



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE INTERNEURONAS SOMATOSTATINA-POSITIVAS EN EL HIPOCAMPO Y GIRO DENTADO TRAS LA PÉRDIDA DEL GEN *LIS1*

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2026

Autor: Pablo Navarro Mira

Modalidad: Experimental

Tutoras: Raquel García López y Ana Isabel Pombero García

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
La formación hipocampal	4
Citoarquitectura del DG y del hipocampo	6
Conectividad interna del DG y del hipocampo	8
Interneuronas SST+: generalidades, conectividad y funciones	10
Implicación del gen <i>Lis1</i> en el desarrollo del DG y del hipocampo	13
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Animales	17
Genotipado de animales empleados en el estudio	18
Obtención de secciones coronales del hipocampo y DG a P30	20
Marcaje de células SST+ a través de análisis inmunohistoquímico	21
Cuantificación celular a través del software Stereo Investigator	23
RESULTADOS	25
Análisis cuantitativo de interneuronas SST+ en el hilio del DG en ratones control y mutantes <i>Lis1</i> -SST KO a P30	25
Análisis cuantitativo de interneuronas SST+ en el stratum oriens del hipocampo en ratones control y mutantes <i>Lis1</i> -SST KO a P30	28
DISCUSIÓN	31
La pérdida de <i>Lis1</i> es responsable de la reducción de interneuronas SST+ observada en el DG y en el hipocampo durante el desarrollo postnatal	31
La pérdida de <i>Lis1</i> en interneuronas SST+ puede estar vinculada al desarrollo de defectos cognitivos en el desarrollo postnatal	34
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXO	41

RESUMEN

En la actualidad, está bien documentado el papel del gen *Lis1* en el desarrollo neuronal durante estadios embrionarios. Sin embargo, no se ha enfatizado en cómo su expresión aberrante puede alterar el correcto desarrollo de subtipos neuronales específicos tras el nacimiento. En el presente estudio, se ha realizado un análisis cuantitativo de la población de interneuronas somatostatina-positivas (SST+) en el hipocampo y en el giro dentado postnatal de ratones en los que se ha eliminado la expresión del gen *Lis1* exclusivamente en interneuronas SST+ para comprobar si existe afectación en este subtipo neuronal. Nuestros resultados informan acerca de una reducción consistente en el número y en la densidad de interneuronas SST+ en el giro dentado y en el hipocampo tras eliminar la expresión de *Lis1*, lo que sugiere que este gen puede ser necesario para su correcto desarrollo y que su expresión aberrante puede dar lugar a alteraciones funcionales a nivel postnatal potencialmente vinculables a la etiología de rasgos cognitivos asociados a diversos trastornos del neurodesarrollo.

ABSTRACT

Currently, the role of the *Lis1* gene in neuronal development during embryonic stages is well documented. However, insufficient attention has been paid to how its aberrant expression may disrupt the proper postnatal development of specific neuronal subtypes. In the present study, a quantitative analysis of the population of somatostatin-positive (SST+) interneurons in the hippocampus and postnatal dentate gyrus was conducted in mice in which *Lis1* expression was selectively ablated in SST+ interneurons, in order to determine whether this neuronal subtype is affected. Our findings reveal a consistent reduction in both the number and density of SST+ interneurons in the dentate gyrus and hippocampus following the deletion of *Lis1* expression. These results suggest that this gene may be required for the proper development of these interneurons and that its aberrant expression may lead to postnatal functional alterations potentially linked to the etiology of cognitive phenotypes associated with various neurodevelopmental disorders.

Palabras clave: interneuronas SST+, gen *Lis1*, hipocampo, giro dentado, desarrollo postnatal.

INTRODUCCIÓN

La corteza cerebral es la estructura más extensa y funcionalmente compleja presente en el cerebro de los mamíferos superiores, compuesta por cuatro tipos de corteza bien diferenciadas en cuanto a su citoarquitectura y origen: el isocórtex, el mesocórtex y los allocórtex hipocámpico y olfatorio¹. A través de un proceso de regionalización y su posterior desarrollo diferencial, la corteza cerebral queda conformada por estructuras corticales independientes pero ampliamente interconectadas, capaces de trabajar conjuntamente para la ejecución de tareas complejas, como son la planificación de conductas, la interacción con el entorno, el pensamiento o el aprendizaje, entre otras^{1,2}.

En este sentido, este trabajo se centra en el estudio del giro dentado (DG, en adelante) y el hipocampo, que forman parte de una estructura mayor conocida como “formación hipocampal”, cuya función ha sido altamente conservada durante la evolución y su papel es crucial en la mediación de procesos cognitivos de orden superior, de modo que las alteraciones en su estructura durante su desarrollo pueden conducir a trastornos en el neurodesarrollo y a la adquisición de rasgos cognitivos y conductuales asociados a trastornos neuropsiquiátricos².

La formación hipocampal

La formación hipocampal es una estructura alargada con una morfología similar a la de un caballito de mar (derivado del griego, *hippo: caballo; kampos: monstruo marino*), ubicada en la porción medial del lóbulo temporal de la corteza cerebral, que se extiende desde la región septal hasta la corteza temporal a lo largo del eje dorsoventral^{2,3}. Esta estructura, en su conjunto, está implicada en los procesos de aprendizaje, navegación espacial y formación de la memoria³.

La formación hipocampal está conformada por cinco estructuras corticales independientes pero íntimamente interconectadas: el hipocampo, el DG, el complejo subicular y las cortezas entorrinal y parahipocampal, formándose cada una de ellas tras la descomposición y pérdida de continuidad de los territorios prospectivos que conformaban el allocórtex hipocámpico, su estructura de origen, durante el desarrollo embrionario y postnatal² (**Figura 1A**).

A nivel estructural, todas las estructuras que componen la formación hipocampal se dividen en tres capas en su eje radial (**Figura 1B**), mientras que a lo largo de su eje septotemporal algunas estructuras se subdividen en subregiones o sectores en función de diferencias en su citoarquitectura y conectividad². En este sentido, el DG no presenta subdivisiones internas en su estructura, mientras que el hipocampo presenta tres sectores anatómicamente diferenciados denominados CA1, CA2 y CA3 (derivado del griego “*Cornu Ammonis*”, abreviado CA), que muestran diferencias tanto estructurales como en su patrón conectivo^{2,3} (**Figura 1A**). No obstante, el resto de estructuras de la formación hipocampal también presentan diferencias anatómicas internas, pero en este trabajo nos centraremos exclusivamente en la descripción anatómica y estructural del DG y del hipocampo, sus estructuras más estudiadas.

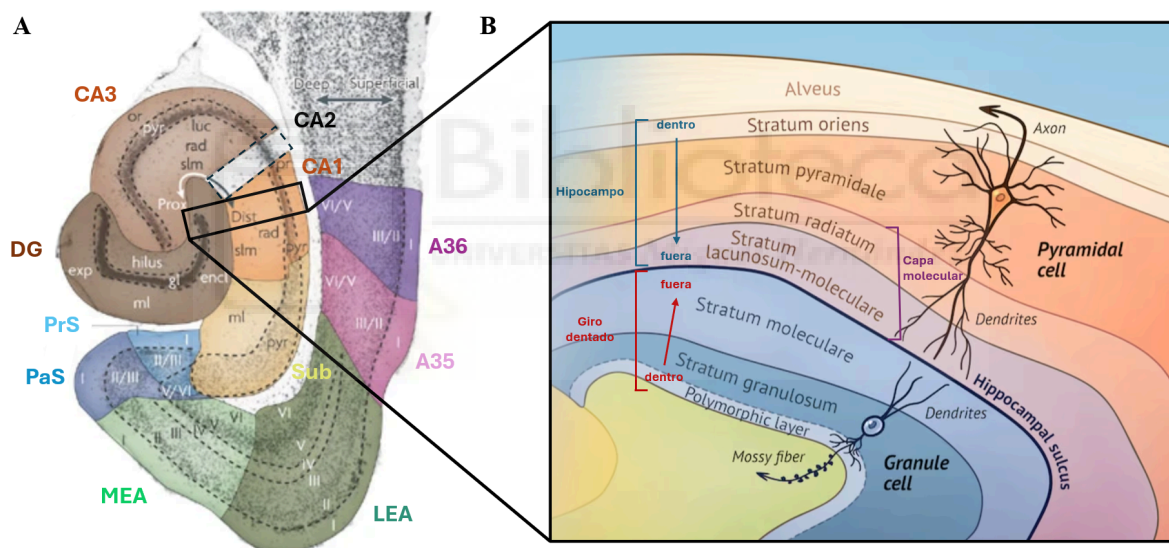


Figura 1. Anatomía de la formación hipocampal. (A) Estructura de la formación hipocampal a lo largo del eje septotemporal, compuesta por cinco estructuras y sus respectivas subregiones: DG, hipocampo (CA1, CA2, CA3), complejo subicular (subículo, Sub; PrS, presubículo; PaS, parasubículo), corteza entorrinal (MEA y LEA, cara medial y lateral de la corteza entorrinal) y corteza perirrinal (A35 y A36, áreas de Brodmann 35 y 36). (B) Esquema general de la estructura laminar del hipocampo y del DG en el eje radial. *Adaptación de Van Strien NM et al., 2009³.*

El DG y el hipocampo se desarrollan a través del posicionamiento e integración sináptica de dos tipos neuronales principales: las neuronas piramidales, que representan el tipo neuronal mayoritario en la formación hipocampal (85-90%), se caracterizan por formar sinapsis excitatorias en las que liberan el neurotransmisor glutamato, así como por formar largas conexiones con otras áreas cerebrales distales a través de la proyección de sus axones; y las

interneuronas GABAérgicas (10-15% del total de neuronas) se caracterizan por formar conexiones locales con neuronas cercanas dentro de la misma estructura en la que se alojan, estableciendo sinapsis inhibitorias en las que liberan el ácido γ -aminobutírico (GABA) como principal neurotransmisor^{1,4}.

Así, el correcto posicionamiento e integración sináptica de estos dos tipos neuronales en la formación hipocampal da como resultado la formación de circuitos corticales locales, en los que la actividad excitatoria de las neuronas piramidales es finamente regulada por la acción de las interneuronas, lo que establece un balance entre estímulos excitatorios e inhibitorios (balance E/I, en adelante) que rige la funcionalidad de la estructura en su conjunto^{1,4}.

Los circuitos corticales representan la unidad funcional básica para el procesamiento de la información en la formación hipocampal^{1,4}. Sin embargo, el DG y el hipocampo presentan diferencias en su organización tanto celular como estructural que condicionan su arquitectura, tal como veremos a continuación.

Citoarquitectura del DG y del hipocampo

El DG y el hipocampo presentan estructuras laminares altamente organizadas, formadas en ambos casos por tres capas debido a su origen embrionario común^{2,5} (**Figura 1B**). Las capas que conforman estas estructuras presentan una citoarquitectura similar, aunque existen diversas diferencias en su organización celular y en su conectividad que debemos tener en cuenta^{2,5}.

En este sentido, tanto el DG como el hipocampo están constituidos, siguiendo un orden de fuera hacia dentro, por una capa molecular, que es fundamentalmente acelular (de ahí su nombre) y se caracteriza por representar una interfaz de contacto entre las neuronas piramidales de estas estructuras con otras áreas cerebrales; una capa piramidal, que contiene la práctica totalidad de las neuronas piramidales presentes en cada estructura; y una capa polimórfica, en la que se encuentran las interneuronas GABAérgicas junto con las fibras de los axones que son proyectados hacia el DG y el hipocampo^{2,5} (**Figura 1B**).

En cuanto a las diferencias individuales, la capa piramidal del hipocampo presenta una elevada similitud estructural con la del DG, con neuronas

piramidales densamente empaquetadas que extienden sus dendritas apicales en la capa molecular superior y sus dendritas basales en la capa polimórfica inferior, donde arborizan profusamente^{2,5} (**Figura 2**). No obstante, en el caso del DG, la capa piramidal se denomina “capa granular”, debido a que sus neuronas piramidales presentan modificaciones estructurales por las que reciben el nombre de “células granulares”, caracterizadas por poseer un pequeño soma elíptico y un axón ampliamente ramificado denominado “fibra musgosa”² (**Figura 1B**).

Por otro lado, la capa molecular superficial aloja las dendritas apicales de las neuronas piramidales presentes en la capa inmediatamente inferior. Sin embargo, mientras que la capa molecular del DG presenta un único estrato, la del hipocampo presenta una organización anatómica más compleja, ya que se subdivide en tres estratos diferentes: el *stratum lacunosum-moleculare*, *radiatum* y *lucidum*, siguiendo un orden de fuera hacia dentro; de modo que cada estrato recibe aferencias diferentes de otras áreas corticales^{2,3,5} (**Figura 1B, Figura 2**). Las aferencias más relevantes desde el punto de vista funcional se proyectan desde el DG hacia el *stratum lucidum* y de la región septal hacia el *stratum lacunosum-moleculare*^{2,5}. Cabe remarcar que el *stratum lucidum* solo se distingue en el sector CA3 del hipocampo, por lo que, dado que las células granulares del DG proyectan sus axones exclusivamente hacia este estrato, CA3 representa el principal punto de comunicación entre el DG y el hipocampo^{2,5} (**Figura 2**).

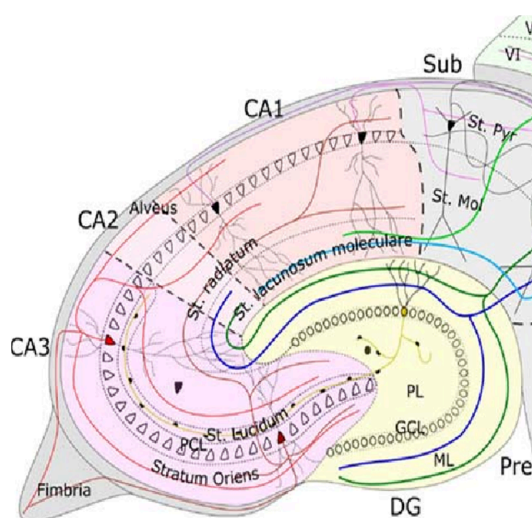


Figura 2. Citoarquitectura del DG y del hipocampo. Representación de la estructura del DG y del hipocampo (CA1-CA3), con sus respectivas capas y las subdivisiones internas del hipocampo. Las neuronas piramidales se ubican en la capa piramidal (PLC) del hipocampo y las células granulares en la capa granular del DG (GLC), desde donde distribuyen sus dendritas apicales en los estratos superficiales y las dendritas basales en el *stratum oriens* del hipocampo y en el hilio (PL) del DG. En el sector CA3, se observan los axones proyectados por las células granulares del DG (línea amarilla) accediendo al *stratum lucidum* para sinaptar con las neuronas piramidales presentes en su capa piramidal. Adaptación de Becker S, 2016⁵.

Por último, la capa polimórfica se encuentra situada en la porción basal del hipocampo y del DG. Esta capa recibe un nombre diferente en cada estructura:

hilio en el DG y *stratum oriens* en el hipocampo. En ellas, encontramos las dendritas basales de las neuronas piramidales presentes en la capa superior junto a una amplia variedad de subtipos de interneuronas inhibitorias² (**Figura 2**). Asimismo, estas capas reciben múltiples aferencias procedentes de estructuras subcorticales capaces de modular el balance E/I del DG y del hipocampo, entre las que podemos destacar por su relevancia funcional las proyecciones procedentes de la región septal, del tronco del encéfalo y del hipotálamo^{2,5}.

A nivel morfológico, cabe puntualizar que el hipocampo se presenta como una lámina cortical plegada sobre sí misma, mientras que el DG forma una lámina en forma de U que se pliega en torno al sector CA3 del hipocampo (**Figura 1A, Figura 2**), lo que provoca que, a pesar de que el *stratum oriens* se ubique en la porción más basal del hipocampo, aparentemente parezca que se trata de su capa más superficial, tal como ilustra la **Figura 1B**^{3,5}. Esta disposición en que se encuentran el DG y el hipocampo proporciona un íntimo contacto entre ambas estructuras, lo que facilita su comunicación a través de la formación de un circuito interno que recibe el nombre del “circuito trisináptico del hipocampo”.

Conectividad interna del DG y del hipocampo

El circuito trisináptico del hipocampo constituye la principal vía de entrada al hipocampo de la información procedente de las áreas corticales superiores para su procesamiento. En él, la información fluye de forma unidireccional para su procesamiento desde la corteza entorrinal hacia el sector CA1 del hipocampo a través de tres contactos sinápticos secuenciales producidos, en orden cronológico, a nivel del DG, de CA3 y de CA1 en el hipocampo^{5,6} (**Figura 3**).

En el circuito trisináptico, la corteza entorrinal recibe la información sensorial y espaciotemporal múltiple a través de aferencias tanto directas como indirectas procedentes de diversas estructuras isocorticales, como son la corteza prefrontal, visual, olfatoria o auditiva, convirtiendo a la corteza entorrinal en un área asociativa plurimodal que se encarga de proyectar toda esta información superpuesta hacia el DG y, en menor medida, hacia los sectores CA3 y CA1 del hipocampo, formando un tracto axonal denominado “vía perforante”^{2,3,6}.

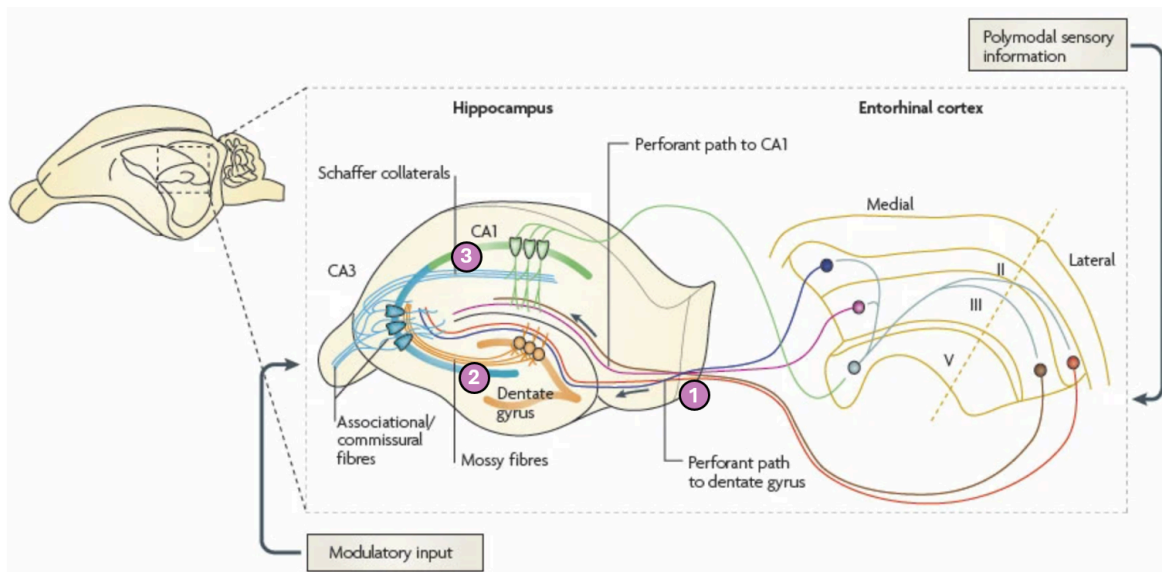


Figura 3. Circuito trisináptico del hipocampo. El esquema muestra el flujo de información a lo largo del circuito trisináptico, compuesto por tres sinapsis secuenciales: (1) proyección desde la corteza entorrinal hacia el DG (vía perforante), (2) proyección desde el DG hacia el sector CA3 del hipocampo (fibras musgosas), y (3) proyección desde CA3 hacia el sector CA1 del hipocampo (colaterales de Schaffer). El circuito se cierra con la posterior proyección desde CA1 hacia la corteza entorrinal. *Adaptación de Neves G et al., 2008⁶.*

Una vez la información alcanza el DG, este se encarga de descorrelacionar todas las entradas corticales superpuestas y codificar la información en patrones de salida no superpuestos que sean correctamente interpretados por el hipocampo, todo ello a través de un proceso denominado “separación de patrones”^{5,7}. Este proceso evita la interferencia entre la información procedente de distintas experiencias y facilita la formación de recuerdos individuales⁵. De esta forma, las células granulares del DG proyectan sus fibras musgosas con la información procesada hacia el *stratum lucidum* del sector CA3 del hipocampo^{6,7}.

El hipocampo, en su conjunto, se encarga de la integración de la información espacial, temporal y sensorial, que aparecen como patrones individuales tras el procesamiento del DG, para elaborar una representación de la realidad unificada que pueda ser almacenada como una memoria contextual individual, lo que conduce a la formación de nuevas memorias. En este sentido, la información que entra en CA3 es procesada por una extensa red interna formada por las colaterales que dan sus neuronas piramidales y posteriormente es proyectada hacia la capa molecular de CA1 a través de un tracto conocido

como “colaterales de Schaffer”^{6,7}. Finalmente, el procesamiento de la información en CA1 concluye el proceso de formación de la memoria, que es proyectada finalmente hacia la corteza entorrinal, cerrando así el ciclo⁶. No obstante, la información asociada a la memoria es retroproyectada por la corteza entorrinal hacia las áreas isocorticales de origen para su almacenamiento a largo plazo, lo que da lugar a la consolidación de la memoria⁷.

De esta forma, la activación simultánea de subconjuntos de neuronas dispersas espacialmente entre el DG y las áreas isocorticales pero estrechamente interconectadas entre sí durante los procesos de formación de la memoria da lugar a “engramas”, que son las unidades funcionales básicas para la codificación, el almacenamiento y la recuperación de la memoria^{6,7}.

Asimismo, el procesamiento de la información sensorial, espacial y temporal por parte del DG y del hipocampo permite la formación de mapas cognitivos, es decir, representaciones internas del mundo en que vivimos, lo que permite a los individuos ubicar su posición en el entorno local y con ello guiar la planificación de conductas durante los procesos de navegación espacial^{2,7}.

Así, el DG y el hipocampo forman complejos circuitos con otras estructuras corticales con el fin de llevar a cabo sus funciones. Estos circuitos son de carácter dinámico y presentan una extensa maduración postnatal, en los que su actividad excitatoria debe ser finamente regulada^{2,7}. En este contexto, el papel de las interneuronas GABAérgicas es especialmente relevante para el correcto mantenimiento del balance E/I en estas estructuras, así como para la integración de la señalización moduladora procedente de las estructuras subcorticales, por lo que a continuación vamos a profundizar en su función y, en específico, en uno de sus subtipos: las interneuronas somatostatina-positivas (interneuronas SST+, en adelante), cuya acción resulta ser clave en la mediación de estos procesos.

Interneuronas SST+: generalidades, conectividad y funciones

Las interneuronas GABAérgicas corticales representan un grupo altamente heterogéneo de neuronas con capacidad inhibitoria en lo referente a sus propiedades morfológicas, celulares y electrofisiológicas, lo que obliga a emplear

sistemas de categorización que establezcan grupos independientes en relación a alguna de sus características para facilitar su estudio⁴. En este sentido, las interneuronas GABAérgicas se dividen en tres grandes grupos en relación a sus características electrofisiológicas, neuroquímicas y mecanismos de inhibición: las interneuronas que expresan el receptor ionotrópico de serotonina 5-HT_{3A}, consideradas de disparo adaptativo y median la desinhibición de otras interneuronas GABAérgicas; las parvalbúmina-positivas (PV+, en adelante), consideradas de descarga rápida e inhibición perisomática; las interneuronas SST+, consideradas de descarga lenta e inhibición a nivel dendrítico^{4,8}.

Las interneuronas SST+, en las que nos centraremos a lo largo de este trabajo, se caracterizan por presentar axones que se proyectan dentro de la estructura en que se encuentran para formar circuitos inhibitorios locales^{4,8}; así como por expresar el neuropéptido somatostatina desde estadios embrionarios tempranos, el cual es liberado en las sinapsis inhibitorias para ejercer funciones complementarias al GABA, ya que, en contraposición a este, proporciona una inhibición más débil pero más prolongada en el tiempo⁹.

A nivel funcional, las interneuronas SST+ presentan dos mecanismos principales de inhibición en función de su destino postsináptico: la inhibición por retroalimentación hacia neuronas piramidales, en las que las neuronas piramidales activan a las interneuronas a través de entradas excitatorias, para que estas posteriormente las inhiban a través de sinapsis recíprocas; y la inhibición lateral hacia otras interneuronas vecinas, en las que las interneuronas SST+ inhiben la acción de interneuronas que se encargan de inhibir a su vez a las propias neuronas piramidales, dando como resultado un aumento en la excitabilidad del circuito^{4,9}. De esta forma, las interneuronas SST+ establecen una regulación fina del balance E/I en las estructuras en que se encuentran.

En el DG y el hipocampo, las interneuronas SST+ se ubican, fundamentalmente, en el hilio y el *stratum oriens*, respectivamente (**Figura 4A**), desde donde proyectan sus axones hacia la capa molecular de sus respectivas estructuras para sinaptar con las dendritas apicales de las neuronas piramidales presentes en la capa granular del DG y en la capa piramidal del hipocampo,

siendo este su principal mecanismo de regulación de la actividad hipocampal^{9,10}. Asimismo, los mecanismos de inhibición lateral se dirigen principalmente hacia interneuronas asociadas a la vía perforante y a la vía colateral de Schaffer, lo que les permite regular el flujo de información que accede al hipocampo a través de la corteza entorrinal y del DG, respectivamente^{9,10} (**Figura 4B**).

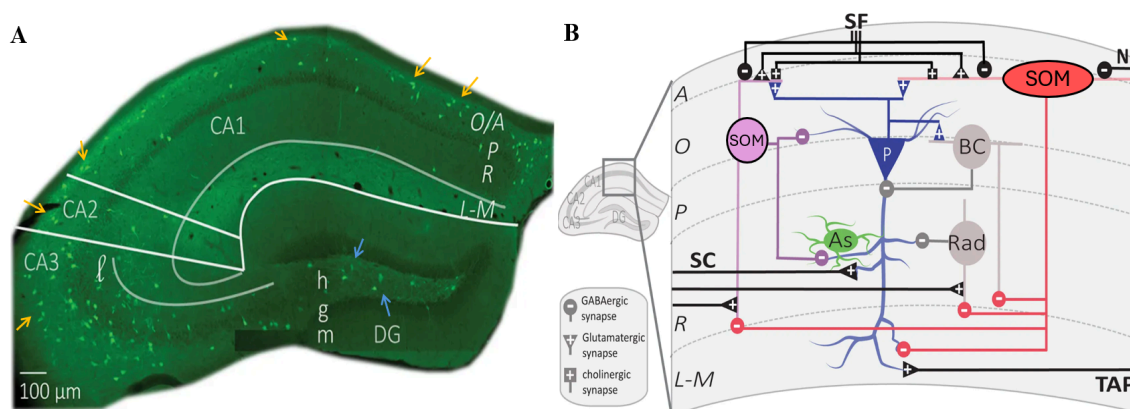


Figura 4. Las interneuronas SST+ forman circuitos inhibitorios en el hipocampo y en el DG. (A) Distribución de interneuronas en el hipocampo (flechas amarillas) y en el DG (flechas azules), que se posicionan de forma preferente en el *stratum oriens* (O/A) del hipocampo y en el hilio (h) del DG. (B) Mecanismos de inhibición de las interneuronas SST+ (SOM) presentes en el *stratum oriens* del hipocampo, donde inhiben a las neuronas piramidales de la capa piramidal a nivel dendrítico, así como a otras interneuronas (BC, Rad). Asimismo, las interneuronas SST+ reciben entradas excitatorias de las neuronas piramidales locales y de la vía colateral de Schaffer (SC), así como entradas inhibitorias de la región septal (SF) y del tronco del encéfalo (NI). Las interneuronas SST+ presentes en el hilio del DG muestran una conectividad prácticamente idéntica (no mostrado). Adaptación de Honoré et al., 2021⁹.

Por otro lado, las interneuronas SST+ participan activamente en la integración de la señalización moduladora que reciben el DG y el hipocampo de la región septal y del tronco del encéfalo, encargada de orquestar la sincronización de la actividad neuronal en estas estructuras, lo que subraya su implicación en los procesos de aprendizaje y formación de la memoria^{9,11,12}.

De esta forma, diversos estudios de silenciamiento optogenético y de ablación de interneuronas SST+ informan de una pérdida tanto del balance E/I como de la plasticidad sináptica en los circuitos inhibitorios, que, en el caso del hipocampo y del DG, dan como resultado un empeoramiento de la eficiencia de los procesos de aprendizaje y de formación de la memoria^{9,11-13}, así como aumentos en la actividad epileptiforme en el DG¹⁴.

En este sentido, existen diversos genes cuya expresión aberrante puede dar lugar a defectos en el desarrollo de las interneuronas SST+ y a la consecuente adquisición de fenotipos conductuales y cognitivos como los expuestos. Por ello, nos centraremos en uno de ellos, el gen *Lis1*; el primer gen que ha sido vinculado a la etiología de diversos trastornos en el neurodesarrollo debido a su implicación en los procesos de migración y desarrollo neuronal¹⁵.

Implicación del gen *Lis1* en el desarrollo del DG y del hipocampo

El gen *Lis1* (o *Pafah1b1*) es un gen clave en los procesos de migración neuronal y desarrollo cortical, cuya mutación se correlaciona con la etiología de un amplio espectro de fenotipos estructurales anormales que afectan a la corteza cerebral, que van desde la lisencefalia o el síndrome de Miller-Dieker en los casos más severos, caracterizados por una alteración profunda de la laminación cortical así como una reducción en su grosor¹⁵; hasta el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos aislados en los casos menos graves, como retraso mental y algunas formas poco frecuentes de epilepsia refractaria y esquizofrenia, provocados por alteraciones estructurales más discretas^{14,16,17}.

El gen *Lis1*, localizado en humanos en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.3), consta de 11 exones y codifica para una proteína de 410 aminoácidos y 46 kDa de peso molecular que se encuentra altamente conservada a nivel evolutivo¹⁵. La proteína LIS1 actúa como una interfaz para la interacción entre proteínas, pudiendo realizar diversas funciones en relación a los complejos multiproteicos formados^{15,18}. No obstante, su función principal es la regulación de la actividad del motor molecular dineína citoplasmática, con la que forma complejos asociados a los microtúbulos que median el transporte retrógrado en neuronas postmitóticas (**Figura 5A**), lo cual afecta a diversos procesos relevantes para el desarrollo neuronal como son la proliferación de progenitores neurales de forma previa a la neurogénesis, la nucleocinesis durante la migración neuronal, o la formación de proyecciones axonales y dendríticas, el transporte axoplásmico y la integración sináptica durante el desarrollo postnatal, entre otros procesos^{15,18}.

El papel del gen *Lis1* en la migración neuronal y en el desarrollo cortical ha sido ampliamente estudiado desde finales del siglo XX. Para ello, se han

desarrollado fundamentalmente dos modelos murinos de estudio: los ratones *Lis1*^{+/-}, que portan un alelo nulo del gen *Lis1*; y los ratones *Lis1/sLis1*, con un alelo hipomorfo que da lugar a una proteína truncada con menor función que la producida por el alelo silvestre^{19,20}. Los estudios estructurales realizados en el DG y en el hipocampo de estos animales durante su desarrollo postnatal informan acerca de la presencia de defectos laminares de sus diferentes capas, caracterizados por una marcada dispersión neuronal y un empaquetamiento más laxo en las capas piramidales^{19,20}, así como reducciones significativas en el número tanto de neuronas piramidales^{20,21} como de interneuronas^{17,22} (**Figura 5B**), lo que se ha relacionado con defectos en la formación de los circuitos inhibitorios en estas estructuras y con alteraciones cognitivas asociadas a los procesos de aprendizaje, formación de la memoria y de navegación espacial^{17,22}.

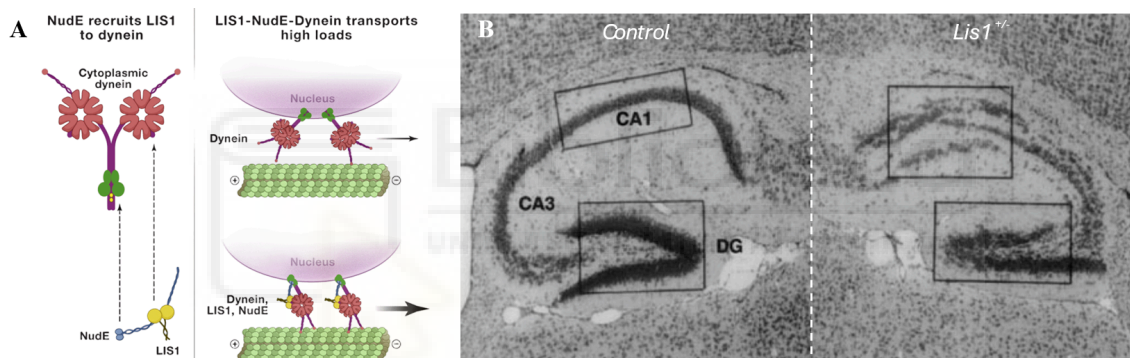


Figura 5. El gen *Lis1* es necesario para el correcto desarrollo del hipocampo y del DG. (A) Mecanismo de acción de la proteína LIS1, que regula el transporte retrógrado a través de la red de microtúbulos por medio de la formación de complejos multiproteicos con otras proteínas que se unen al motor molecular dineína citoplasmática. (B) La pérdida de expresión del gen *Lis1* en ratones *Lis1*^{+/-} (derecha) provoca defectos laminares en la estructura del hipocampo y del DG, como son la formación de capas poco definidas, con discontinuidades, estratificaciones anómalas y una marcada dispersión de las neuronas en comparación con los ratones control (izquierda). Adaptación de McKenney RJ et al., 2010¹⁸ y Fleck MW et al., 2000²⁰.

Sin embargo, estos modelos animales presentan dos limitaciones importantes. Por un lado, no permiten estudiar el efecto de la pérdida completa de expresión del gen *Lis1*, ya que ambos modelos portan una copia funcional de dicho gen debido a que las mutaciones introducidas en homocigosis son incompatibles con la vida²⁰. Por otro lado, las mutaciones producidas afectan a todas las células del cerebro, lo que impide el estudio del efecto del truncamiento de la expresión de *Lis1* en tipos celulares específicos.

En este sentido, los avances en técnicas de biología molecular han permitido el desarrollo de nuevos modelos de estudio que superan estas limitaciones. Las cepas transgénicas desarrolladas a partir de la tecnología Cre-Lox permiten eliminar la expresión de un gen en un tipo celular específico y en un momento concreto de su desarrollo a través de la expresión de la recombinasa Cre, que deleciona una secuencia génica de interés ubicada entre dos secuencias *LoxP*, que son reconocibles por la recombinasa²³. De esta forma, para la realización de este trabajo se ha empleado la línea mutante *Lis1*-SST KO, en la que se ha eliminado completamente la expresión del gen *Lis1* exclusivamente en interneuronas SST+ una vez estas han sido generadas.

Por ello, dado el reducido número de investigaciones que han centrado su atención en el papel del gen *Lis1* en el desarrollo de subpoblaciones neuronales específicas, este trabajo pretende caracterizar el fenotipo estructural del DG y del hipocampo postnatal asociado a la pérdida del gen *Lis1* en interneuronas SST+.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En la actualidad, existen numerosas evidencias de que el gen *Lis1* es fundamental para el correcto desarrollo de las interneuronas GABAérgicas, obteniéndose en los últimos años datos más precisos acerca de cómo la pérdida de su expresión afecta al desarrollo de poblaciones neuronales específicas.

Los primeros estudios realizados en este campo demostraron que la eliminación de la expresión del gen *Lis1* en neuronas postmitóticas reduce la velocidad de migración neuronal y provoca su distribución ectópica en la corteza cerebral en desarrollo, conduciendo a un fenotipo estructural y funcional caracterizado por una afectación del patrón laminar normal de diferentes áreas cerebrales¹⁹⁻²¹, por una disminución en la densidad de diferentes poblaciones neuronales^{17,21,22} y por una reorganización de los circuitos corticales^{21,22}. Así, se ha postulado que los trastornos en la migración de las interneuronas SST+ pueden ser la base que subyace a la etiología de diversas enfermedades neuropsiquiátricas y trastornos en el neurodesarrollo¹⁵, que, en el caso específico del hipocampo y del DG, se han vinculado con el desarrollo de algunas formas de

epilepsia del lóbulo temporal¹⁴, así como con alteraciones en los procesos de aprendizaje y de formación de la memoria^{9,11-13}, entre otros.

Cabe remarcar que el déficit observado en el número de interneuronas parecen perdurar tras el nacimiento de los animales. Los estudios centrados en el análisis cuantitativo de interneuronas GABAérgicas totales en la corteza cerebral postnatal han reflejado reducciones de magnitud variable en diferentes áreas corticales, con déficits de interneuronas totales del 25% en la corteza cingulada anterior, del 12% en el hipocampo o del 37% en el DG, mientras que otras áreas como la corteza prelímbica o infralímbica parecen no verse afectadas por la pérdida de expresión de *Lis1*¹⁷. Asimismo, el análisis cuantitativo de subtipos neuronales específicos en estas áreas mostró déficits superiores al 30% en el número de interneuronas PV+ únicamente en la corteza cingulada anterior¹⁷, mientras que en el hipocampo se produjo una redistribución de interneuronas PV+ sin pérdida neuronal aparente^{17,22}. Por otro lado, un estudio reciente realizado en la corteza cingulada anterior y retrosplenial postnatal de ratones *Lis1*-SST KO reveló que la pérdida de interneuronas SST+ era superior al 60%²⁴, evidenciando la vulnerabilidad de este subtipo neuronal a la pérdida de expresión del gen *Lis1*.

Estos resultados sugieren que la eliminación de la expresión del gen *Lis1* afecta de forma diferencial a cada área cortical y, dentro de ella, a cada subtipo neuronal, lo cual obliga a realizar estudios específicos en cada región para poder analizar correctamente si se producen anomalías en su desarrollo que permitan, en última instancia, caracterizar los actores que juegan un papel clave en la etiología y en la progresión de los trastornos neuropsiquiátricos y en el establecimiento de fenotipos conductuales y cognitivos aberrantes.

Por ello, el objetivo general del presente trabajo es analizar el efecto de la inactivación del gen *Lis1* en el desarrollo y establecimiento de interneuronas SST+ en el hipocampo y en el DG durante el desarrollo postnatal en un modelo murino mutante selectivo para el gen *Lis1*.

Para analizar de forma más precisa el objetivo que se ha definido, se han planteado dos objetivos específicos:

1) Analizar cuantitativamente las diferencias en el número y la densidad de interneuronas SST+ en el *stratum oriens* del hipocampo entre los ratones mutantes Lis1-SST KO y los controles Cre-positivo y Cre-negativo a estadio postnatal 30 (P30, en adelante).

2) Analizar cuantitativamente las diferencias en el número y la densidad de interneuronas SST+ en el hilio del DG entre los ratones mutantes Lis1-SST KO y los controles Cre-positivo y Cre-negativo a P30.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para la realización de este estudio, se utilizó una cepa de ratones denominada SST-Cre, caracterizada por expresar la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen *Sst* (*Sst*^{tm2.1(Cre)Zjh} /J, The Jackson Laboratory), lo que permite expresar la recombinasa Cre exclusivamente en interneuronas SST+ postmitóticas con el fin de eliminar de forma dirigida la expresión de las copias del gen *Lis1* que se encuentren floxadas (flanqueadas por secuencias *LoxP*). De esta forma, se definieron tres grupos de estudio: el grupo control Cre-negativo (WT; *Lis1* fl/+), que presenta una expresión inalterada del gen *Lis1* al tener una copia floxada del gen *Lis1* pero no expresar la recombinasa Cre; el grupo control Cre-positivo (*Cre*+/+; *Lis1* fl/+), en el que se elimina parcialmente la expresión de *Lis1* al expresar la recombinasa Cre y presentar un solo alelo floxada; y los ratones mutantes Lis1-SST KO (*Cre*+/+; *Lis1* fl/fl), en los que se elimina totalmente la expresión de *Lis1* al tener los dos alelos floxados y expresar Cre (**Figura 6**).

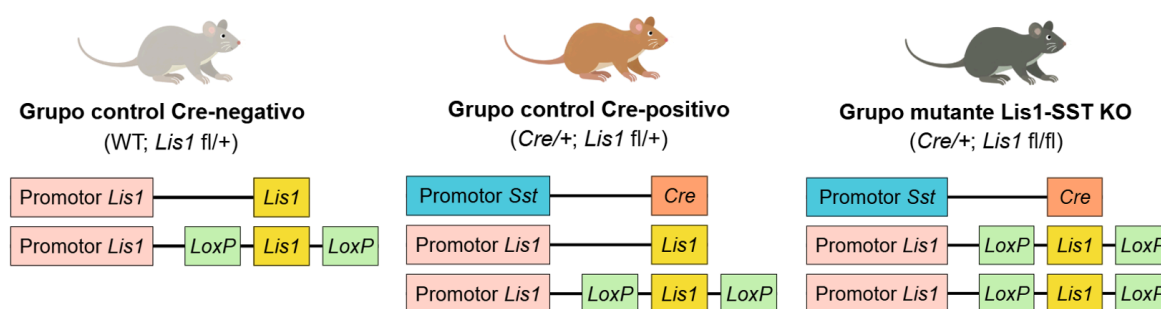


Figura 6. Grupos de estudio empleados en el estudio. Los animales fueron segregados en tres grupos de experimentación: dos grupos control y uno mutante, todo ello en función del número de copias floxadas del gen *Lis1* que presentan y de si expresan o no la recombinasa Cre.

Para la obtención del modelo murino empleado en este trabajo, se cruzaron ratones macho heterocigotos SST-Cre; *Lis1* fl/+ con ratones hembra *Lis1* fl/fl, dando lugar a ratones *Lis1* fl/fl; *Cre*/+ (grupo mutante *Lis1*-SST KO) y ratones *Lis1* fl/+; *Cre*/+ (grupo control Cre-positivo) en su descendencia. Los ratones incluidos en el grupo control Cre-negativo presentaban el mismo genotipo que los ratones hembra utilizados en el cruzamiento (WT; *Lis1* fl/fl).

El manejo y sacrificio de los animales se rigió por la actual normativa vigente sobre bienestar animal en la experimentación (“Real Decreto 1201/2005”; “Directiva 2010/63/UE”) y, a nivel interno, todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Experimental de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Además, la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández autorizó la realización de este trabajo a través de la emisión de la correspondiente certificación (**Anexo, Figura 1**).

Genotipado de animales empleados en el estudio

El genotipado de los ratones se realizó con el objetivo de asignar los animales de experimentación a los diferentes grupos en función de su genotipo. Para el genotipado de los animales, se empleó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el fin de amplificar y aislar los fragmentos de ADN correspondientes a las construcciones flox-*Lis*-flox y SST-Cre, extraídas de muestras biológicas procedentes de todos los ratones empleados en el estudio.

La identificación de los ratones y la obtención de muestras para genotipado se llevaron a cabo simultáneamente mediante biopsia del pabellón auricular. El tejido obtenido se conservó a -20°C hasta el proceso de lisis celular. Posteriormente, las muestras se introdujeron en una disolución de 100 µL de NaOH 50 mM, que fue incubada en un termobloque en agitación continua durante 25 minutos a 95°C de temperatura, con el fin de provocar la lisis del tejido y obtener un sobrenadante que contenía el ADN de cada muestra biológica.

Una vez aislado el ADN de las muestras biológicas, se prepararon los tubos de PCR para realizar la amplificación. Para ello, se introdujo en cada tubo de PCR 1 µL del sobrenadante con ADN previamente obtenido 12 µL de

disolución Kappa (*Kapabiosystems*, KM5610), que incluía la ADN polimerasa, los desoxirribonucleótidos trifosfatos y los cofactores requeridos para llevar a cabo la amplificación; y 1 µL de disolución 10 mM de cebadores *forward* y *reverse* para la amplificación de cada construcción. Esta operación se realizó por duplicado para todos los animales incluidos en el estudio, preparando dos tubos de PCR por cada ratón: uno con los cebadores necesarios para amplificar la construcción SST-Cre y otro para la construcción flox-Lis1-flox. La amplificación se llevó a cabo en presencia de un control positivo, en el que se empleó ADN procedente de animales en los que se había comprobado previamente que presentaban las construcciones; así como un control negativo, en el que no se empleó ADN.

A continuación, se muestra la secuencia completa de los cebadores empleados para la amplificación de la construcción SST-Cre: “*Forward Primer*” SST (FP SST): 5’CTGGAAGACATTACATCCTG3’; “*Reverse Primer*” SST (RP SST): 5’TATGGCAGCTGTTCCCAATAG3’; Cre FP: 5’CGGTGCATGCAACGAGGATG3’; Cre RP: 5’AGCCTGTTTTGCACGTTTACC3’; y para la construcción flox-Lis1-flox: FP: 5’TGAATGCATCAGAACCATG3’; RP: 5’CCTCTACCACTAAAGCTTCTTC3’.

Para la amplificación por PCR se empleó un programa de temperaturas y ciclos específico para cada construcción, formado por 35 ciclos en el caso de SST-Cre y de 32 ciclos en el de flox-Lis1-flox. Ambos programas consistían en una primera etapa de desnaturalización del ADN, a 94°C para la construcción SST-Cre y a 95°C para flox-Lis1-flox; seguida de una etapa de hibridación a 60°C y una etapa final de polimerización a 72°C para ambas construcciones.

Una vez finalizada la PCR, se analizó el resultado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Para preparar el gel, se disolvió la agarosa en tampón TAE 1× (tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) mediante calentamiento hasta obtener una solución uniforme, incorporando posteriormente 15 µL del agente *Green Safe* al gel por cada 100 mL de tampón, el cual interacciona con el ADN presente en el gel de agarosa y permite su detección tras ser estimulado con luz UV. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos hasta su solidificación completa.

Finalmente, se introdujeron todas las muestras de ADN obtenidas tras la PCR en el gel de agarosa y se aplicó una corriente de 120 V durante 20 minutos para separar las moléculas de ADN en función de su tamaño. Las bandas resultantes se visualizaron usando luz UVB con una longitud de onda de 312 nm.

Así, la amplificación de la construcción SST-Cre puede dar como resultado dos tipos de bandas de diferente peso molecular, una de 370 pb (secuencia del gen *Sst*) y una de 320 pb (secuencia del gen *Cre*); al igual que la amplificación de la construcción flox-*Lis1*-flox, que puede dar lugar a bandas de 167 pb (secuencia de *Lis1*) y 210 pb (secuencia de *Lis1* floxada). De esta forma, los ratones fueron asignados a los diferentes grupos de estudio en función del patrón de bandas observado, que se correlaciona con los genotipos expuestos en el epígrafe anterior en la **Figura 6 (Anexo, Figura 2)**.

Obtención de secciones coronales del hipocampo y DG a P30

De forma previa a la obtención de cortes coronales de las dos regiones de estudio, el personal del laboratorio se encargó del manejo y sacrificio de los ratones incluidos en el estudio. Para ello, los ratones a P30 se anestesiaron con isoflurano (4 % para la inducción y 1,5–2 % para el mantenimiento en oxígeno) hasta verificar la pérdida completa de los reflejos. A continuación, se realizó una perfusión transcardial con solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguida de paraformaldehído al 4 % (PFA 4%) en PBS, con el fin de preservar la integridad estructural del cerebro.

Tras finalizar la perfusión, se extrajo el cerebro de todos los ratones y se incubaron en PFA 4% a 4°C durante una noche. Al día siguiente se lavaron con PBS y se sometieron a un proceso de deshidratación progresiva con etanol y butanol, empleando para ello un protocolo interno del laboratorio (alcohol 70° durante toda la noche, alcohol 80° 1 hora, alcohol 96° 1 hora, alcohol 100° 1 hora, butanol 40 minutos). Posteriormente, los cerebros se sumergieron en parafina líquida, renovándose cada 30-60 minutos durante 8 horas para eliminar el butanol. Una vez solidificada a temperatura ambiente, el bloque resultante permitió el seccionamiento del tejido. De esta forma, se empleó un microtomo (Leica RM2125 RTS) para obtener cortes coronales de 16 µm de espesor, que

fueron recogidos y separados en tres series de cortes, repitiendo este proceso para la obtención de cortes coronales de todos los ratones de estudio.

Una vez obtenidos los cortes, se preparó el tejido para la realización de un ensayo de inmunohistoquímica. Para ello, se retiró la parafina de todos los cortes a través de su inclusión en xileno durante 2 horas y se siguió un protocolo estándar de rehidratación del tejido con una concentración creciente de alcohol (alcohol 100° durante 20 min, alcohol 96° 20 min, alcohol 70° 20 min).

Tras este paso, los cortes fueron sumergidos en tampón citrato de sodio (0,1 M, pH 6) y se calentaron en microondas a 95-100°C con el fin de desenmascarar los epítomos del antígeno al que va a unirse el anticuerpo primario durante el ensayo de inmunohistoquímica

Finalmente, los cortes fueron lavados en PBS con Triton X-100 al 0,1% (PBS-T), ya que el uso de este detergente permeabiliza el tejido para facilitar la unión del anticuerpo al antígeno. Tras este paso, el tejido queda preparado para el ensayo de inmunohistoquímica.

Marcaje de células SST+ a través de análisis inmunohistoquímico

De forma previa a la cuantificación de interneuronas SST+, se realizó un ensayo de inmunohistoquímica para marcar las células que expresan somatostatina en el DG y en el hipocampo de ratones tanto control como mutantes a P30. Para ello, se empleó un protocolo estandarizado de inmunohistoquímica que requiere dos días para su realización completa.

Durante el primer día, se realiza el marcaje de las células SST+ con el anticuerpo primario. Para ello, el procedimiento se inició con la incubación de los cortes coronales preparados en el paso previo con peróxido de hidrógeno al 0,009% durante 30 minutos con el fin de bloquear la peroxidasa endógena presente en el tejido, tras lo cual se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS-T en agitación. Posteriormente, los cortes fueron incubados con una solución de bloqueo compuesta por albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y lisina al 10% durante al menos 1 hora con el fin de evitar la unión inespecífica del anticuerpo en el siguiente paso. A continuación, se retiró la solución de bloqueo y

se incubó directamente el anticuerpo primario policlonal contra SST preparado en conejo (dilución 1:300, Invitrogen, PA5-85759) diluido en solución de recuperación DAKO durante toda la noche a temperatura ambiente.

Durante el segundo día, se realiza la detección colorimétrica de las interneuronas SST+. Para ello, en primer lugar se lavaron los cortes con PBS-T en tres lavados de 10 minutos para retirar el remanente de anticuerpo primario que haya quedado libre. Tras ello, se incubaron los cortes con un anticuerpo secundario IgG anti-conejo biotinilado (dilución 1:200; Vector BA-1000) durante 1 hora, seguido de un nuevo ciclo de lavados con PBS-T durante 30 minutos. Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1 hora con una solución que contiene el complejo avidina-biotina y la peroxidasa de rábano picante biotinilada (kit ABC, dilución 1:300; Vector Laboratories, CA-94010). De esta forma, la avidina, con elevada afinidad por la biotina, se une tanto al anticuerpo secundario como a la peroxidasa, ambos biotinilados, formando complejos tetravalentes que amplifican la reacción colorimétrica asociada a la reacción catalizada por la peroxidasa, aumentando la sensibilidad del ensayo.

Para finalizar el ensayo, se incubaron los cortes con una disolución al 1% de 3,3'-diaminobencidina (DAB; Vector Laboratories, SK-4100), 0,025% de sulfato de níquel amónico hexahidratado y 0,0018% de H₂O₂ en PBS en condiciones de oscuridad hasta observarse la coloración producida en el tejido. De esta forma, la peroxidasa unida a los anticuerpos secundarios a través del complejo ABC oxida el DAB en presencia de níquel forma un precipitado insoluble marrón en torno a las células SST+, siendo visibles los precipitados a través de microscopía óptica. La reacción de oxidación de la peroxidasa se detuvo a través del lavado de los cortes en PBS durante 30 minutos.

Tras el marcaje inmunohistoquímico, se realizó un contraste con violeta de cresilo (2% en tampón acetato, pH 3,8-4) durante 10 minutos, lo que permitió identificar la región de interés en base al marcaje de ácidos nucleicos, núcleo (cromatina), nucleolo y cuerpos de Nissl citoplasmáticos. El contraste se ajustó mediante una decoloración controlada en etanol (70% y 96%). Posteriormente, las secciones se deshidrataron en gradaciones crecientes de alcohol (70%, 96%

y 100%) y se aclararon con 2 lavados en xilol de 10 minutos cada uno antes de su montaje sobre portaobjetos de vidrio con el medio de montaje Eukitt (Electron Microscopy Sciences, 15322).

Cuantificación celular a través del software Stereo Investigator

Para finalizar, se realizó una cuantificación del número y la densidad de células SST+ en el hilio del DG y en el *stratum oriens* del hipocampo a P30 a través del software Stereo Investigator (MBF Bioscience, Williston, VT, EE. UU.). Para ello, en primer lugar, se introdujeron los parámetros necesarios para realizar correctamente el análisis, como son el número de secciones (5 en caso del DG y 6 en el del hipocampo), el grosor de los cortes (16 μm) y el espesor a analizar (9 μm). Tras ello, a pocos aumentos (2,5x), se delimitó el hilio del DG y al *stratum oriens* del hipocampo en los dos hemisferios contralaterales de las secciones coronales seleccionadas, empleando las descripciones anatómicas del Allen Brain Atlas como material de referencia en su delimitación²⁵ (**Figura 7A**).

Después, se realizó un conteo manual del número de células SST+ a altos aumentos (63x) en el área delimitada. Para ello, el software Stereo Investigator hace un barrido de dicha superficie a través de una platina monitorizada acoplada a un microscopio óptico (Leica DM4000) y establece una cuadrícula de muestreo de área 100x100 μm en 10 ubicaciones aleatorias. Dentro de cada cuadrícula de muestreo, se contaron los somas de las células SST+ que estuvieran contenidas dentro de un área de aceptación delimitada por el propio software o que tocaran su contorno, mientras que las células SST+ que estuvieran fuera de dicha área o que contactaran con el área de exclusión fueron excluidas del análisis (**Figura 7B**). La cuantificación se realizó en una de cada 24 secciones inmunoteñidas en el paso previo, obteniendo un valor de células SST+ para el hilio del DG y para el *stratum oriens* del hipocampo por cada hemisferio analizado.

Una vez cuantificado el número de células SST+ en todas las cuadrículas analizadas, el software Stereo Investigator estima el número total de células SST+ presentes en toda la estructura del hilio del DG y del *stratum oriens* del hipocampo en cada hemisferio contralateral. Para ello, se realizó una estimación del número total de células SST+ en cada capa teniendo en cuenta que cada

contaje se ha realizado en una región de superficie $100 \times 100 \mu\text{m}$ (área de la cuadrícula) y de espesor $9 \mu\text{m}$ (espesor a analizar en cada sección), lo que permite extrapolar el valor cuantificado en dicha región al volumen total de cada capa obtenido previamente, dando como resultado un valor de número de células SST+ para el hilio del DG y para el *stratum oriens* del hipocampo en cada hemisferio. Finalmente, a partir del volumen de cada capa y del número total de células SST+ estimado, se calcula la densidad de células SST+ para el hilio del DG y del *stratum oriens* del hipocampo en cada hemisferio analizado. Este procedimiento se realizó del mismo modo durante el análisis de todas las secciones coronales empleadas en el estudio.

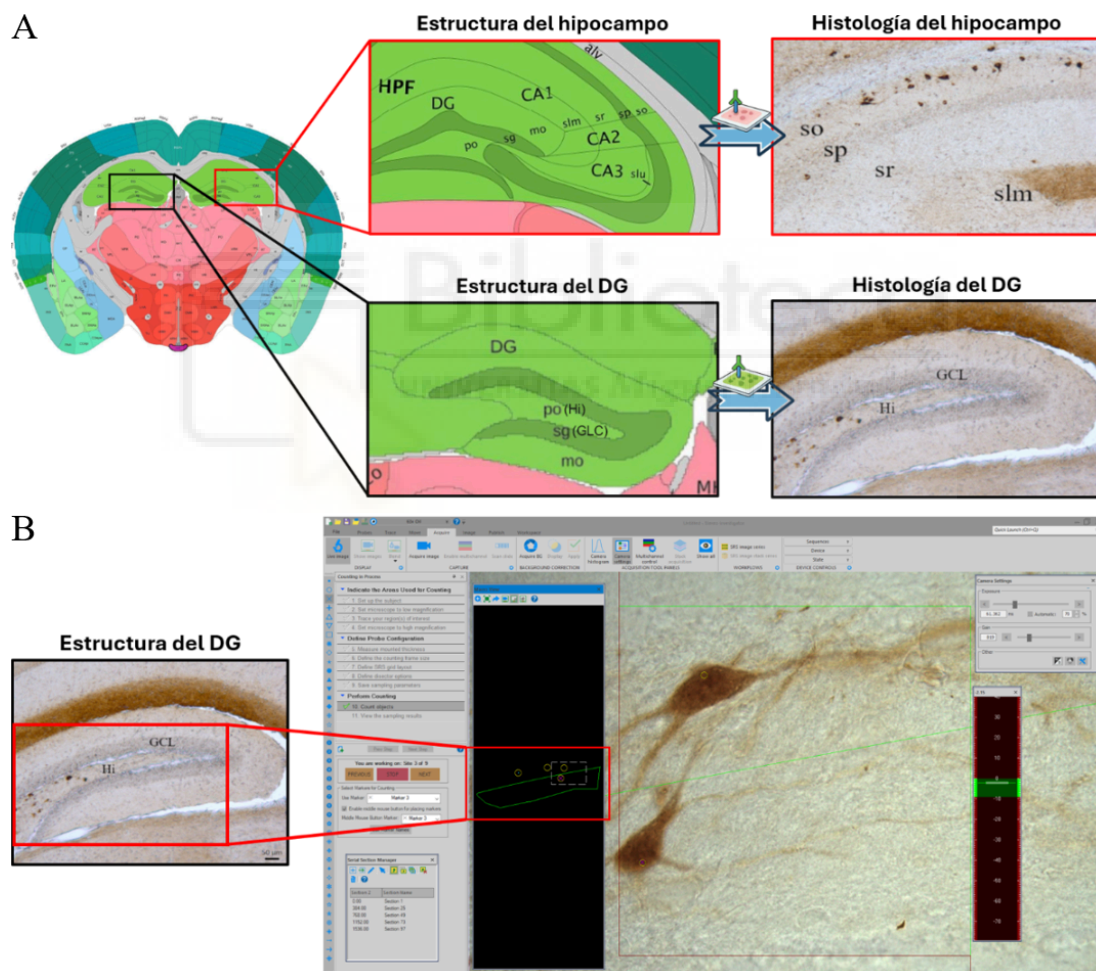


Figura 7. Cuantificación de células SST+ en el hilio del DG y en el *stratum oriens* del hipocampo. (A) La delimitación de la estructura del hilio (Hi) y del *stratum oriens* (so) se realizó empleando el Allen Brain Atlas como guía²⁵. (B) El software Stereo Investigator permite la cuantificación de células SST+ a altos aumentos dentro de una cuadrícula de muestreo en una región previamente delimitada (en el caso mostrado, el hilio del DG), en la que delimita un área de inclusión (líneas verdes) y un área de exclusión (líneas rojas). En la parte derecha se observa un selector que permite al usuario moverse a lo largo del espesor de la sección a analizar.

En este estudio, se analizó un total de cinco hemisferios cerebrales por cada grupo de estudio ($N = 5/\text{grupo}$). Los valores promedio de número y densidad de células SST+ expresados a lo largo de este trabajo se representan como la media $\pm$ desviación estándar de la media (SD). Para realizar el análisis estadístico de los resultados se empleó el programa JASP, mientras que la evaluación de la significancia estadística se evaluó mediante la prueba t-Student. No obstante, el análisis de los resultados en el DG requirió del uso de la prueba t de Welch debido a varianzas no homogéneas. La fuerza de la asociación estadística entre variables se evaluó con los valores $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$, considerando un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Análisis cuantitativo de interneuronas SST+ en el hilio del DG en ratones control y mutantes *Lis1*-SST KO a P30

En primer lugar, hemos realizado un análisis cuantitativo de la población de interneuronas SST+ en el hilio del DG de ratones mutantes *Lis1*-SST KO y ratones pertenecientes a dos grupos control a P30. Para ello, en primer lugar hemos eliminado la expresión del gen *Lis1* a través del uso de la construcción SST-Cre, dando como resultado ratones en los que se eliminó completamente la expresión de *Lis1* (mutantes *Lis1*-SST KO), ratones que expresan una sola copia del gen (controles Cre-positivo) y ratones en los que la expresión del gen *Lis1* permaneció inalterada (controles Cre-negativo).

Para analizar el efecto del truncamiento de la expresión de *Lis1* durante el desarrollo postnatal de las interneuronas SST+ en el DG, hemos realizado una cuantificación del número y densidad de células SST+ en el hilio, la capa del DG donde se ubican preferentemente las interneuronas SST+ tras su migración.

De forma previa al conteo, se realizó un marcaje inmunohistoquímico de células que expresaban el neuropéptido somatostatina y, a continuación, se cuantificó su número a través del software Stereo Investigator en secciones coronales procedentes de ratones sacrificados a P30, analizando un total de cinco hemisferios cerebrales por cada grupo de estudio ($n = 5/\text{grupo}$) (**Figura 8**).

Tras los contajes, calculamos a través del propio software el volumen del hilio del DG y estimamos el número total de células SST+ presentes en dicha capa para cada hemisferio analizado, realizando el mismo procedimiento para analizar todos los hemisferios en cada grupo de estudio (**Anexo, Tabla 1**). Asimismo, calculamos un valor de densidad de células SST+ en el hilio del DG para cada hemisferio analizado a partir del número de células SST+ y del volumen de la estructura previamente obtenido mediante Stereo Investigator (**Anexo, Tabla 1**).

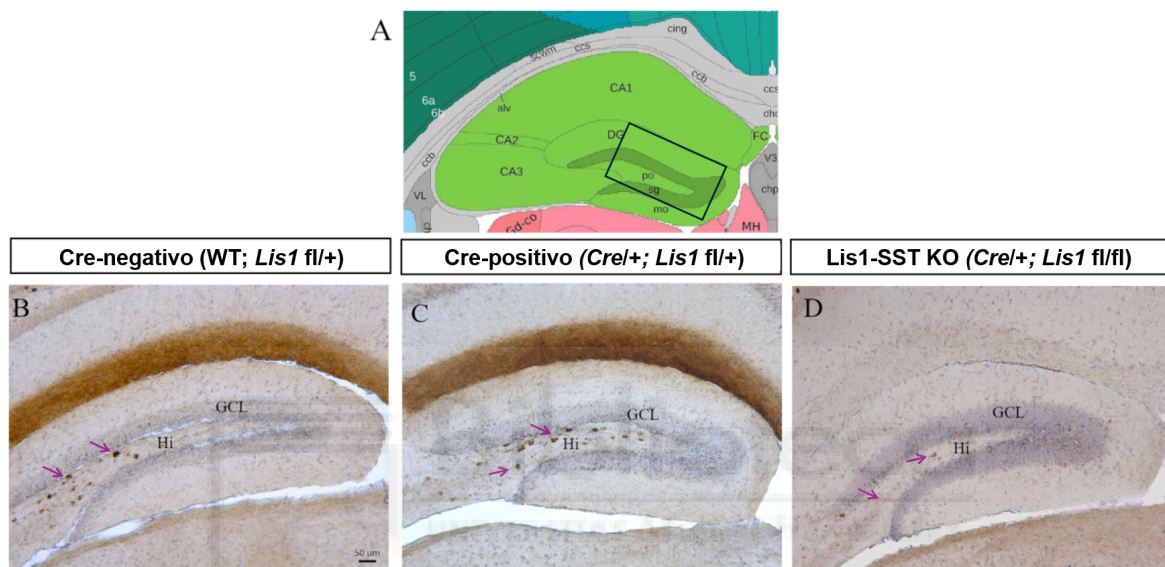


Figura 8. Marcaje inmunohistoquímico de células SST+ en el DG a P30. (A) Sección coronal del DG completo a P30 extraída del Allen Brain Atlas, donde se resalta la sección analizada en las imágenes B-D a través del software Stereo Investigator (rectángulo negro). (B-D) Secciones coronales representativas del DG y sus diferentes capas, procedentes de los ratones control Cre-negativo (B), control Cre-positivo (C) y mutantes *Lis1-SST KO* (D). Las flechas moradas en las imágenes B-D indican la presencia de células SST+ tras el marcaje inmunohistoquímico. Abreviaturas: hilio (*Hi*), capa de células granulares (*GCL*).

Una vez obtenidos todos los valores individuales, calculamos el valor promedio tanto del número como de la densidad de células SST+ en el hilio del DG para cada grupo de estudio, así como la variación tanto en su número como en su densidad entre los tres grupos (**Figura 9**).

Los resultados obtenidos tras comparar el número de células SST+ en el hilio del DG de los diferentes grupos de estudio muestran una reducción del 75,78% en el número de células SST+ en los ratones *Lis1-SST KO* en comparación con los controles Cre-negativo que expresaban las dos copias de

Lis1 ($p < 0,001$) y del 77,85% respecto a los controles Cre-positivo que expresaban una sola copia del gen ($p < 0,001$) (**Figura 9A**).

Por otro lado, al comparar las densidades de células SST+ en el hilio del DG entre los animales de los tres grupos de estudio, encontramos que los ratones *Lis1*-SST KO presentan una disminución de la densidad de células en esta capa del 81,88% en comparación con los Cre-negativo ($p = 0,004$) y del 81,27% respecto a los Cre-positivo ($p < 0,001$) (**Figura 9B**).

Sin embargo, no observamos una variación estadísticamente significativa ni en el número ni en la densidad de células SST+ entre los ratones de los dos grupos control ($p > 0,05$) (**Figura 9**).

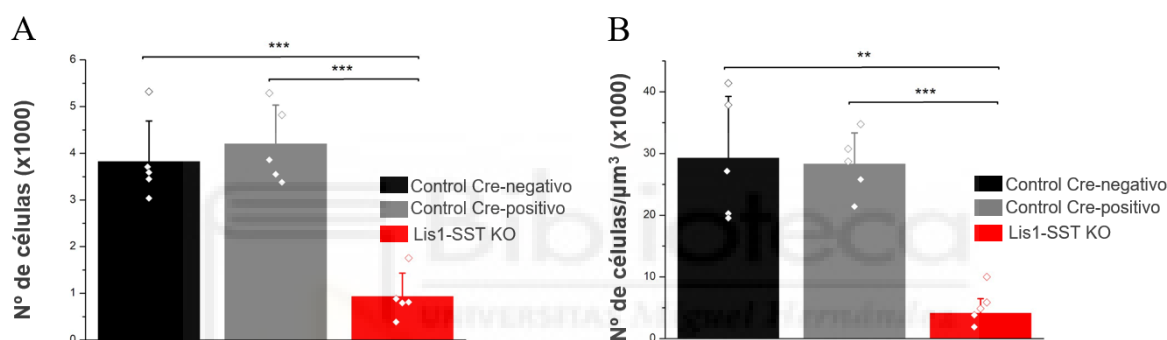


Figura 9. Análisis cuantitativo de células SST+ en el hilio del DG a P30. Los histogramas muestran (A) el número de interneuronas SST+ (expresado en nº de células x1000) y (B) su densidad (expresada en nº de células/ μm^3 x1000) en los grupos control Cre-negativo (barras negras, N = 5), control Cre-positivo (barras grises, N = 5) y mutante *Lis1*-SST KO (barras rojas, N = 5). Los valores tanto de número como de densidad de células SST+ se representan como valores promedio $\pm$ SD (x1000): (A) valores de número de células SST+ (control Cre-negativo: $3,824 \pm 0,873$; control Cre-positivo: $4,182 \pm 0,831$; *Lis1*-SST KO: $0,926 \pm 0,502$) y (B) valores de densidad de células SST+ (control Cre-negativo: $29,255 \pm 10,011$; control Cre-positivo: $28,295 \pm 5,041$; *Lis1*-SST KO: $5,300 \pm 3,014$). Los valores de significancia estadística establecidos fueron de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

En definitiva, nuestros resultados muestran una reducción consistente tanto en el número como en la densidad de células SST+ en el hilio del DG en los ratones mutantes *Lis1*-SST KO en comparación con los dos grupos control. Sin embargo, el análisis estadístico muestra que no existen diferencias significativas entre los grupos control, lo que sugiere que se requiere, al menos, una copia funcional del gen *Lis1* para alcanzar un número correcto de interneuronas SST+ en el DG a P30.

Análisis cuantitativo de interneuronas SST+ en el *stratum oriens* del hipocampo en ratones control y mutantes Lis1-SST KO a P30

De manera análoga al análisis realizado en el hilio del DG, se llevó a cabo la cuantificación de interneuronas SST+ en el *stratum oriens* del hipocampo. Para ello, se siguió el mismo procedimiento experimental descrito anteriormente, adaptando únicamente la delimitación anatómica del *stratum oriens* en el hipocampo durante la cuantificación celular realizada a través del software Stereo Investigator (**Figura 10A**). Cabe recordar que para el estudio del hipocampo se analizó únicamente la capa correspondiente al *stratum oriens* debido a que esta capa representa el principal destino de las interneuronas SST+ que migran hacia el hipocampo, siendo la capa más densamente ocupada por estas células.

De esta forma, se realizó un marcaje inmunohistoquímico de las células que expresaban somatostatina en secciones coronales de hipocampo procedentes de ratones sacrificados a P30. En esta ocasión, se emplearon los mismos grupos de estudio que para el análisis del DG, analizando nuevamente un total de cinco hemisferios cerebrales por cada grupo de estudio (**Figura 10B-G**).

Tras ello, se cuantificó a través de Stereo Investigator el número de células SST+ en el *stratum oriens* del hipocampo así como el volumen de dicha capa en todos los hemisferios incluidos en el estudio, lo que permitió obtener un valor de número total de células SST+ así como de densidad de células SST+ para cada hemisferio cerebral (**Anexo, Tabla 2**). Además, cabe recordar que el hipocampo, a diferencia del DG, está compuesto por tres subregiones estructuralmente diferenciadas a lo largo de su eje septotemporal, por lo que para realizar un muestreo apropiado de todo el hipocampo, el software Stereo Investigator debe hacer un barrido completo de toda su superficie con el fin de analizar el *stratum oriens* tanto de la subregión CA1 (**Figura 10B-D**) como de las subregiones CA2 y CA3 (**Figura 10E-G**).

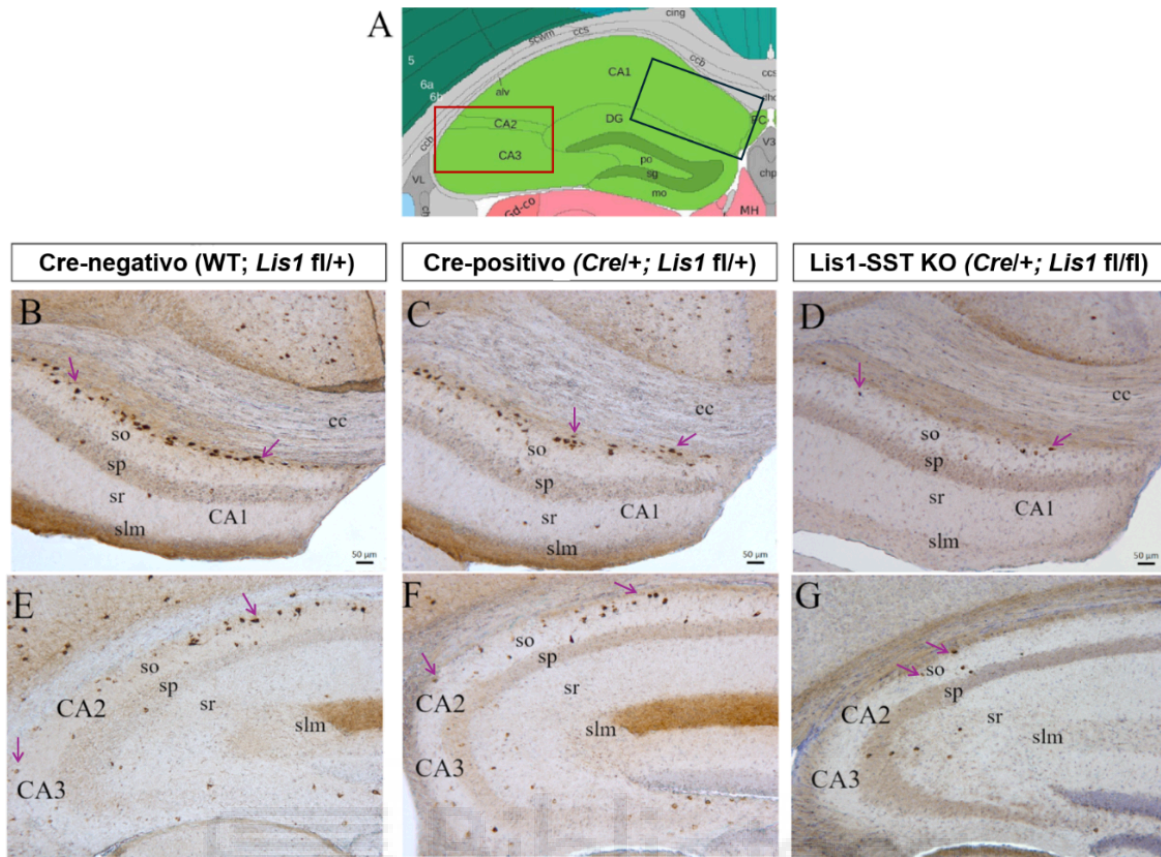


Figura 10. Marcaje inmunohistoquímico de células SST+ en el hipocampo a P30. (A) Sección coronal del hipocampo completo a P30 extraída del Allen Brain Atlas, en la que se han especificado la región CA1 analizada en las imágenes B-D (rectángulo negro) y las regiones CA2 y CA3 analizadas en las imágenes E-F (rectángulo rojo). (B-D) Secciones coronales representativas de la región CA1 del hipocampo y sus diferentes capas, procedentes de los ratones de los grupos control Cre-negativo (B), Cre-positivo (C) y mutantes Lis1-SST KO (D). (E-G) Secciones coronales representativas de las regiones CA2 y CA3 del hipocampo y sus diferentes capas, procedentes de los ratones Cre-negativo (E), Cre-positivo (F) y mutantes Lis1-SST KO (G). Las flechas moradas en las imágenes B-G señalan la presencia de células SST+ tras el marcaje inmunohistoquímico. Abreviaturas: *stratum oriens* (so), *stratum pyramidale* (sp), *stratum radiatum* (sr), *stratum lacunosum-moleculare* (slm).

Una vez obtenidos los valores individuales de número de células SST+ y su densidad, calculamos el valor promedio de cada parámetro para los tres grupos de estudio, así como su variación entre grupos (**Figura 11**).

Los resultados obtenidos tras comparar el número de células SST+ en el *stratum oriens* del hipocampo entre los diferentes grupos muestran una reducción del 74,58% en el número de células SST+ en los ratones Lis1-SST KO en comparación con los controles Cre-negativo que expresaban las dos copias del gen *Lis1* ($p < 0,001$) y del 72,14% respecto a los controles Cre-positivo que expresaban una sola copia del gen ($p < 0,001$) (**Figura 11A**).

Por otro lado, al comparar las densidades de células SST+ en el *stratum oriens* entre los animales de los tres grupos de estudio, encontramos que los ratones Lis1-SST KO presentan una disminución de la densidad celular en esta capa del 72,61% en comparación con los controles Cre-negativo ($p = 0,005$) y del 69,92% respecto a los controles Cre-positivo ($p < 0,001$) (**Figura 11B**).

Sin embargo, no observamos una variación estadísticamente significativa ni en el número ni en la densidad de células SST+ entre los controles Cre-positivo y Cre-negativo ($p > 0,05$) (**Figura 11**).

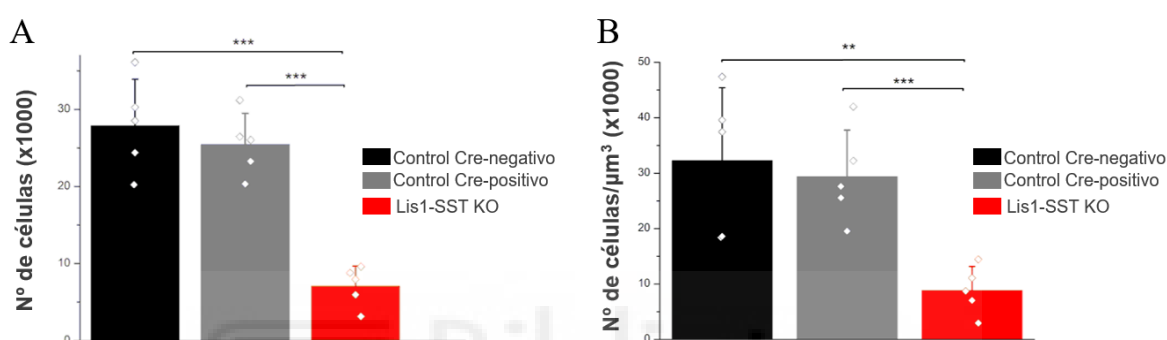


Figura 11. Análisis cuantitativo de células SST+ en el *stratum oriens* del hipocampo a P30. Los histogramas muestran (A) el número de interneuronas SST+ (expresado en n° de células x1000) y (B) su densidad (expresada en n° de células/μm³x1000) en los grupos control Cre-negativo (barras negras, N = 5), control Cre-positivo (barras grises, N = 5) y mutante Lis1-SST KO (barras rojas, N = 5). Los valores tanto de número como de densidad de células SST+ se representan como valores promedio ± SD (x1000): (A) valores de número de células SST+ (control Cre-negativo: 27,904 ± 6,004; control Cre-positivo: 25,455 ± 4,041; Lis1-SST KO: 7,093 ± 2,588) y (B) valores de densidad de células SST+ (control Cre-negativo: 32,278 ± 13,115; control Cre-positivo: 29,388 ± 8,399; Lis1-SST KO: 8,841 ± 4,311). Los valores de significancia estadística establecidos fueron de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

En resumen, el análisis cuantitativo de de interneuronas SST+ en el *stratum oriens* del hipocampo a P30 refleja una disminución significativa tanto en su número como en su densidad en los ratones mutantes Lis1-SST KO respecto a los controles Cre-positivo y Cre-negativo. Por otro lado, los grupos control no presentaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de estudio, lo cual sugiere que se requiere al menos una copia del gen *Lis1* para el correcto desarrollo postnatal de las interneuronas SST+.

DISCUSIÓN

La pérdida de *Lis1* es responsable de la reducción de interneuronas SST+ observada en el DG y en el hipocampo durante el desarrollo postnatal

A continuación, se plantea la discusión conjunta de los resultados obtenidos tras el análisis cuantitativo de las interneuronas SST+ en el DG y en hipocampo, ya que estos parecen presentar una tendencia similar y su tratamiento conjunto puede ayudar a dar una visión holística del papel de *Lis1* en el desarrollo postnatal de las interneuronas SST+ en las citadas estructuras.

Para realizar el análisis cuantitativo de interneuronas SST+, realizamos un marcaje inmunohistoquímico de células que expresan somatostatina en tres grupos de estudio diferentes: ratones control Cre-negativo, que mostraban una expresión del gen *Lis1* inalterada al no expresar la recombinasa Cre; controles Cre-positivo, en los que se eliminó la expresión de una de las copias de *Lis1*; y mutantes *Lis1*-SST KO, en los que se eliminó totalmente la expresión del gen. Posteriormente, delimitamos la superficie correspondiente al hilio del DG y al *stratum oriens* del hipocampo, determinamos su volumen y realizamos un conteo manual del número de células SST+ presentes en estas capas a P30 a través del software Stereo Investigator en cinco hemisferios por cada grupo de estudio, obteniendo finalmente los valores promedio del número y densidad de células SST+ en el hilio y en el *stratum oriens* a P30 para cada grupo de estudio.

Los resultados obtenidos mostraron una reducción estadísticamente significativa y de magnitud prácticamente idéntica tanto en el número como en la densidad de células SST+ en el hilio del DG y en el *stratum oriens* del hipocampo de los ratones *Lis1*-SST KO en comparación con los dos grupos control a P30. Sin embargo, las variaciones tanto en el número como en la densidad de células SST+ observadas entre los grupos control Cre-positivo y Cre-negativo no alcanzan a ser significativas en ninguna de las dos estructuras.

Este resultado sugiere que la expresión del gen *Lis1* es necesaria para alcanzar un número adecuado de interneuronas SST+ en el DG y en el hipocampo durante el periodo postnatal. Por ello, una pregunta que cabría preguntarse es si el déficit observado en este trabajo es simplemente la

consecuencia directa de alteraciones ocurridas durante la embriogénesis o bien el número de interneuronas SST+ se modifica durante el desarrollo postnatal, ya sea bien corrigiéndose parcialmente o bien acentuándose. En este sentido, dado que la recombinasa Cre se ha expresado bajo el control del promotor del gen *Sst*, que se expresa aproximadamente a partir del día embrionario 13²³, el silenciamiento de la expresión del gen *Lis1* se produce exclusivamente en interneuronas postmitóticas, es decir, después de la neurogénesis, por lo que la proliferación de los progenitores neurales no se ha podido ver afectada por la pérdida de expresión de *Lis1*, por lo que el déficit observado en el número de interneuronas SST+ debe atribuirse a alteraciones en el proceso de migración previo al nacimiento de los animales o bien a un defecto en su desarrollo postnatal.

Para explorar esta hipótesis, un estudio de migración de las interneuronas SST+ realizado en ratones *Lis1*-SST KO informó acerca de una reducción en su migración hacia la corteza cerebral en desarrollo a P1, así como un estancamiento de las mismas en el telencéfalo ventral durante su migración que se acompañó de un aumento de su tasa de muerte por apoptosis, lo que indica que el número de interneuronas SST+ se ve disminuído desde el nacimiento de los animales debido a una migración neuronal reducida y a un proceso de muerte celular aumentado²⁴. Además, un análisis cuantitativo de la densidad de interneuronas GABAérgicas totales en el DG de ratones *Lis1*^{+/-} determinó que no existía ninguna variación significativa en su número entre los días P5 y P30 de su desarrollo postnatal²⁶. Sin embargo, no podemos descartar que la ausencia de alteraciones postnatales en este último caso se deba a la presencia de una copia funcional de *Lis1* en los ratones *Lis1*^{+/-}, a que la mutación afecta a todas las células del cerebro de los ratones *Lis1*^{+/-} y no solo en interneuronas SST+, o que la población de interneuronas SST+ muestre un comportamiento diferencial respecto al del total de interneuronas GABAérgicas, dando lugar a una reducción posterior a su migración. De esta forma, estos resultados parecen indicar que la reducción del número de interneuronas SST+ observado en el DG y en el hipocampo de los ratones *Lis1*-SST KO probablemente esté asociado a un defecto en su migración.

En línea con esto último, es posible que exista un defecto en el desarrollo de las interneuronas SST+ que pueda conducir a un posible agravamiento de su

pérdida en estadios postnatales. Un estudio realizado en los ratones mutantes Lis1-SST KO indica que las interneuronas SST+ postmitóticas presentan somas más pequeños y compactos, así como axones más cortos y menos ramificados²⁴. Estas observaciones son complementadas con las observadas en la población total de interneuronas GABAérgicas corticales en ratones *Lis1*^{+/-}, que presentaban árboles dendríticos menos ramificados y anomalías en la formación de sus espinas dendríticas y terminales sinápticos, entre otros defectos citológicos^{21,27}. Estos defectos, sumados al posicionamiento ectópico de las interneuronas una vez finalizada su migración, pueden ocasionar anomalías en los procesos de integración sináptica y de comunicación intercelular con otros tipos neuronales que les proporcionan soporte trófico durante la maduración postnatal.

En este sentido, dado que la migración de las interneuronas SST+ se considera prácticamente finalizada tras el nacimiento, sería interesante realizar un análisis cuantitativo de las interneuronas SST+ como el realizado en este trabajo en el hilio del DG y en el *stratum oriens* del hipocampo de los ratones Lis1-SST KO durante el desarrollo postnatal temprano, es decir, a P1 y en algún estadio postnatal entre P1 y P30, con el fin de comparar los resultados obtenidos en este estudio con los obtenidos en estadios previos a P30. De esta forma, sería posible evaluar con mayor precisión las variaciones en la población de interneuronas SST+ durante el desarrollo postnatal sin que afecte al resultado cualquier defecto previo ocurrido durante su migración en estadios embrionarios.

Asimismo, este estudio también podría ser complementado con un análisis de muerte celular de las interneuronas SST+ y, posteriormente, de su morfología e integración sináptica en el DG y en el hipocampo, con el objetivo de determinar, en primer lugar, si las interneuronas SST+ presentan una mayor tasa de muerte celular en estas estructuras en los ratones Lis1-SST KO respecto a los controles, y, posteriormente, si esta muerte puede ser atribuida a una pérdida del soporte trófico necesario para su supervivencia y/o a defectos en la integración sináptica con neuronas vecinas, lo que podría conducir a su muerte al pasar a considerarse como interneuronas “no funcionales”. De esta forma, estos estudios ayudarían a comprender mejor las causas subyacentes al fenotipo estructural observado.

En definitiva, los resultados obtenidos en este estudio mostraron una reducción significativa tanto en el número como en la densidad de interneuronas SST+ en el hilio del DG y en el *stratum oriens* del hipocampo de los ratones Lis1-SST KO debido a la pérdida completa de la expresión del gen *Lis1*. Esta pérdida de interneuronas SST+ en estas estructuras probablemente conduzca a la adquisición de un fenotipo cognitivo aberrante en los ratones Lis1-SST KO, aunque sería necesario realizar estudios específicos para comprobarlo. No obstante, dado que en la actualidad disponemos de información acerca de cómo la eliminación de la funcionalidad de las interneuronas SST+ provoca alteraciones en los procesos de aprendizaje y formación de la memoria, sería interesante discutir si las alteraciones cognitivas observadas en otros modelos de estudio pueden estar relacionados con la pérdida de interneuronas SST+ observada en los ratones Lis1-SST KO, lo cual podría guiar la realización de estudios específicos en el futuro, así como ayudar a comprender mejor qué actores resultan ser clave en la etiología de estos fenotipos cognitivos aberrantes.

La pérdida de *Lis1* en interneuronas SST+ puede estar vinculada al desarrollo de defectos cognitivos en el desarrollo postnatal

Los estudios cognitivos realizados en modelos animales que presentan una expresión deficiente del gen *Lis1* han mostrado alteraciones en la memoria de reconocimiento de objetos y en el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo^{17,28}. Sin embargo, estos estudios no han podido determinar si estas alteraciones son la consecuencia de una organización cortical anómala o si bien se deben al incorrecto desarrollo de subpoblaciones neuronales específicas. Por ello, a continuación mostraremos algunas evidencias que pueden vincular las alteraciones en el desarrollo de las interneuronas SST+ observadas en los ratones Lis1-SST KO con la adquisición de los fenotipos cognitivos mencionados.

Durante los últimos años, el estudio de las interneuronas SST+ de la formación hipocampal ha recibido una especial atención debido a su estrecha vinculación con los procesos de aprendizaje y formación de la memoria. En concreto, su función parece ser clave durante la formación y estabilización de los engramas asociados a la codificación y formación de la memoria, donde se

encargan, por un lado, de mediar el balance E/I dentro de los engramas con el fin de asegurar el correcto procesamiento de la información, y, por el otro, de seleccionar qué neuronas se excluyen de los propios engramas, evitando así el reclutamiento de un excesivo número de neuronas, lo cual puede conducir a la integración inespecífica de la información durante la formación de la memoria¹².

Asimismo, el aprendizaje y la formación de la memoria contextual requieren del desarrollo de eventos de plasticidad sináptica en los engramas en los que se reclutan las interneuronas SST+, que se manifiestan como un fortalecimiento a largo plazo de las sinapsis que establecen las neuronas activadas (potenciación a largo plazo, LTP en adelante)⁹. Así, la activación repetida de un mismo conjunto de neuronas dentro del engrama induce el desarrollo de eventos de LTP en sus sinapsis, lo que mejora la eficiencia del procesamiento de la información^{9,12}.

En este contexto, se ha comprobado que tanto la eliminación de la función de las interneuronas SST+ en el DG y en el hipocampo como la inhibición de los fenómenos de plasticidad sináptica durante el aprendizaje provocan alteraciones en la formación de la memoria de ubicación de objetos y asociada al miedo^{13,29,30}.

En primer lugar, los estudios de manipulación de interneuronas SST+ han indicado que su función es importante para la adquisición de la memoria espacial. Se ha comprobado que tanto el silenciamiento de interneuronas SST+ en la subregión CA1 del hipocampo como la inhibición de la LTP en estas interneuronas en el hilio del DG en pruebas de ubicación de objetos informan que los ratones tratados presentaban una menor actividad exploratoria tras la reubicación de objetos, indicando que no eran capaces de discernir entre la situación planteada durante el entrenamiento y la nueva situación^{13,29}. Este hecho señaló la aparición de defectos en el aprendizaje espacial y en la adquisición de la memoria de reconocimiento de objetos, lo que llevó a los autores a sugerir que las interneuronas SST+ cumplen una función relevante durante la codificación y la separación de patrones espaciales diferentes asociados a objetos y en la integración de la información durante el aprendizaje espacial^{13,29}.

Asimismo, el truncamiento de las funciones de las interneuronas SST+ y de los eventos de plasticidad sináptica también producen alteraciones en la

formación de la memoria del miedo contextual. En un estudio realizado en ratones que fueron expuestos a una prueba de condicionamiento al miedo en el que silenciaron optogenéticamente las interneuronas SST+ del DG durante el aprendizaje se observó la aparición de un fenotipo cognitivo de miedo generalizado, caracterizado por la presencia de recuerdos de miedo más intensos pero menos específicos hacia los estímulos aversivos con los que se entrenó a los animales¹². Por otro lado, la inhibición de la LTP en interneuronas SST+ presentes en la subregión CA1 del hipocampo inmediatamente después del entrenamiento de los ratones con estímulos aversivos indicó que los animales no permanecían inmóviles al ser reexpuestos a la misma situación, lo que evidenció una alteración en la formación de la memoria del miedo, debida, según sugieren los autores, a una incorrecta integración de la información contextual³⁰.

En el contexto del estudio del gen *Lis1*, es posible que el déficit de interneuronas SST+ observado en el DG y en el hipocampo de los ratones *Lis1*-SST KO conduzca al desarrollo de un fenotipo cognitivo similar al observado en los ratones tras el silenciamiento de las interneuronas SST+ en las tareas de aprendizaje espacial y de condicionamiento al miedo, puesto que una reducción en su número debería conducir *a priori* a una pérdida del control inhibitorio en los circuitos hipocámpales y del DG por parte de este subtipo neuronal. Por ello, sería interesante realizar estudios cognitivos específicos en los ratones *Lis1*-SST KO para comprobar si se producen alteraciones durante el aprendizaje y la formación de la memoria espacial y asociada al miedo contextual similares a las descritas, lo cual a su vez también podría ayudar a vincular una posible alteración del funcionamiento de las interneuronas SST+ con la adquisición de los defectos cognitivos observados en los modelos mutantes para *Lis1* tradicionales.

En línea con estas observaciones, un estudio electrofisiológico realizado en ratones *Lis1*^{+/-} mostró alteraciones en la plasticidad sináptica de las células granulares del DG²¹. Por ello, sería interesante comprobar si este fenómeno también se produce en las interneuronas SST+ del DG y del hipocampo en los ratones *Lis1*-SST KO, lo que podría sugerir una posible relación entre los defectos en la plasticidad sináptica en interneuronas SST+ durante el aprendizaje y las alteraciones en la formación de la memoria espacial y asociada al miedo.

Por último, los estudios descritos en este epígrafe sugieren que las interneuronas SST+ del DG y del hipocampo pueden desempeñar una función relevante en la formación de la memoria asociada al miedo contextual^{12,30}. Dado que este tipo de memoria parece no haber sido analizada en estudios cognitivos previos realizados en ratones mutantes para *Lis1*, sería interesante comprobar si los ratones Lis1-SST KO presentan alteraciones en la formación de este tipo de memoria así como en otros tipos distintos de la memoria espacial, lo cual podría ayudar a comprender mejor la relación existente entre los defectos en la expresión del gen *Lis1* y el establecimiento de fenotipos cognitivos aberrantes asociados a los trastornos en el neurodesarrollo, así como su vinculación a signos y síntomas específicos en entidades clínicas definidas en humanos como son la lisencefalia o algunas formas de retraso mental o esquizofrenia.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que podemos extraer de este trabajo en relación a los objetivos específicos planteados en el mismo son que la eliminación completa de la expresión del gen *Lis1* en interneuronas SST+ produce una reducción significativa y de magnitud similar tanto en su número como en su densidad en el hilio del DG y en el *stratum oriens* del hipocampo de los ratones Lis1-SST KO respecto a los controles a P30, mientras que el mantenimiento de, al menos, una copia activa del gen es suficiente para obtener un fenotipo estructural normal.

Por ello, la conclusión general del estudio es que la eliminación selectiva del gen *Lis1* en interneuronas SST+ provoca alteraciones en su desarrollo en el DG y el hipocampo que son observables durante el desarrollo postnatal, siendo necesarios estudios complementarios para indagar en qué eventos del desarrollo embrionario y/o postnatal se ven afectados por la pérdida de expresión de *Lis1*.

Asimismo, nuestros resultados sugieren, junto con la literatura científica disponible, que los ratones Lis1-SST KO pueden presentar un fenotipo cognitivo aberrante que debería ser caracterizado en el futuro a través de diversos estudios funcionales propuestos, con el fin de profundizar en la comprensión de la relación existente entre la función del gen *Lis1* y la etiología de ciertos rasgos cognitivos aberrantes asociados a los trastornos en el neurodesarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Capítulo 27, Corteza cerebral: isocórtex y allocórtex; tipos y áreas isocorticales. En: Puelles López L, director. Neuroanatomía. 1ª edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 202-10
2. Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Capítulo 30, Allocórtex hipocámpico y su mesocórtex. En: Puelles López L, director. Neuroanatomía. 1ª edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 202-10
3. Van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(4):272-82
4. Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, Tricoire L, Wester JC, McBain CJ. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol Rev*. 2017;97(4):1619-47
5. Becker S. Chapter 7, Marr's theory of the hippocampus as a simple memory: Decades of subsequent research suggest it is not that simple. En: Vaina LM, Passingham RE, editores. Computational Theories and their Implementation in the Brain: The legacy of David Marr. 1ª edición. Boston (USA); Editorial Oxford Academic; 2016. p. 159-78
6. Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(1):65-75
7. Rolls ET, Treves A. A theory of hippocampal function: New developments. *Prog Neurobiol*. 2024;238:102636
8. Llorca A, Deogracias R. Origin, Development, and Synaptogenesis of Cortical Interneurons. *Front. Neurosci*. 2022;16:929469
9. Honoré E, Khlaifia A, Bosson A, Lacaille JC. Hippocampal Somatostatin Interneurons, Long-Term Synaptic Plasticity and Memory. *Front Neural Circuits*. 2021;15:687558
10. Katona I, Acsády L, Freund TF. Postsynaptic targets of somatostatin-immunoreactive interneurons in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 1999;88(1):37-55

11. Szőnyi A, Sos KE, Nyilas R, Schlingloff D, Domonkos A, Takács VT, et al. Brainstem nucleus incertus controls contextual memory formation. *Science*. 2019;364(6442):eaaw0445
12. Stefanelli T, Bertollini C, Lüscher C, Muller D, Mendez P. Hippocampal Somatostatin Interneurons Control the Size of Neuronal Memory Ensembles. *Neuron*. 2016;89(5):1074-85
13. Honoré E, Lacaille JC. Object location learning in mice requires hippocampal somatostatin interneuron activity and is facilitated by mTORC1-mediated long-term potentiation of their excitatory synapses. *Mol Brain*. 2022;15(1):101
14. Hofmann G, Balgooyen L, Mattis J, Deisseroth K, Buckmaster PS. Hilar somatostatin interneuron loss reduces dentate gyrus inhibition in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2016;57(6):977-83
15. Leventer R. Lissencephaly type I. En: Aminoff MJ, Boller F, Swaab DF, editores. *Handbook of Clinical Neurology*. 3ª edición. San Francisco (USA); Editorial Elsevier; 2007. p. 205-18
16. Tabarés-Seisdedos R, Escámez T, Martínez-Giménez JA, Balanzá V, Salazar J, Selva G, et al. Variations in genes regulating neuronal migration predict reduced prefrontal cognition in schizophrenia and bipolar subjects from mediterranean Spain: a preliminary study. *Neuroscience*. 2006;139(4):1289-300
17. 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
18. McKenney RJ, Vershinin M, Kunwar A, Vallee RB, Gross SP. LIS1 and NudE induce a persistent dynein force-producing state. *Cell*. 2010;141(2):304-14
19. Hirotsune S, Fleck MW, Gambello MJ, Bix GJ, Chen A, Clark GD, et al. Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet*. 1998;19(4):333-9
20. Fleck MW, Hirotsune S, Gambello MJ, Phillips-Tansey E, Soares G, Mervis RF, et al. Hippocampal abnormalities and enhanced excitability in a murine model of human lissencephaly. *J Neurosci*. 2000;20(7):2439-50

21. Hunt RF, Dinday MT, Hindle-Katel W, Baraban SC. LIS1 deficiency promotes dysfunctional synaptic integration of granule cells generated in the developing and adult dentate gyrus. *J Neurosci.* 2012;32(37):12862-75
22. Jones DL, Baraban SC. Inhibitory inputs to hippocampal interneurons are reorganized in Lis1 mutant mice. *J Neurophysiol.* 2009;102(2):648-58
23. 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
24. Pombero A, García-López R, Geijo-Barrientos E, Martínez S. Selective Lis1 inactivation disrupts migration and positioning of cortical somatostatin interneurons. *Sci Rep.* 2026;16(1):7330
25. Alleninstitute.org. Allen Brain Atlas: Mouse Brain [sede Web]. Seattle: Allen Institute; 2006 [actualizada 21 abr 2011; citado 6 may 2026]. Disponible en: <https://mouse.brain-map.org/static/atlas>
26. Dinday MT, Girsakis KM, Lee S, Baraban SC, Hunt RF. PAFAH1B1 haploinsufficiency disrupts GABA neurons and synaptic E/I balance in the dentate gyrus. *Sci Rep.* 2017;7(1):8269
27. Sudarov A, Gooden F, Tseng D, Gan WB, Ross ME. Lis1 controls dynamics of neuronal filopodia and spines to impact synaptogenesis and social behaviour. *EMBO Mol Med.* 2013;5(4):591-607
28. Paylor R, Hirotsune S, Gambello MJ, Yuva-Paylor L, Crawley JN, Wynshaw-Boris A. Impaired learning and motor behavior in heterozygous Pafah1b1 (Lis1) mutant mice. *Learn Mem.* 1999;6(5):521-37
29. Grigoryan G, Harada H, Knobloch-Bollmann HS, Kiliyas A, Kaufhold D, Kulik A, et al. Synaptic plasticity at the dentate gyrus granule cell to somatostatin-expressing interneuron synapses supports object location memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023;120(51):e231275212
30. Sharma V, Sood R, Khlaifia A, Eslamizade MJ, Hung TY, Lou D, et al. eIF2 α controls memory consolidation via excitatory and somatostatin neurons. *Nature.* 2020;586(7829):412-16

ANEXO

Nombre del tutor/a:	Raquel García López
Nombre del estudiante:	Pablo Navarro Mira
Tipo de actividad:	1. TFG (Trabajo Fin de Grado)
Título	Análisis cuantitativo de interneuronas somatostatina-positivas en el hipocampo y giro dentado tras la pérdida del gen <i>Lis1</i> .
Evaluación de riesgos laborales	No solicitado/No procede
Evaluación ética humanos	No solicitado/No procede
Código provisional:	260426104358
Código de autorización COIR	TFG.GFA.RGL.PNM.260426
Caducidad	2 años

Figura 1. Certificado de Investigación Responsable emitido por la Oficina de Investigación Responsable (OIR) de la Universidad Miguel Hernández de Elche.



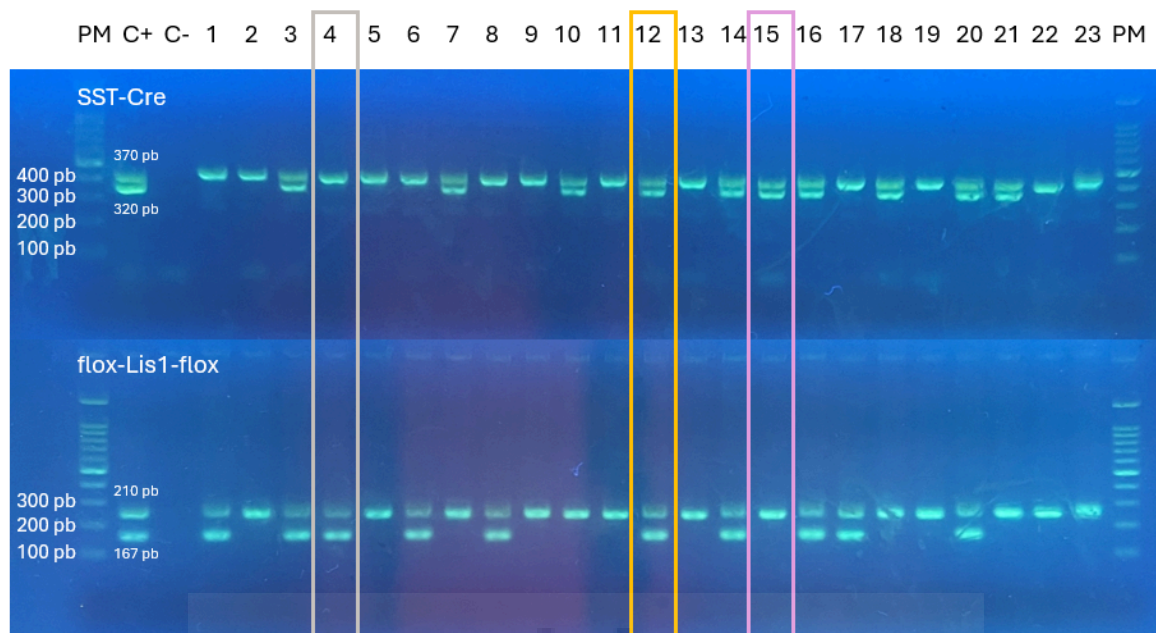


Figura 2. Genotipado de animales de experimentación. En la imagen se muestra el resultado de un ensayo de genotipado de una camada de 23 ratones de la cepa SST-Cre. En el ensayo se realizó la amplificación de las construcciones SST-Cre (arriba) y flox-Lis1-flox (abajo), ambas en presencia de un marcador de peso molecular (PM), un control positivo (C+) y un control negativo (C-). La amplificación de la construcción SST-Cre puede dar como resultado dos tipos de bandas de diferente peso molecular, una de 370 pb (secuencia del gen *Sst*) y una de 320 pb (secuencia del gen *Cre*); mientras que la amplificación de la construcción flox-Lis1-flox puede dar lugar a bandas de 167 pb (secuencia de *Lis1*) y 210 pb (secuencia de *Lis1* floxada). El caso 4 (rectángulo gris) muestra un ejemplo de un ratón incluido en el grupo control Cre-negativo (WT; *Lis1* fl/+), ya que no presenta la banda correspondiente al gen *Cre* y es heterocigoto para la construcción flox-Lis1-flox. El caso 12 (rectángulo naranja) muestra un ratón incluido en el grupo control Cre-positivo (*Cre*/+; *Lis1* fl/+), puesto que presenta la banda correspondiente al gen *Cre* y es heterocigoto para la construcción flox-Lis1-flox. Por último, el caso 15 (rectángulo rosa) muestra un ratón incluido en el grupo mutante Lis1-SST KO (*Cre*/+; *Lis1* fl/fl), ya que presenta la banda correspondiente al gen *Cre* y es homocigoto para el alelo flox-Lis1-flox. Además, todos los ratones incluidos en el estudio debían presentar la banda correspondiente a la secuencia del gen *Sst* (370 pb, imagen superior) tras la amplificación por PCR de la construcción SST-Cre.

		Giro dentado (hilio)		
		Nº células SST+	Volumen (μm^3)	Densidad (nº cel./ μm^3)
Grupo control Cre-negativo (WT; <i>Lis1</i> fl/+)	Caso 1	3455	0,083	41414
	Caso 2	5319	0,272	19544
	Caso 3	3590	0,095	37861
	Caso 4	3042	0,150	20292
	Caso 5	3712	0,137	27166
Grupo control Cre-positivo (<i>Cre</i> /+; <i>Lis1</i> fl/+)	Caso 1	3385	0,097	34761
	Caso 2	4817	0,187	25822
	Caso 3	5291	0,172	30772
	Caso 4	3862	0,134	28713
	Caso 5	3554	0,166	21408
Grupo mutante <i>Lis1</i> -SST KO (<i>Cre</i> /+; <i>Lis1</i> fl/fl)	Caso 1	811	0,138	5883
	Caso 2	1755	0,175	10009
	Caso 3	795	0,163	4869
	Caso 4	882	0,231	3826
	Caso 5	388	0,203	1913

Tabla 1. Datos primarios obtenidos tras el análisis cuantitativo de células SST+ en el hilio del DG a P30. La tabla muestra los valores de número de células SST+ totales, volumen del hilio del DG y densidad de interneuronas SST+ para cada hemisferio cerebral analizado en cada grupo de estudio.

		Hipocampo (<i>stratum oriens</i>)		
		Nº células SST+	Volumen (μm^3)	Densidad (nº cel./ μm^3)
Grupo control Cre-negativo (WT; <i>Lis1</i> fl/+)	Caso 1	30272	0,639	47381
	Caso 2	28520	0,762	37435
	Caso 3	36097	0,912	39583
	Caso 4	24393	1,312	18597
	Caso 5	20238	1,100	18392
Grupo control Cre-positivo (<i>Cre</i> +/+; <i>Lis1</i> fl/+)	Caso 1	26022	0,620	41994
	Caso 2	23253	0,721	32253
	Caso 3	26459	0,958	27632
	Caso 4	31199	1,222	25526
	Caso 5	20343	1,041	19535
Grupo mutante <i>Lis1</i> -SST KO (<i>Cre</i> +/+; <i>Lis1</i> fl/fl)	Caso 1	7946	0,717	11084
	Caso 2	9621	0,667	14431
	Caso 3	5965	0,847	7043
	Caso 4	3150	1,071	2941
	Caso 5	8782	1,009	8701

Tabla 2. Datos primarios obtenidos tras el análisis cuantitativo de células SST+ en el *stratum oriens* del hipocampo a P30. La tabla muestra los valores de número de células SST+ totales, volumen del *stratum oriens* del hipocampo y densidad de interneuronas SST+ para cada hemisferio cerebral analizado en cada grupo de estudio.