capacidades cognitivas y motoras de los animales, de modo que los autores señalaron que la reducción de la señalización GABAérgica era responsable del fenotipo conductual observado, que es

característico de algunas formas de esquizofrenia²³. Este hecho es relevante, ya que el estudio *post mortem* de cerebros de pacientes de esquizofrenia ha demostrado que existe una reducción tanto en la densidad de interneuronas SST+ como en los niveles de expresión del gen *Sst* en la corteza cingulada de estos pacientes, lo cual ha sido relacionado con un menor rendimiento de la memoria de trabajo²². De forma complementaria, varios estudios de asociación genética han concluido que algunas variaciones de la secuencia del gen *Lis1* pueden ser responsables de la etiología de diversos rasgos conductuales característicos de la esquizofrenia y del trastorno bipolar, de modo que el estudio de dichas variaciones puede ser empleado como un factor predictor de la gravedad del fenotipo conductual manifestado^{10,11}.

Por otro lado, el gen *Lis1* también ha sido vinculado con el desarrollo de la actividad epileptiforme en la corteza cingulada, la cual, a pesar de no formar parte de las crisis epilépticas, está íntimamente relacionada con el deterioro de las funciones cognitivas asociado a las epilepsias infantiles. Un estudio muestra que la corteza cingulada de los ratones *Lis1/sLis1*, cuando se encuentra en condiciones de desinhibición, produce descargas epileptiformes con propiedades electrofisiológicas alteradas, como son una menor frecuencia de postdescargas oscilatorias y una velocidad de propagación menor a lo largo de la capa II/III, lo cual ha sido relacionado con una reducción en la señalización GABAérgica en dicha capa²¹.

Por todo esto, el desarrollo de estrategias terapéuticas encaminadas a compensar la pérdida de expresión de *Lis1* en heterocigosis parece ser una posible vía de desarrollo de tratamientos para los trastornos asociados a la migración neuronal. Diversos estudios realizados con ratones *Lis1 +/-* han comprobado que el tratamiento tanto *in utero* como postnatal con inhibidores farmacológicos de la calpaína, la enzima encargada de la degradación de la proteína LIS1, logró aumentar los niveles de LIS1 y rescató parcialmente el fenotipo cognitivo mutante de los ratones *Lis1 +/-*, mejorando la formación de redes sinápticas, el rendimiento conductual y el deterioro motor^{32,33}; mientras que el defecto en la citoarquitectura cortical solo fue corregido a través del tratamiento durante el desarrollo embrionario³². No obstante, a pesar de que todavía se encuentren en fases muy tempranas de investigación, el desarrollo de terapias dirigidas a corregir los defectos en la migración neuronal asociados a *Lis1* son una pieza clave para el futuro abordaje clínico de la lisencefalia y de otros trastornos neuropsiquiátricos de menor gravedad.

CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Tras analizar y discutir los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir en relación a los objetivos específicos definidos al inicio del trabajo que:

- 1) La eliminación de la expresión del gen *Lis1* en interneuronas SST+ reduce su densidad tanto en la MZ como en la SP del palio dorsal a E16.5.
- 2) La eliminación de *Lis1* en interneuronas SST+ provoca reducciones en su densidad tanto en la ACC como en la RSC, con una magnitud variable en función de la capa y de la región cingulada analizada, ya que las interneuronas SST+ parecen ser más dependientes de *Lis1* para su migración hacia la ACC que hacia la RSC.
- 3) La eliminación de la expresión de *Lis1* en interneuronas SST+ reduce su maduración en la capa VI de la ACC y de la RSC a P1, sin afectar a su maduración en el resto de capas.

De esta forma, la conclusión general del estudio es que la eliminación selectiva de la expresión del gen *Lis1* en interneuronas SST+ provoca anomalías en su migración hacia el palio dorsal a E16.5 y hacia la corteza cingulada a P1, además de producir alteraciones en su maduración durante el desarrollo postnatal temprano.

En lo que respecta a la proyección futura, trabajos posteriores deben profundizar en el papel de *Lis1* en la regulación de la maduración neuronal, en el análisis electrofisiológico de la corteza cingulada de los ratones *Lis1* SST-ko y en la caracterización del fenotipo cognitivo y conductual de dichos animales, con la finalidad de comprobar si el fenotipo estructural observado en los ratones *Lis1* SST-ko se traduce en la aparición de anomalías en las propiedades funcionales de esta estructura, así como en el desarrollo de rasgos conductuales asociados a enfermedades neuropsiquiátricas como la epilepsia o la esquizofrenia. Por ello, el objetivo último de esta línea de investigación es profundizar en nuestra comprensión de la relación existente entre los defectos en la capacidad migratoria de las interneuronas SST+ y la etiología de las enfermedades neuropsiquiátricas o de los rasgos cognitivos y conductuales asociados a ellas, lo cual podría conducir al desarrollo de terapias más específicas para su tratamiento en el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Corteza cerebral: isocórtex y allocórtex; tipos y áreas isocorticales. En: Puelles López L, coordinador. Neuroanatomía. 1ª edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 202-210.
2. Cadwell CR, Bhaduri A, Mostajo-Radji MA, Keefe MG, Nowakowski TJ. Development and Arealization of the Cerebral Cortex. *Neuron*. 2019;103(6):980-1004. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.07.009
3. Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JRL, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(6):427-37. DOI: 10.1038/nrn2151
4. Lim L, Mi D, Llorca A, Marín O. Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron*. 2018;100(2):294-313. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.10.009
5. Marín O, Rubenstein JL. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci*. 2003;26:441-83. DOI: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058
6. Nadarajah B, Parnavelas JG. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(6):423-32. DOI: 10.1038/nrn845
7. Tanaka DH, Yanagida M, Zhu Y, Mikami S, Nagasawa T, Miyazaki J, et al. Random walk behavior of migrating cortical interneurons in the marginal zone: time-lapse analysis in flat-mount cortex. *J Neurosci*. 2009;29(5):1300-11. DOI: 10.1523/jneurosci.5446-08.2009
8. Reiner O, Sapir T. LIS1 functions in normal development and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2013;23(6):951-6. DOI: 10.1016/j.conb.2013.08.001
9. Leventer R. Lissencephaly type I. En: Sarnat HB y Curatolo P, editores. Malformations of the Nervous System: Handbook of Clinical Neurology (Vol. 87). 3ª edición. Amsterdam: Editorial Elsevier; 2008. p. 205-218.
10. Tabarés-Seisdedos R, Escámez T, Martínez-Giménez JA, Balanzá V, Salazar J, Selva G, et al. Variations in genes regulating neuronal migration predict reduced prefrontal cognition in schizophrenia and bipolar subjects from mediterranean Spain. *Neuroscience*. 2006;139(4):1289-300. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.01.054
11. Tabarés-Seisdedos R, Balanzá-Martínez V, Sánchez-Moreno J, Martínez-Aran A, Salazar-Fraile J, Selva-Vera G, et al. Neurocognitive and clinical predictors of functional outcome in patients with schizophrenia and bipolar I disorder at one-year follow-up. *J Affect Disord*. 2008;109(3):286-99. DOI: 10.1016/j.jad.2007.12.234

12. Chong SS, Pack SD, Roschke AV, Tanigami A, Carrozzo R, Smith AC, et al. A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Hum Mol Genet.* 1997;6(2):147-55. DOI: 10.1093/hmg/6.2.147
13. Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature.* 1994;371(6495):297-300. DOI: 10.1038/371297a0
14. Reiner O, Cahana A, Escamez T, Martinez S. LIS1-no more no less. *Mol Psychiatry.* 2002;7(1):12-6. DOI: 10.1038/sj.mp.4000975
15. Cahana A, Escamez T, Nowakowski RS, Hayes NL, Giacobini M, von Holst A, et al. Targeted mutagenesis of Lis1 disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(11):6429-34. DOI: 10.1073/pnas.101122598
16. Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, et al. A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron.* 2011;71(6):995-1013. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.07.026
17. Mazuir E, Fricker D, Sol-Foulon N. Neuron-Oligodendrocyte Communication in Myelination of Cortical GABAergic Cells. *Life (Basel).* 2021;11(3):216. DOI: 10.3390/life11030216
18. Yavorska I, Wehr M. Somatostatin-Expressing Inhibitory Interneurons in Cortical Circuits. *Front Neural Circuits.* 2016;10:76. DOI: 10.3389/fncir.2016.00076
19. Hayden BY, Platt ML. Cingulate cortex. En: Squire LR, editor. *Encyclopedia of Neuroscience.* 1ª edición. San Diego (USA): Editorial Academic Press; 2009. p. 887-892.
20. van Heukelum S, Mars RB, Guthrie M, Buitelaar JK, Beckmann CF, Tiesinga PHE, et al. Where is Cingulate Cortex? A Cross-Species View. *Trends Neurosci.* 2020;43(5):285-99. DOI: 10.1016/j.tins.2020.03.007
21. Domínguez-Sala E, Andreu-Cervera A, Martín-Climent P, Murcia-Ramón R, Martínez S, Geijo-Barrientos E. Properties of the epileptiform activity in the cingulate cortex of a mouse model of LIS1 dysfunction. *Brain Struct Funct.* 2022;227(5):1599-614. DOI: 10.1007/s00429-022-02458-1
22. van Derveer AB, Bastos G, Ferrell AD, Gallimore CG, Greene ML, Holmes JT, et al. A Role for Somatostatin-Positive Interneurons in Neuro-Oscillatory and Information Processing Deficits in Schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2021;47(5):1385-98. DOI: 10.1093/schbul/sbaa184

23. Garcia-Lopez R, Pombero A, Estirado A, Geijo-Barrientos E, Martinez S. Interneuron Heterotopia in the Lis1 Mutant Mouse Cortex Underlies a Structural and Functional Schizophrenia-Like Phenotype. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:693919. DOI: 10.3389/fcell.2021.693919
24. McManus MF, Nasrallah IM, Pancoast MM, Wynshaw-Boris A, Golden JA. Lis1 is necessary for normal non-radial migration of inhibitory interneurons. *Am J Pathol.* 2004;165(3):775-84. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63340-8
25. Nasrallah IM, McManus MF, Pancoast MM, Wynshaw-Boris A, Golden JA. Analysis of non-radial interneuron migration dynamics and its disruption in Lis1^{+/-} mice. *J Comp Neurol.* 2006;496(6):847-58. DOI: 10.1002/cne.20966
26. Gopal PP, Simonet JC, Shapiro W, Golden JA. Leading process branch instability in Lis1^{+/-} nonradially migrating interneurons. *Cereb Cortex.* 2010;20(6):1497-505. DOI: 10.1093/cercor/bhp211
27. Lim L, Pakan JMP, Selten MM, Marques-Smith A, Llorca A, Bae SE, et al. Optimization of interneuron function by direct coupling of cell migration and axonal targeting. *Nat Neurosci.* 2018;21(7):920-31. DOI: 10.1038/s41593-018-0162-9
28. Puelles L, Morales-Delgado N, Merchán P, Castro-Robles B, Martínez-de-la-Torre M, Díaz C, et al. Radial and tangential migration of telencephalic somatostatin neurons originated from the mouse diagonal area. *Brain Struct Funct.* 2016;221(6):3027-65. DOI: 10.1007/s00429-015-1086-8
29. Escamez T, Bahamonde O, Tabares-Seisdedos R, Vieta E, Martinez S, Echevarria D. Developmental dynamics of PFAH1B subunits during mouse brain development. *J Comp Neurol.* 2012;520(17):3877-94. DOI: 10.1002/cne.23128
30. Thomson AM. Neocortical layer 6, a review. *Front Neuroanat.* 2010;4:13. DOI: 10.3389/fnana.2010.00013
31. Mòdol L, Moissidis M, Selten M, Oozeer F, Marín O. Somatostatin interneurons control the timing of developmental desynchronization in cortical networks. *Neuron.* 2024;112(12):2015-30. DOI: 10.1016/j.neuron.2024.03.014
32. Yamada M, Yoshida Y, Mori D, Takitoh T, Kengaku M, Umeshima H, et al. Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly. *Nat Med.* 2009;15(10):1202-7. DOI: 10.1038/nm.2023
33. Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, et al. Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep.* 2013;3:1224. DOI: 10.1038/srep01224

ANEXO



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

Elche, a 6/05/2024

Nombre del tutor/a	RAQUEL GARCÍA LÓPEZ
Nombre del alumno/a	JORGE NAVARRO MIRA
Tipo de actividad	Adherido a un proyecto autorizado
Título del 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)	Estudio de la migración de interneuronas que expresan somatostatina hacia la corteza cingulada en un modelo murino mutante para el gen LIS1
Evaluación de riesgos laborales	No solicitado/No procede
Evaluación ética humanos	No solicitado/No procede
Código provisional	240502083749
Código de autorización COIR	TFG.GFA.RGLJNM.240502
Caducidad	2 años

Se considera que la presente actividad no supone riesgos laborales adicionales a los ya evaluados en el proyecto de investigación al que se adhiere. No obstante, es responsabilidad del tutor/a informar y/o formar al estudiante de los posibles riesgos laborales de la presente actividad.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: **Estudio de la migración de interneuronas que expresan somatostatina hacia la corteza cingulada en un modelo murino mutante para el gen LIS1** ha sido realizada en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere ninguna evaluación adicional. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

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

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Jefe de la Oficina de Investigación Responsable
Vicerrectorado de Investigación y Transferencia

COMITÉ DE ÉTICA E INTEGRIDAD EN LA INVESTIGACIÓN
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Página 1 de 2



Información adicional:

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

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



COMITÉ DE ÉTICA E INTEGRIDAD EN LA INVESTIGACIÓN
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Página 2 de 2

Figura 1. Informe de evaluación de investigación responsable emitido por la Oficina de Investigación Responsable (OIR) de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

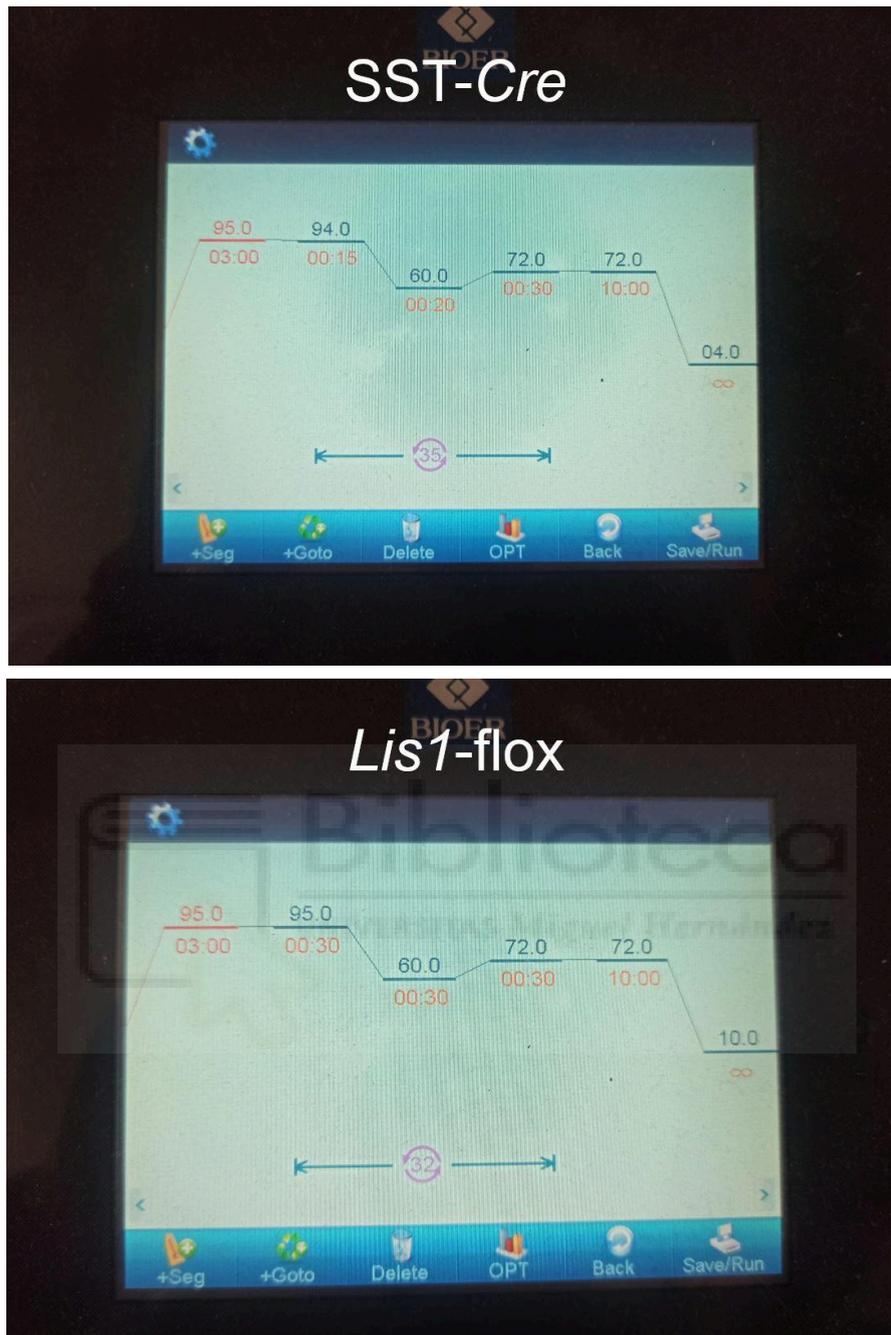


Figura 2. Programas empleados en la amplificación de las construcciones génicas empleadas por PCR. Las imágenes muestran el programa completo de temperaturas y tiempos de duración de cada fase de la PCR, así como el número total de ciclos empleados para la amplificación de regiones génicas presentes en las construcciones SST-Cre (imagen superior) y *Lis1-flox* (imagen inferior). Para la amplificación de la construcción SST-Cre se utilizó un programa de 35 ciclos y para la amplificación de la construcción *Lis1-flox* un programa de 32 ciclos. En cada ciclo se realizó una primera fase de desnaturalización a 94°C, una segunda fase de hibridación de los cebadores a 60°C y, finalmente, una tercera fase de elongación y formación de nuevas cadenas de ADN a 72°C. El tiempo de duración de cada fase varió en función de la construcción génica a amplificar.



Figura 3. Genotipado de la cepa de ratones transgénica. En la imagen se muestra el resultado de un ensayo de genotipado realizado en una muestra de tres animales de estudio (1-3) para las construcciones *SST-Cre* (izquierda) y *Lis1-flox* (derecha). El ensayo permitió determinar el genotipo de cada ratón empleado en el estudio y su asignación a un grupo específico en relación a su genotipo, pudiendo incluirse en el grupo control (*Lis1 flox/+; Cre/+; RFP+*) o en el grupo mutante (*Lis1 flox/flox; Cre/+; RFP+*). La amplificación de la construcción *SST-Cre* produce dos bandas en los animales heterocigotos para *SST-Cre*, una de 370 pb y otra de 320 pb (animal 3); mientras que la aparición de una banda de 370 pb indica que el animal es homocigoto silvestre para la construcción *SST-Cre* (animales 1 y 2). Por otro lado, la amplificación de la construcción *Lis1-flox* produce dos bandas en los animales heterocigotos para *Lis1-flox*, una de 210 pb y otra de 167 pb (animales 2 y 3); mientras que la aparición de una banda de 210 pb indica que el animal es homocigoto mutante para la construcción *Lis1-flox* (animal 1). En el caso mostrado, el animal 3 presenta un genotipo que lo hace apto para su asignación al grupo control (*Lis1 flox/+; Cre/+*), ya que contiene una copia mutante y una silvestre tanto de la secuencia *SST-Cre* como de la secuencia *Lis1-flox*. Como norma general, cada ensayo de genotipado se realizó en presencia de un marcador de peso molecular (PM), formado por un conjunto de moléculas de ADN de tamaño conocido; y de un control positivo (+) y negativo (-).

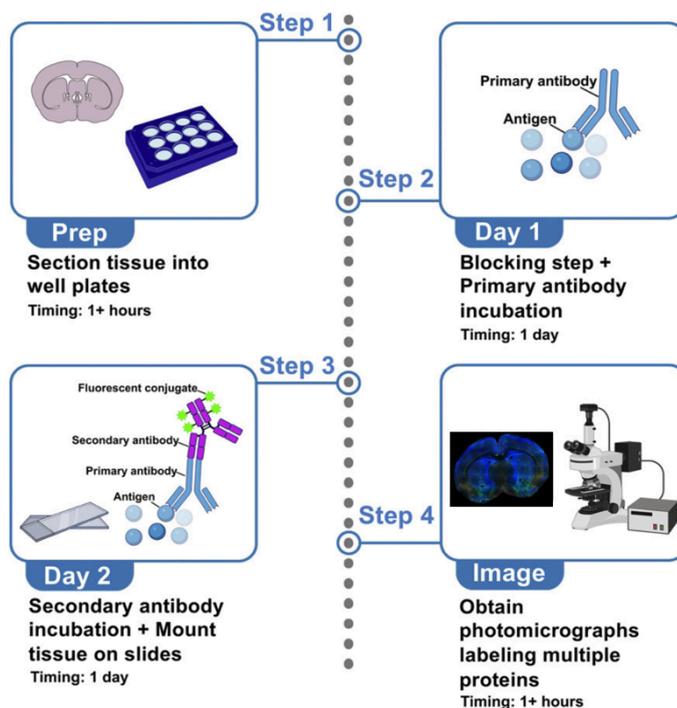


Figura 4. Protocolo del ensayo de inmunofluorescencia empleado. Para la realización de este trabajo, los cerebros se cortaron en secciones de 40 μm de espesor y el total de cortes fue dividido en dos series con el fin de trabajar con una única serie de cortes, los cuales se mantuvieron en suspensión (cortes flotantes; paso 1). Los cortes flotantes fueron incubados en presencia de solución de bloqueo para evitar tinciones inespecíficas y después en presencia de un anticuerpo primario durante toda una noche (paso 2). Al día siguiente, los cortes fueron incubados con un anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo (paso 3) y, finalmente, se obtuvieron las imágenes de alta resolución de los cortes con células inmunopositivas para una proteína específica (somatostatina en este caso) a través de un microscopio confocal (paso 4).

			Zona subventricular (SVZ)			Zona intermedia (IZ)			Subplaca (SP)			Placa cortical (CP)			Zona marginal (MZ)		
			Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)
Grupo control (Lis flox/+; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Sección rostral (hemisferio derecho)	0,114	11	96,491	0,218	10	45,872	0,164	28	170,732	0,214	13	60,748	0,128	110	859,375
		Sección rostral (hemisferio izquierdo)	0,113	16	141,593	0,22	4	18,182	0,135	33	244,444	0,287	28	97,561	0,137	120	875,912
		Sección caudal (hemisferio derecho)	0,102	5	49,020	0,143	5	34,965	0,148	26	175,676	0,193	10	51,813	0,125	92	736,000
		Sección caudal (hemisferio izquierdo)	0,104	14	134,615	0,15	5	33,333	0,105	17	161,905	0,196	9	45,918	0,092	84	913,043
	Caso 2	Sección rostral (hemisferio derecho)	0,18	7	38,889	0,232	4	17,241	0,181	19	104,972	0,326	9	27,607	0,172	77	447,674
		Sección rostral (hemisferio izquierdo)	0,113	9	79,646	0,279	4	14,337	0,137	23	167,883	0,295	12	40,678	0,126	79	626,984
		Sección caudal (hemisferio derecho)	0,121	5	41,322	0,143	2	13,986	0,169	19	112,426	0,226	12	53,097	0,12	83	691,667
		Sección caudal (hemisferio izquierdo)	0,083	9	108,434	0,202	10	49,505	0,155	22	141,935	0,23	7	30,435	0,161	80	496,894
	Caso 3	Sección rostral (hemisferio derecho)	0,119	5	42,017	0,196	6	30,612	0,211	36	170,616	0,279	28	100,358	0,142	97	683,099
		Sección rostral (hemisferio izquierdo)	0,113	11	97,345	0,211	7	33,175	0,188	45	239,362	0,28	15	53,571	0,165	104	630,303
		Sección caudal (hemisferio derecho)	0,074	5	67,568	0,152	6	39,474	0,177	27	152,542	0,212	8	37,736	0,163	93	570,552
		Sección caudal (hemisferio izquierdo)	0,072	9	125,000	0,14	2	14,286	0,105	24	228,571	0,18	9	50,000	0,102	80	784,314
Grupo mutante Lis1 SST-ko (Lis flox/flox; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Sección rostral (hemisferio derecho)	0,083	5	60,241	0,229	8	34,934	0,186	21	112,903	0,273	16	58,608	0,178	78	438,202
		Sección rostral (hemisferio izquierdo)	0,097	3	30,928	0,179	4	22,346	0,137	18	131,387	0,337	17	50,445	0,135	60	444,444
		Sección caudal (hemisferio derecho)	0,056	5	89,286	0,17	4	23,529	0,128	17	132,813	0,244	4	16,393	0,145	81	558,621
		Sección caudal (hemisferio izquierdo)	0,086	6	69,767	0,124	4	32,258	0,134	14	104,478	0,282	16	56,738	0,122	66	540,984
	Caso 2	Sección rostral (hemisferio derecho)	0,108	1	9,259	0,208	5	24,038	0,16	18	112,500	0,256	18	70,313	0,151	70	463,576
		Sección rostral (hemisferio izquierdo)	0,103	4	38,835	0,264	6	22,727	0,146	15	102,740	0,33	25	75,758	0,14	53	378,571
		Sección caudal (hemisferio derecho)	0,096	7	72,917	0,19	4	21,053	0,199	23	115,578	0,247	13	52,632	0,223	78	349,776
		Sección caudal (hemisferio izquierdo)	0,089	3	33,708	0,168	3	17,857	0,155	9	58,065	0,237	15	63,291	0,161	69	428,571
	Caso 3	Sección rostral (hemisferio derecho)	0,076	3	39,474	0,205	7	34,146	0,193	30	155,440	0,295	22	74,576	0,154	90	584,416
		Sección rostral (hemisferio izquierdo)	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto	Tejido roto
		Sección caudal (hemisferio derecho)	0,086	9	104,651	0,18	0	0	0,198	24	121,212	0,221	15	67,873	0,182	91	500,000
		Sección caudal (hemisferio izquierdo)	0,082	7	85,366	0,149	6	40,268	0,147	14	95,238	0,251	26	103,586	0,119	64	537,815

Tabla 1. Datos primarios obtenidos tras el análisis del palio dorsal embrionario a E16.5. Las tabla muestra los valores de área, número de células RFP+ obtenido tras el conteo con ImageJ y el cálculo de la densidad de células RFP+ en cada estrato del palio dorsal de cada una de las secciones (rostral y caudal) y cada hemisferio cerebral de los ratones control (verde) y mutantes *Lis1* SST-ko (azul) de los tres casos de estudio en el estadio E16.5. Los valores de densidad de células RFP+ mostrados fueron empleados para el cálculo del valor promedio de densidad celular en cada estrato del palio dorsal para cada grupo de estudio.

			Capa I			Capa II/III			Capa V			Capa VI		
			Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)
Grupo control (Lis flox/+; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	0,06	22	366,667	0,048	20	416,667	0,088	56	636,364	0,074	39	527,027
		Hemisferio izquierdo	0,058	20	344,828	0,045	16	355,556	0,091	78	857,143	0,063	36	571,429
	Caso 2	Hemisferio derecho	0,017	7	411,765	0,013	5	384,615	0,035	26	742,857	0,017	10	588,235
		Hemisferio izquierdo	0,019	9	473,684	0,014	7	500,000	0,027	23	851,852	0,018	9	500,000
	Caso 3	Hemisferio derecho	0,066	22	333,333	0,044	22	500,000	0,108	41	379,630	0,088	32	363,636
		Hemisferio izquierdo	0,071	25	352,113	0,048	18	375,000	0,104	39	375,000	0,084	21	250,000
Grupo mutante Lis1 SST-ko (Lis flox/flox; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	0,062	15	241,935	0,034	14	411,765	0,065	31	476,923	0,049	12	244,898
		Hemisferio izquierdo	0,058	13	224,138	0,04	13	325,000	0,04	23	575,000	0,053	11	207,547
	Caso 2	Hemisferio derecho	0,025	8	320,000	0,015	3	200,000	0,037	15	405,405	0,016	3	187,500
		Hemisferio izquierdo	0,034	9	264,706	0,018	3	166,667	0,024	20	833,333	0,014	6	428,571
	Caso 3	Hemisferio derecho	0,061	18	295,082	0,035	9	257,143	0,069	33	478,261	0,042	10	238,095
		Hemisferio izquierdo	0,045	16	355,556	0,032	3	93,750	0,061	24	393,443	0,039	8	205,128

Tabla 2. Datos primarios obtenidos tras el conteo de células RFP+ en la ACC a P1. La tabla muestra los valores de área, número de células RFP+ obtenido tras el conteo con ImageJ y densidad de células RFP+ calculada en cada capa de la ACC en ambos hemisferios cerebrales, tanto en los ratones control (verde) como en los mutantes *Lis1* SST-ko (azul) de los tres casos de estudio en el estadio P1. Los valores de densidad de células RFP+ mostrados fueron empleados para el cálculo del valor promedio de densidad celular en cada capa de la ACC para cada grupo de estudio.

			Capa I			Capa II/III			Capa V			Capa VI		
			Área (mm ²)	Nº células SST+	Densidad células SST+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células SST+	Densidad células SST+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células SST+	Densidad células SST+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células SST+	Densidad células SST+ (cél./mm ²)
Grupo control (Lis flox/+; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	0,06	14	233,333	0,048	16	333,333	0,088	42	477,273	0,074	37	500,000
		Hemisferio izquierdo	0,058	13	224,138	0,045	13	288,889	0,091	60	659,341	0,063	31	492,063
	Caso 2	Hemisferio derecho	0,017	5	294,118	0,013	3	230,769	0,035	20	571,429	0,017	9	529,412
		Hemisferio izquierdo	0,019	6	315,789	0,014	7	500,000	0,027	15	555,556	0,018	9	500,000
	Caso 3	Hemisferio derecho	0,066	9	136,364	0,044	17	386,364	0,108	33	305,556	0,088	27	306,818
		Hemisferio izquierdo	0,071	11	154,930	0,048	12	250,000	0,104	29	278,846	0,084	19	226,190
Grupo mutante Lis1 SST-ko (Lis flox/flox; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	0,062	10	161,290	0,034	10	294,118	0,065	21	323,077	0,049	9	183,673
		Hemisferio izquierdo	0,058	10	172,414	0,04	8	200,000	0,04	17	425,000	0,053	8	150,943
	Caso 2	Hemisferio derecho	0,025	7	280,000	0,015	3	200,000	0,037	11	297,297	0,016	2	125,000
		Hemisferio izquierdo	0,034	7	205,882	0,018	2	111,111	0,024	14	583,333	0,014	5	357,143
	Caso 3	Hemisferio derecho	0,061	10	163,934	0,035	9	257,143	0,069	20	289,855	0,042	8	190,476
		Hemisferio izquierdo	0,045	8	177,778	0,032	2	62,500	0,061	15	245,902	0,039	7	179,487

Tabla 3. Datos primarios obtenidos tras el análisis por inmunofluorescencia y conteo de células SST+ en la ACC a P1. La tabla muestra los valores de área, número de células SST+ obtenido tras el conteo con ImageJ y densidad de células SST+ calculada en cada capa de la ACC en ambos hemisferios cerebrales, tanto en los ratones control (verde) como en los mutantes *Lis1* SST-ko (azul) de los tres casos de estudio en el estadio P1. Los valores de densidad de células SST+ mostrados fueron empleados para el cálculo del valor promedio de densidad celular en cada capa de la ACC para cada grupo de estudio.

			Proporción células SST+/RFP+ (%)			
			Capa I	Capa II/III	Capa V	Capa VI
Grupo control (Lis flox/+; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	63,64	80	75	94,87
		Hemisferio izquierdo	65	81,25	76,92	86,11
	Caso 2	Hemisferio derecho	71,43	60	76,92	90
		Hemisferio izquierdo	66,67	100	65,22	100
	Caso 3	Hemisferio derecho	40,91	77,27	80,49	84,38
		Hemisferio izquierdo	44	66,67	74,36	90,48
Grupo mutante Lis1 SST-ko (Lis flox/flox; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	66,67	71,43	67,74	75
		Hemisferio izquierdo	76,92	61,54	73,91	72,73
	Caso 2	Hemisferio derecho	87,5	100	73,33	66,67
		Hemisferio izquierdo	77,78	66,67	70	83,33
	Caso 3	Hemisferio derecho	55,56	100	60,61	80
		Hemisferio izquierdo	50	66,67	62,5	87,5

Tabla 4. Proporción de células SST+/RFP+ en la ACC a P1. La tabla muestra los valores de la proporción de células que co-expresan SST y RFP (células SST+) respecto al total de células que expresan RFP+ (células RFP+) en cada capa de la ACC en ambos hemisferios cerebrales, en cada uno de los ratones control (verde) y mutantes *Lis1* SST-ko (azul) de los tres casos de estudio en el estadio P1. Los valores de proporción de células SST+/RFP+ mostrados fueron empleados para el cálculo del valor promedio de la proporción de células SST+/RFP+ en cada capa de la ACC para cada grupo de estudio.

			Capa I			Capa II/III			Capa V			Capa VI		
			Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células RFP+	Densidad células RFP+ (cél./mm ²)
Grupo control (<i>Lis1</i> flox/+; <i>Cre</i> /+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	0,088	26	295,455	0,064	16	250,000	0,167	77	461,078	0,107	25	233,645
		Hemisferio izquierdo	0,1	27	270,000	0,073	18	246,575	0,166	79	475,904	0,129	38	294,574
	Caso 2	Hemisferio derecho	0,066	21	318,182	0,029	5	172,414	0,087	72	827,586	0,055	17	309,091
		Hemisferio izquierdo	0,052	16	307,692	0,025	6	240,000	0,083	46	554,217	0,058	21	362,069
	Caso 3	Hemisferio derecho	0,097	11	113,402	0,067	10	149,254	0,191	59	308,901	0,124	24	193,548
		Hemisferio izquierdo	0,097	27	278,351	0,063	9	142,857	0,165	44	266,667	0,145	32	220,690
Grupo mutante <i>Lis1</i> SST-ko (<i>Lis1</i> flox/flox; <i>Cre</i> /+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	0,096	13	135,417	0,066	7	106,061	0,16	30	187,500	0,09	10	111,111
		Hemisferio izquierdo	0,083	15	180,723	0,067	5	74,627	0,155	34	219,355	0,107	24	224,299
	Caso 2	Hemisferio derecho	0,064	15	234,375	0,03	4	133,333	0,093	68	731,183	0,062	13	209,677
		Hemisferio izquierdo	0,052	12	230,769	0,025	4	160,000	0,079	45	569,620	0,069	19	275,362
	Caso 3	Hemisferio derecho	0,092	16	173,913	0,062	10	161,290	0,143	47	328,671	0,098	24	244,898
		Hemisferio izquierdo	0,1	19	190,000	0,066	7	106,061	0,133	62	466,165	0,087	25	287,356

Tabla 5. Datos primarios obtenidos tras el conteo de células RFP+ en la RSC a P1. La tabla muestra los valores de área, número de células RFP+ obtenido tras el conteo con ImageJ y densidad de células RFP+ calculada en cada capa de la RSC en ambos hemisferios cerebrales, tanto en los ratones control (verde) como en los mutantes *Lis1* SST-ko (azul) de los tres casos de estudio en el estadio P1. Los valores de densidad de células RFP+ mostrados fueron empleados para el cálculo del valor promedio de densidad celular en cada capa de la RSC para cada grupo de estudio.

			Capa I			Capa II/III			Capa V			Capa VI		
			Área (mm ²)	Nº células SST+	Densidad células SST+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células SST+	Densidad células SST+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células SST+	Densidad células SST+ (cél./mm ²)	Área (mm ²)	Nº células SST+	Densidad células SST+ (cél./mm ²)
Grupo control (Lis flox/+; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	0,088	17	193,182	0,064	12	187,500	0,167	52	311,377	0,107	21	196,262
		Hemisferio izquierdo	0,1	18	180,000	0,073	15	205,479	0,166	57	343,373	0,129	35	271,318
	Caso 2	Hemisferio derecho	0,066	15	227,273	0,029	3	103,448	0,087	52	597,701	0,055	15	272,727
		Hemisferio izquierdo	0,052	9	173,077	0,025	4	160,000	0,083	41	493,976	0,058	17	293,103
	Caso 3	Hemisferio derecho	0,097	6	61,856	0,067	6	89,552	0,191	37	193,717	0,124	18	145,161
		Hemisferio izquierdo	0,097	17	175,258	0,063	5	79,365	0,165	26	157,576	0,145	27	186,207
Grupo mutante Lis1 SST-ko (Lis flox/flox; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	0,096	5	52,083	0,066	2	30,303	0,16	19	118,750	0,09	7	77,778
		Hemisferio izquierdo	0,083	9	108,434	0,067	5	74,627	0,155	22	141,935	0,107	13	121,495
	Caso 2	Hemisferio derecho	0,064	6	93,750	0,03	4	133,333	0,093	37	397,849	0,062	10	161,290
		Hemisferio izquierdo	0,052	10	192,308	0,025	2	80,000	0,079	31	392,405	0,069	16	231,884
	Caso 3	Hemisferio derecho	0,092	6	65,217	0,062	5	80,645	0,143	39	272,727	0,098	11	112,245
		Hemisferio izquierdo	0,1	11	110,000	0,066	4	60,606	0,133	29	218,045	0,087	18	206,897

Tabla 6. Datos primarios obtenidos tras el análisis por inmunofluorescencia y conteo de células SST+ en la RSC a P1. La tabla muestra los valores de área, número de células SST+ obtenido tras el conteo con ImageJ y densidad de células SST+ calculada en cada capa de la RSC en ambos hemisferios cerebrales, tanto en los ratones control (verde) como en los mutantes *Lis1* SST-ko (azul) de los tres casos de estudio en el estadio P1. Los valores de densidad de células SST+ mostrados fueron empleados para el cálculo del valor promedio de densidad celular en cada capa de la RSC para cada grupo de estudio.

			Proporción células SST+/RFP+ (%)			
			Capa I	Capa II/III	Capa V	Capa VI
Grupo control (Lis flox/+; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	65,38	75	67,53	84
		Hemisferio izquierdo	66,67	83,33	72,15	92,11
	Caso 2	Hemisferio derecho	71,43	60	72,22	88,24
		Hemisferio izquierdo	56,25	66,67	89,13	80,95
	Caso 3	Hemisferio derecho	54,55	60	62,71	75
		Hemisferio izquierdo	62,96	55,56	59,09	84,38
Grupo mutante Lis1 SST-ko (Lis flox/flox; Cre/+; RFP+)	Caso 1	Hemisferio derecho	38,46	28,57	63,33	70
		Hemisferio izquierdo	60	100	64,71	54,17
	Caso 2	Hemisferio derecho	40	100	54,41	76,92
		Hemisferio izquierdo	83,33	50	68,89	84,21
	Caso 3	Hemisferio derecho	37,50	50	82,98	45,83
		Hemisferio izquierdo	57,89	57,14	46,77	72

Tabla 7. Proporción de células SST+/RFP+ en la RSC a P1. La tabla muestra los valores de la proporción de células que co-expresan SST y RFP (células SST+) respecto al total de células que expresan RFP+ (células RFP+) en cada capa de la RSC en ambos hemisferios cerebrales, en cada uno de los ratones control (verde) y mutantes *Lis1* SST-ko (azul) de los tres casos de estudio en el estadio P1. Los valores de proporción de células SST+/RFP+ mostrados fueron empleados para el cálculo del valor promedio de la proporción de células SST+/RFP+ en cada capa de la RSC para cada grupo de estudio.