

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

“Inactivación del gen *LIS1* en las células de Purkinje cerebelosas: un estudio morfofuncional”

Junio-2026

Autora: Maite Esteban Aguilar

Curso académico: 4º de Biotecnología

Tutor: Diego Echevarría Aza

Departamento: Histología y anatomía

Área: Anatomía y embriología humana

Instituto de Neurociencias CSIC – UMH

AGRADECIMIENTOS

A mi madre,

Gracias mamá por enseñarme a ser la persona que soy, por ser mi luz cada día que pasa, por sujetarme cada vez que me he caído en el camino de la vida y ayudar a levantarme más fuerte que nunca. Gracias por haber llenado mi vida de felicidad, amor, alegría, risas y conocimiento, has hecho de mi vida el sueño que toda niña querría vivir. Cada logro y triunfo mío lleva tu nombre y no estaría aquí de no ser por ti, porque cuando me han faltado fuerzas y pensaba que no valía has estado para enseñarme a ser una luchadora y seguir adelante. Gracias por ser mi madre, mi ejemplo a seguir y mi heroína y, por estar siempre que lo he necesitado, mi mundo no sería el mismo sin ti, te elegiría en una y mil vidas más. Ojalá pueda llegar a ser igual de buena madre que tú y dar a mis futuros hijos una felicidad tan grande que quede guardada para siempre en sus corazones como ha quedado guardada en el mío. Gracias por haber sido tú mamá.

A mi padre,

Gracias por haberme dado siempre todo porque nunca me ha faltado de nada, por ser un padre ejemplar, por enseñarme que cuando hay días grises y nublados siempre sale el sol, por enseñarme que todo esfuerzo tiene su recompensa y, por tus sabios consejos cuando he tenido días malos. Gracias por preocuparte por mí y por mi futuro porque muchas veces me he sentido perdida y tú has estado para que no me preocupe y para recordarme que siempre estarás. Gracias por haberme dado una vida de la cual sentirme orgullosa y una vida donde te elegiría cada día.

A mi hermano,

por ser mi mejor amigo, el aire que respiro, porque gracias a ti sé que las buenas personas existen, por hacer que mi vida no se sienta vacía y por no haberme hecho sentir nunca sola. Todo mi mundo gira en torno a ti y a lo feliz que me haces.

Desde pequeños siempre me has cuidado y hemos confiado en el uno y en el otro más que en cualquiera. Gracias por hacer que seamos un equipo y seamos uno. Siempre estaré muy orgullosa de todo lo que has conseguido en la vida, de la persona que eres y siempre te apoyaré al igual que tu lo has hecho conmigo.

A mi novio,

Gracias por creer y confiar en mí mucho más que yo misma, por recordarme cada día lo mucho que valgo, por haberme apoyado y celebrado cada logro que he conseguido, por estar a mi lado siempre a pesar de la distancia y por elegirme cada día que pasa. Desde que nos conocimos no nos hemos vuelto a separar y para mí eres mi mayor apoyo, una estrella que me guía e ilumina a ser mejor cada día. Gracias por enseñarme lo que es el amor, por convertirte en mi compañero de vida y por ser mi cálido hogar.

A mi abuelo,

aunque ya no estés, no hay día que no me acuerde de ti, gracias por haberte sentido siempre orgulloso de mí, por todas esas veces que me cuidabas de pequeña y por todo el amor que me diste y me sigues dando desde el cielo. Para mí, no te has ido porque siempre te he sentido cerca y sé que me seguirás apoyando y viéndome crecer todos los días de mi vida.

Gracias por creer en las mujeres ingenieras y científicas y por animarme a ser una más.

A mí misma,

por no haberte dado por vencida cuando los días y las horas se volvían complicados, por no haber tirado la toalla cuando pensabas que no podías, por todas esas noches desvelada que pasabas estudiando de madrugada, por saber adaptarte a los cambios y por todas las buenas amistades que encontraste y que fueron un apoyo imprescindible en este camino. Ha sido un largo y duro camino, pero a la vez precioso e inolvidable. Gracias por todo el esfuerzo que has dedicado porque al final ha valido la pena ya que te has dado cuenta de lo fuerte que eres y de que todos esos sueños y metas que tenías con nueve años se han cumplido. Estoy muy orgullosa de la persona en la que te has convertido porque estos años no solo te han servido para desarrollarte a nivel profesional sino para afrontar todos los retos que pone la vida cada día. Sé que puedes con todo lo que te propongas y que este solo es el principio de una vida llena de nuevas aventuras.



RESUMEN

El gen *LIS1* es un gen conocido por su importante papel en la migración neuronal durante la etapa del desarrollo embrionario, pero cuando presenta mutaciones da lugar a un trastorno del neurodesarrollo denominado lisencefalia. Se han llevado a cabo amplios estudios en el cerebro, pero este trabajo se centrará especialmente en analizar la función implicada del gen *LIS1* en el desarrollo, morfología y crecimiento de las células de Purkinje del cerebelo.

Para ello, se silencia el gen *LIS1* específicamente en aquellas neuronas que expresan CaMKIIa desde el nacimiento. Para realizar el estudio, se utilizó un modelo de ratón mutante que no presentaba el gen *LIS1* debido a un sistema Cre-LoxP en el que los ratones P0 se inyectan con tamoxifeno, lo que activa una enzima llamada Cre que silencia el gen *LIS1* únicamente en aquellas neuronas de Purkinje que expresen CaMKIIa y, a través de un estudio morfológico y sináptico mediante microscopía confocal y el programa ImageJ, se espera observar ciertas diferencias significativas a nivel estructural entre los ratones mutantes y wild type, como cambios en la ramificación dendrítica o en la excitación sináptica.

Estos cambios y diferencias podrían indicar que el gen *LIS1* no solo puede estar implicado en la migración neuronal durante el desarrollo embrionario, sino también en el crecimiento, desarrollo y maduración de las neuronas de Purkinje cerebelosas tras el nacimiento.

Palabras clave: lisencefalia, ratón, CaMKIIa, cerebelo, Purkinje, postnatal.

ABSTRACT

The *LIS1* gene is a gene known for its important role in neuronal migration during the embryonic development stage, but when it has mutations, it leads to a neurodevelopmental disorder called lissencephaly. Extensive studies have been carried out in the brain, but this work will focus especially on analyzing the involved function of the *LIS1* gene in the development, morphology, and growth of Purkinje cells in the cerebellum. For this, the *LIS1* gene will be silenced specifically in those neurons that express CaMKIIa from birth.

For this, the *LIS1* gene is specifically silenced in those neurons that express CaMKIIa from birth. To carry out the study, a mutant mouse model that lacked the *LIS1* gene was used, due to a Cre-LoxP system in which P0 mice are injected with tamoxifen, which activates an enzyme called Cre that silences the *LIS1* gene only in those Purkinje neurons that express CaMKIIa. Through a morphological and synaptic study using confocal microscopy and the ImageJ program, certain significant structural differences are expected to be observed between the mutant and wild type mice, such as changes in dendritic branching or in synaptic excitation.

These changes and differences could indicate that the *LIS1* gene might not only be involved in neuronal migration during embryonic development but also in the growth, development, and maturation of cerebellar Purkinje neurons after birth.

Keywords: lissencephaly, mouse, CaMKIIa, cerebellum, Purkinje, postnatal.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Genética y alteraciones moleculares en la lisencefalia.....	6
1.2 Gen <i>LIS1</i>	7
1.3 El papel de <i>LIS1</i> en las células progenitoras neuronales.....	8
1.4 Sistema cerebeloso: relación estructura-función.....	9
1.5 Morfología y estructura del núcleo olivar inferior.....	10
1.6 Desarrollo y morfología de las células cerebelosas de Purkinje.....	11
1.7 Desarrollo dendrítico durante la etapa neonatal y postnatal.....	12
1.8 Cómo afecta la expresión de CaMKIIa en el cerebelo.....	12
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 Uso del sistema Cre-LoxP para generar ratones mutantes de <i>LIS1</i>	14
3.2 Determinación del genotipo de los ratones.....	16
3.3 Obtención de muestras experimentales: preparación del tejido cerebeloso y cortes en el microtomo de congelación.....	19
3.4 Inmunohistoquímica: inmunofluorescencia.....	19
3.5 Inmunohistoquímica: tinción con DAB.....	21
3.6 Programa informático: ImageJ para análisis de imágenes en microscopía confocal.....	23
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXOS.....	34

INTRODUCCIÓN

1.1 Genética y alteraciones moleculares en la lisencefalia

La lisencefalia es una enfermedad cerebral grave del desarrollo caracterizada por la deslocalización de neuronas corticales incluyendo malformaciones raras del desarrollo cortical [1,3]. Es un trastorno de la migración neuronal que se caracteriza principalmente por presentar una ausencia o reducción de giro, una corteza más ensanchada de lo habitual además de mal organizada y lisa, por ello la condición se traduce como “Cerebro suave” [1,4,5]. Además, esta enfermedad conduce a presentar, a parte de una superficie cerebral lisa, retraso mental y convulsiones [2,4]. En este trastorno, las neuronas no son capaces de migrar de forma óptima hacia capas superficiales de la corteza cerebral generando una reducción de las circunvoluciones cerebrales, lo que ocasiona una superficie del cerebro con menos pliegues de lo normal y aquellas neuronas que no consiguen llegar a la superficie se acumulan en capas más profundas de la sustancia blanca generando una capa subcortical llamada heterotopía en banda [6].

El progreso en genética molecular ha identificado 31 genes asociados a la lisencefalia con un rendimiento diagnóstico global superior al 80% [3]. Los dos genes más comunes mutados en pacientes que presentan lisencefalia son *LIS1* y *DCX* [4]. *LIS1* fue el primer gen clonado importante para la migración neuronal en cualquier organismo y, en la mayoría de los pacientes que presentan la enfermedad se ha visto que existen mutaciones o deleciones heterocigotas de *LIS1*, mientras que en pacientes de género masculino con lisencefalia ligada al cromosoma X se observaron mutaciones en *DCX* [2,4].

Existen varios tipos de lisencefalia, entre ellas la más común es la aislada, también conocida como lisencefalia clásica o de tipo 1 [5]. La lisencefalia de tipo 1 se asocia generalmente a una deleción heterocigota de todo el gen *LIS1*. [5]. En este tipo de lisencefalia se dan problemas en la formación de los pliegues del cerebro ocurriendo de dos formas: Agiria donde no se forman los pliegues habituales quedando una superficie cerebral completamente lisa y Paquigiria donde se forman pliegues, pero más grandes, gruesos y en menos cantidad de lo normal [6]. En el tipo 2 de lisencefalia, el problema es mayor pues aparte de que las neuronas no son capaces de llegar de forma correcta a la corteza cerebral, se forman cúmulos de neuronas desorganizadas y apelotonadas sin seguir una estructura o patrón claros [6]. Este último tipo de lisencefalia se ha asociado a varios tipos de síndromes genéticos como la distrofia muscular de Fukuyama, la enfermedad músculo-ojo-cerebro de Santavuori o el síndrome de Meckel-Gruber [6].

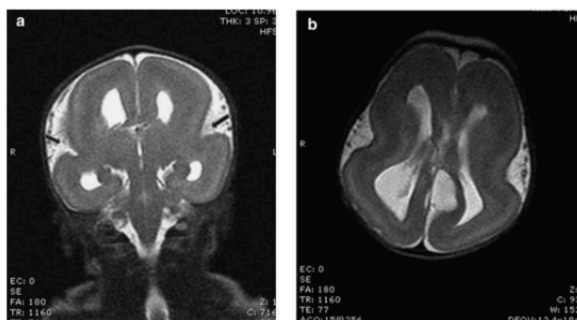


Figura 1. Resonancia magnética cerebral (RM) que muestra rasgos de la lisencefalia clásica (Agiria y Paquigiria): (a) vista coronal donde se halla un engrosamiento de corteza cerebral y cisuras muy amplias (indicadas con las flechas negras) ; (b) vista axial que muestra ausencia completa de giros y surcos generando una superficie completamente lisa [38].

1.2 Gen *LIS1*

La lisencefalia clásica se produce por mutaciones esporádicas en el gen humano *LIS1*, que está implicado en la regulación de la proteína motora del microtúbulo citoplasmático dineína, de forma que los defectos en el movimiento dininmediado podrían ser los responsables de la enfermedad de lisencefalia [7]. *LIS1* fue el primer gen clonado en un organismo importante para la migración neuronal, ya que fue eliminado o mutado en pacientes con lisencefalia de forma heterocigota [2,4]. El gen *LIS1* consta de 11 exones, 10 de los cuales codifican la proteína LIS1, llamada PAFAH1B1, que contiene un dominio de homología LisH, un dominio de bobina enrollada y 7 repeticiones WD40 [10]. Estudios en organismos modelo, como por ejemplo *Aspergillus nidulans* o ratones, indican una vía evolutivamente conservada que involucra a LIS1 y la dineína citoplasmática [2,8]. Posteriormente, se descubrió que LIS1 se asociaba físicamente con dos ortólogos NudE, Ndel y su isoforma Ndel1, lo que refuerza que el gen *LIS1* está implicado en la regulación de la dineína citoplasmática [8]. La inhibición de la dineína culminó en defectos similares tanto en el acoplamiento núcleo – centrosoma como en la migración neuronal, lo que sugiere que estos defectos contribuyen a defectos migratorios presentes en la lisencefalia [8].

El gen *LIS1* ha sido identificado en dos rutas biológicas (Figura 2) ya que codifica para una proteína de 45 KDa llamada PAFAH1B1 necesaria para una migración neuronal óptima por dos mecanismos propuestos: como proteína asociada a microtúbulos y como una subunidad del factor activador de plaquetas enzimática acetilhidrolasa [7,9]. La primera función descubierta fue que la proteína LIS1 formaba parte de la enzima PAFAH-1b, una enzima implicada en la desactivación del factor activador de plaquetas mensajero lipídico [7]. En experimentos con ratones se eliminó la enzima y se mostró que el cerebro se desarrollaba con normalidad por lo que esta función no explicaba la lisencefalia [7]. Por ello, estudios posteriores demostraron una segunda función del gen *LIS1* [7]. Se trataba de una interacción de la proteína LIS1 con la dineína citoplasmática y con proteínas reguladoras asociadas como NudE, NDEL1 y NDE1, formando un importante complejo implicado en el posicionamiento nuclear, el transporte intracelular y la migración neuronal [7]. Es una vía esencial para el desarrollo de la corteza cerebral ya que permite el desplazamiento adecuado y correcto de las neuronas hacia las capas corticales definitivas y, cuando el sistema falla por mutaciones en el gen *LIS1*, las neuronas no llegan a sus capas de destino y causan lisencefalia [7].

Estudios descubrieron un ortólogo de LIS1, NudF, se identificó como regulador de la función citoplasmática de la dineína en el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* donde las mutaciones en *NudF* resultaron en el mismo fenotipo observado para la dineína citoplasmática, es decir, la falta de distribución de los núcleos a lo largo de los procesos de las hifas [7].

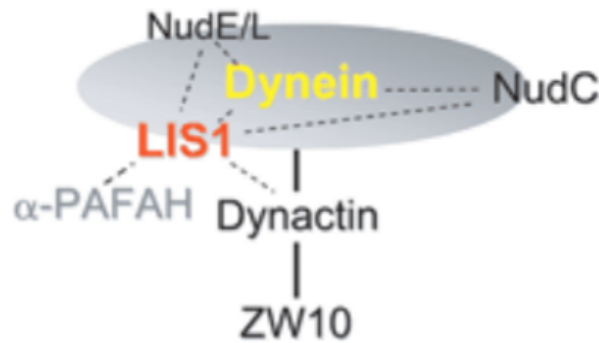


Figura 2. Interacciones de LIS1 con la dineína citoplasmática, el complejo dinactina y las proteínas asociadas NudE, NudEL y NudC. Solo las interacciones entre LIS1 y la dineína citoplasmática provocan lisencefalia [7].

1.3 El papel de *LIS1* en las células progenitoras neuronales

Las células progenitoras neuronales son “células madre” adultas del sistema nervioso central que tienen la capacidad de ser autorrenovables, proliferativas y multipotentes [11]. Se ha visto que la neurogénesis, nacimiento de nuevas neuronas, ocurre constitutivamente en dos regiones específicas del cerebro adulto de mamíferos, el bulbo olfatorio y el giro dentado del hipocampo donde existen múltiples precursores neuronales [11].

LIS1 es una proteína esencial en el desarrollo del cerebro pues regula el comportamiento de las células progenitoras neuronales, aquellas que generan nuevas neuronas [7]. Existen estudios llevados a cabo en cerebros de ratas embrionarias para silenciar la función de *LIS1* y de la dineína donde usaron fragmentos pequeños de ARN para bloquear el gen *LIS1* y marcadores fluorescentes para observar las neuronas [7]. Estos estudios demostraron que cuando hay una reducción de la función de *LIS1* o dineína, las células progenitoras neuronales no se desplazan de forma habitual, generando una acumulación en la zona subventricular, indicando problemas de movilidad neuronal [7].

En un caso de normalidad, el desarrollo del cerebro consistiría en que las células progenitoras se dividen para generar nuevas células donde algunas de ellas se convierten en neuronas jóvenes que pueden migrar hacia la zona de la corteza cerebral [7]. Cuando *LIS1* está silenciado, este sistema de desplazamiento falla pues las células se dividen, pero no tienen la capacidad de poder migrar adecuadamente y se quedan atrapadas en zonas intermedias (zona subventricular), además de presentar un movimiento lento, descontrolado y desorganizado [7].

Existen unas células esenciales en el desarrollo de la neocorteza llamadas células gliales radiales, unas células progenitoras neuronales con extensas prolongaciones de la zona subventricular hasta la pial [7]. Se caracterizan principalmente por presentar un movimiento característico, la oscilación nuclear intercinética, un movimiento clave del núcleo para su correcta división y función [7]. Cuando *LIS1* está silenciado, estos movimientos se detienen quedando el núcleo en posiciones al azar [7]. Aunque la morfología celular se mantiene intacta, esto indica que *LIS1* es necesario para la nucleoquinesis. A su vez, la inhibición de *LIS1* provoca que en la zona subventricular exista una acumulación de células con morfología multipolar pues la transición habitual a células bipolares queda bloqueada y, por tanto, su migración también [7]. Aunque algunas pocas células alcancen el estado bipolar y lleguen a la zona intermedia, el soma

no se desplaza correctamente, significando que *LIS1* es esencial para el movimiento nuclear [7]. Además, el crecimiento de los axones se reduce, sugiriendo que *LIS1* está implicado en la elongación de los axones [7].

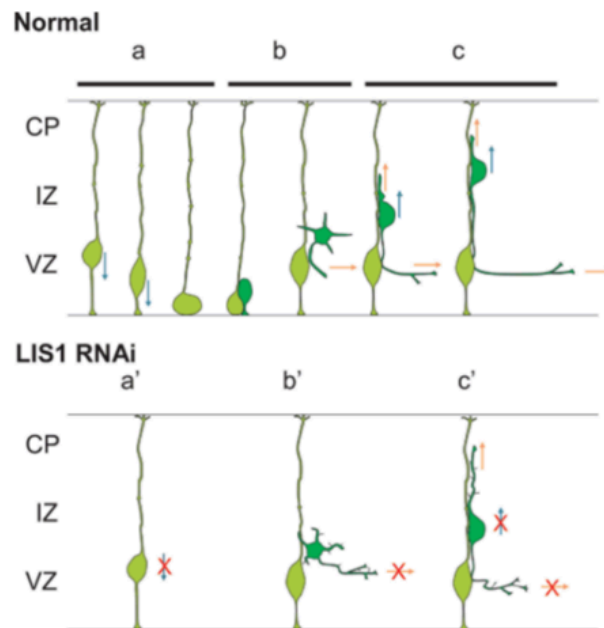


Figura 3. Representación de la formación y migración neuronal en la neocorteza fetal. **Normal:** a) división de las células gliales radiales (progenitores neuronales) con oscilación nuclear intercinética; b) estado multipolar en zona subventricular; c) estado bipolar y migración hacia la superficie. **LIS1 RNAi:** a) detención de las oscilaciones y bloqueo de la división celular; b) bloqueo de transición de multipolar a bipolar y acortación de axones; c) migración fallida del soma [7].

1.4 Sistema cerebeloso: relación estructura-función

El cerebelo es una estructura del sistema nervioso presente en todos los vertebrados [12]. Es una estructura cristalina organizada en folias, unos pliegues que se sitúan de forma secuencial uno detrás de otro a lo largo del eje rostrocaudal y de forma transversal en torno al tronco encefálico, una organización que aporta mayor superficie de la corteza cerebelosa generando mayor complejidad funcional [12]. Existe una explicación evolutiva acerca del origen de las folias pues se pensaba que surgieron para aumentar la superficie del cerebelo, concentrar más neuronas y poder establecer más conexiones [15]. Actualmente, existen estudios que confirman la teoría del incremento de superficie y, además, demuestran que participan como unidades funcionales que organizan los circuitos cerebelosos de forma específica [15]. Se ha descubierto que los pliegues comienzan a formarse en unas zonas específicas llamadas “Centros de anclaje” donde las células precursoras se multiplican y engrosan la zona hacia el interior, creando invaginaciones que serán el comienzo del pliegue [15]. A su vez, las células granulares se organizan y son guiadas por las fibras gliales de Bergmann para favorecer el plegamiento de la folia de forma correcta [15].

El cerebelo desempeña un papel importante en el control de funciones motoras como la coordinación, el equilibrio, la postura y el aprendizaje hábil [13]. Además, cada vez hay más pruebas de que podría estar implicado también en funciones no motoras como la cognición, las emociones, el lenguaje y una excelente coordinación en el procesamiento

propioceptivo - motor [13,15]. De esta forma, los defectos cerebelosos están asociados a una gran variedad de enfermedades incluyendo ataxia, distonía, temblores, esquizofrenia, dislexia y trastorno del espectro autista [13].

El cerebelo está formado por sustancia gris, que se organiza en dos niveles: la corteza cerebelosa, en la periferia y los núcleos profundos, en el interior y, sustancia blanca, formada por fibras intrínsecas, aferentes y eferentes, que conectan el cerebelo con otras estructuras del sistema nervioso [14]. La corteza cerebelosa se compone de tres capas: la capa molecular, que es la más superficial, la capa media o de células de Purkinje, y la capa profunda o granulosa [14]. En la corteza cerebelosa se encuentran cinco tipos de neuronas: células de Purkinje, células cesto, células estrelladas, células granulosas y células de Golgi [12]. Entre todas estas neuronas mencionadas anteriormente, las únicas que presentan una función excitatoria son las células granulares mientras que el resto presentan una función inhibitoria, lo que permite ajustar la actividad motora [12]. La información se transmite al cerebelo a través de dos tipos de fibras aferentes (fibras musgosas y trepadoras) que transportan información de origen somatosensorial, vestibular, acústico y visual, así como de corteza cerebral y otros centros motores del tronco encefálico y espinal [12].

La información procesada por la corteza cerebelosa sale a través de los axones de las células de Purkinje a los núcleos cerebelosos profundos que enviarán la información a distintas partes del tronco encefálico y también a la corteza cerebral de forma indirecta, ya que la información pasará antes por el tálamo [12]. Desde una perspectiva funcional, el cerebelo no actúa como un único sistema sino como un sistema formado por módulos repetitivos donde cada módulo posee una estructura parecida pero la información que reciben procede de diferentes fuentes y envían sus señales a distintos puntos de destino [12].

1.5 Morfología y estructura del núcleo olivar inferior

La morfología del núcleo olivar inferior consta de una organización en grupos de hasta 8 neuronas, cuyas dendritas están integradas en estructuras de glomérulos y están inervadas tanto por entradas sinápticas excitatorias como inhibitorias [40]. El núcleo olivar inferior de la rata consta de tres subdivisiones: la oliva accesoria medial (MAO), la oliva accesoria dorsal (DAO) y la oliva principal (PO) [39]. La MAO está formada por tres láminas: horizontal (proyecta hacia una zona sagital del lóbulo anterior vermiano), vertical (proyecta hacia una zona sagital del vermis posterior) y rostral (proyecta hacia el cerebelo lateral) [39]. La DAO está formada por dos láminas: pliege dorsal (proyecta hacia el lóbulo anterior vermiano y recibe aferencias de la médula espinal) y el pliegue ventral (proyecta hacia una zona sagital de los núcleos de las columnas dorsales) [39]. La PO está formada por dos láminas clásicas, dorsal y ventral, que proyectan hacia una franja sagital específica del cerebelo lateral y que son capaces de procesar información procedente de sistemas ascendentes y descendentes distintos [39]. Las neuronas del núcleo olivar inferior se distribuyen en bandas y se proyectan hacia la corteza cerebelosa de forma que las regiones rostrales del núcleo olivar conectan principalmente con los hemisferios cerebelosos laterales mientras que las regiones caudales conectan hacia la vermis [39].

La red inferior del núcleo olivar, una de las primeras redes eléctricamente acopladas en el cerebro de los mamíferos, posee una entrada excitatoria primaria a la corteza cerebelosa [40]. El objetivo principal de esta red es generar actividad sincrónica en neuronas olivares, que proporcionan información temporal para procesos de aprendizaje, ejecución motora y predicciones sensoriales, de forma que la oliva inferior es esencial para el mantenimiento a largo plazo de una habilidad motora simple, como por ejemplo el reflejo H del sóleo de rata [40,41]. Tras recibir entradas motoras y sensoriales, los axones de las neuronas olivares inferiores se ramifican en varias fibras trepadoras y musgosas que se

proyectan hacia la corteza cerebelosa y los núcleos cerebelosos profundos [42]. De esta forma, las fibras musgosas hacen sinapsis sobre las células granulares en la capa profunda y granulosa de la corteza, los axones de las células granulares se extienden a lo largo de la capa molecular más externa como fibras paralelas, formando sinapsis con un gran número de dendritas celulares de Purkinje [42]. Las fibras trepadoras más gruesas hacen sinapsis directamente en la capa celular de Purkinje [42]. Así, cada fibra musgosa tiene un pequeño efecto sobre un gran número de células de Purkinje, mientras que cada fibra trepadora tiene un impacto significativo en una sola célula de Purkinje [42].

1.6 Desarrollo y morfología de las células cerebelosas de Purkinje

Las neuronas de Purkinje son, posiblemente, algunas de las más visibles del sistema nervioso central en los vertebrados y las neuronas principales de la corteza cerebelosa [16,19]. Están formadas por dendritas planas (bidimensionales) en forma de abanico que se ramifican de forma extensa, llenando el espacio del campo receptivo casi por completo sin apenas superposición [16,17,19]. Esta organización dendrítica es ideal para establecer dos tipos de sinapsis excitatorias: con las fibras paralelas, que establecen múltiples conexiones con cada una de más de 100.000 fibras paralelas que corren ortogonalmente hasta los árboles dendríticos celulares de Purkinje y, con una sola fibra trepadora, que establece muchas sinapsis con una misma neurona de Purkinje [16,17]. Las neuronas de Purkinje son la única salida de la corteza cerebelosa, de forma que la información procesada en la corteza pasa por estas neuronas antes de llegar a los núcleos profundos [16].

El desarrollo dendrítico consta de dos fases: una primera fase (antes del nacimiento y primera semana postnatal) donde las células de Purkinje tienen una estructura inmadura y el árbol está en constante crecimiento y remodelación [19]. En esta fase las células de Purkinje se alinean en monocapa y establecen conexiones con fibras trepadoras [19]. Esta fase fue conocida como “fase estrellada con dendritas desorientadas” por Ramón Y Cajal [19]. En la segunda fase (final de la primera semana hasta el primer mes postnatal) existe una rápida elongación dendrítica y una sinaptogénesis extensa entre las dendritas celulares de Purkinje y las fibras paralelas [19]. Esta fase fue conocida como “fase de orientación y aplanamiento de árboles dendríticos” por Ramón Y Cajal [19].

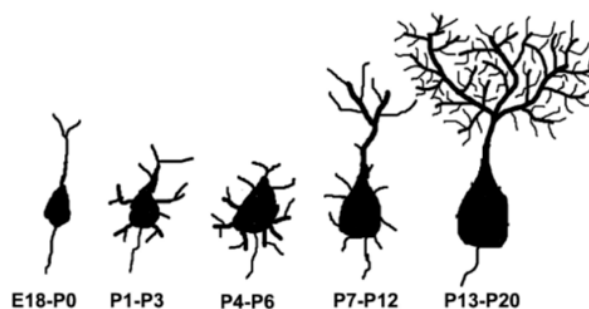


Figura 4. Representación esquemática del avance del desarrollo dendrítico de la célula de Purkinje en el roedor [19].

Tras el periodo de proliferación de los precursores de las células granulares del cerebelo, fase en la que estas células se dividen y multiplican, las células de Purkinje comienzan un proceso de remodelación completa del árbol dendrítico durante las dos primeras semanas tras el fin del periodo de proliferación [18]. Este proceso consta de dos etapas: la

primera etapa consiste en una retracción completa del árbol dendrítico primitivo previamente extenso junto con la formación de múltiples procesos de prolongaciones parecidos a filópodos que surgen del cuerpo celular y, una segunda etapa donde los procesos somáticos empiezan a desaparecer de forma progresiva junto con un rápido crecimiento y ramificación de la dendrita madura [18]. Estas dendritas maduras de las células de Purkinje poseen dos tipos de protuberancias espinosas, denominadas espinas [18]. Las espinas largas son alargadas, numerosas y están situadas en el compartimento dendrítico distal y forman sinapsis con fibras paralelas, mientras que las espinas cortas son redondeadas y emergen del compartimento proximal y establecen sinapsis con las fibras trepadoras [18].

1.7 Desarrollo dendrítico durante la etapa neonatal y postnatal

Durante el desarrollo neonatal y postnatal, las neuronas experimentan ciertos cambios morfológicos y estructurales a nivel de crecimiento y ramificación dendrítica [20]. Un estudio de Pasko Rakic llevado a cabo en el giro dentado del hipocampo demostró que el desarrollo dendrítico ocurre a lo largo de la segunda mitad de la gestación, es decir, la mayor parte del desarrollo se da antes del nacimiento (neonatal) [20]. Aquí, las dendritas crecen, aparecen conexiones y existe una maduración de las neuronas de forma progresiva donde las neuronas más maduras se ubican en los estratos superficiales de la capa granular mientras que las menos desarrolladas están en zonas profundas, lo que significa que las neuronas crecen en base a un orden específico temporal [20].

Cuando las neuronas llegan a la etapa después del nacimiento (postnatal) existe una ramificación dendrítica excesiva, cambios regionales en la longitud dendrítica, sobreproducción de espinas dendríticas y redistribución de espinas dentro de la capa molecular [20]. Durante este proceso, se da lo que se conoce como “periodo crítico” o “periodo sensible” en el que las sinapsis funcionalmente importantes se fortalecen y se estabilizan selectivamente, mientras que las conexiones innecesarias se debilitan y finalmente se eliminan [21]. La etapa final del desarrollo cerebral es representativa tanto por la formación y maduración de sinapsis como por el fenómeno de “poda sináptica” en el que se eliminan las sinapsis innecesarias para fortalecer las conexiones restantes [22]. Así pues, ciertos estudios confirman que las células gliales tienen un papel clave en este fenómeno de “poda sináptica” en diversas partes del sistema nervioso y se ha identificado un conjunto de vías de señalización críticas entre la glía y las neuronas [22]. Estudios post mortem demuestran que una “poda sináptica” insuficiente o excesiva podría culminar en diversos trastornos del neurodesarrollo como autismo, esquizofrenia o epilepsia [22].

1.8 Cómo afecta la expresión de CaMKIIa en el cerebelo

Una enzima muy abundante en el cerebro para las sinapsis excitatorias y esencial para la plasticidad sináptica, la memoria, el aprendizaje y la comunicación entre neuronas es la proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII) [23,25]. Se trata de una familia de cuatro isoenzimas (α , β , γ y δ) codificadas por diferentes genes, con empalmes alternativos que dan lugar a una mayor diversidad [24]. Es una enzima activada por el aumento intracelular de los niveles de iones calcio que desencadenan importantes procesos moleculares necesarios para la plasticidad sináptica y para fosforilar numerosas proteínas sinápticas, regulando así su estructura y funciones [25].

En el sistema nervioso, se ha observado que CaMKII presenta una distribución amplia y diferente entre las distintas secciones cerebrales [23]. Se ha demostrado que se expresa principalmente en el prosencéfalo e hipocampo, así como en

el cerebelo de forma elevada [23]. Las isoformas previamente dichas, se ha visto que varían a lo largo del desarrollo ya que en etapas tempranas del cerebelo predominan las isoformas γ y δ y en etapas adultas del cerebelo predominan las isoformas α y β que se encuentran en niveles mucho más aumentados [23]. Se ha observado en el cerebelo una gran expresión de CaMKIIa en las neuronas de Purkinje exclusivamente, el principal tipo celular ya que son un elemento esencial para el circuito cerebeloso [23]. Para poder determinar la distribución de la expresión de CaMKIIa, se desarrollaron modelos transgénicos de ratón donde se utilizó una proteína verde fluorescente llamada GFP (Green Fluorescent Protein), una proteína obtenida de la medusa *Aequorea victoria* muy utilizada para localizar proteínas y genes de interés [23]. Así, se pudo observar una fluorescencia de GFP a través del cráneo de los ratones recién nacidos con un LED azul bajo un microscopio de fluorescencia [23]. La fluorescencia en el primer día postnatal (P0) indicaba una presencia de GFP por todo el cerebro, desde el bulbo olfatorio, pasando por la corteza cerebral hasta la médula [23].

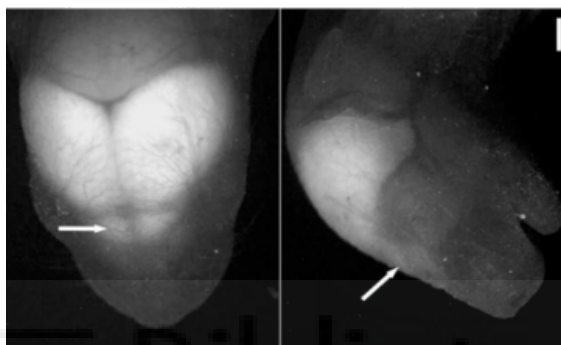


Figura 5. Representación bajo un microscopio de fluorescencia de CaMKIIa - GFP en la cabeza de ratón del día 1 postnatal desde bulbos olfatorios (flechas blancas), pasando por la corteza cerebral hasta la médula [23].

El experimento también se realizó en ratones adultos y la intensidad de la GFP en el cerebro resultó ser mayor en el postencéfalo y altamente heterogénea en las regiones cerebrales [23]. Se mostró a su vez que la fluorescencia de GFP se expresaba de forma diferente en las diversas capas de la neocorteza y corteza piriforme y que dentro de los lóbulos posteriores del cerebelo se observaba una brillante capa celular correspondiente a las células de Purkinje [23]. Concretamente el cerebelo mostró una distribución desigual de GFP entre los lóbulos anterior y posterior ya que, en los lóbulos posteriores, especialmente lóbulos IX y X, las neuronas de Purkinje estaban marcadas de forma brillante con GFP tanto en los somas como dendritas mientras que para los lóbulos anteriores y células granulares apenas hubo expresión de GFP [23].

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

A partir de los antecedentes descritos previamente, este TFG plantea la hipótesis de que la ablación del gen *LIS1* de manera específica en las células de Purkinje cerebelosas que expresan CaMKIIa desde el nacimiento, podría producir alteraciones morfológicas-funcionales durante el desarrollo del cerebelo. Objetivos:

- 1- Estudiar las alteraciones macroestructurales de la inactivación de *LIS1* en la corteza cerebelosa tras 21 días postnatales.
- 2- Estudiar las señales excitatorias provenientes del núcleo olivar inferior (fibras trepadoras) en su sinapsis con las neuronas de Purkinje tras el silenciamiento de *LIS1*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Uso del sistema Cre-LoxP para generar ratones mutantes de *LIS1*

Las recombinasas específicas de sitio (SSR) son enzimas especializadas que promueven reordenamientos de ADN específicos entre regiones objetivo-definidas [29], por lo que el sistema Cre-LoxP es una herramienta de ingeniería genética muy utilizada para la modificación de determinados genes en modelos animales, sobre todo en ratones [26]. Este sistema incluye la recombinasa Cre, una de las recombinasas específicas de la tirosina (T-SSRs), incluyendo la recombinasa flipasa (Flp) y la recombinasa de ADN de 38 KDa producida a partir del gen Cre del bacteriófago P1 [26,29]. Por ello, la Cre recombinasa es una enzima obtenida de fagos que posee una inmensa utilidad en la manipulación de secuencias de ADN [27]. Además, la Cre es capaz de dividir y ligar sus objetivos de ADN por lo que no se necesita un mecanismo de reparación de ADN si existieran errores ya que Cre genera productos de ADN intactos [27].

El proceso de este sistema consiste en la acción de la enzima Cre que es capaz de reconocer unas secuencias específicas dentro del ADN denominadas “LoxP” (Locus of x-over, P1) [26,27]. El sitio LoxP es una secuencia de 34 pb, formada por dos repeticiones invertidas y palindrómicas de 13 pb y secuencias de núcleo de 8 pb [26]. Las secuencias palindrómicas sirven como sitios específicos de reconocimiento para la Cre recombinasa y la secuencia del núcleo indica la dirección de los sitios específicos LoxP [28]. La formación del complejo Cre-LoxP comienza con la unión específica de una molécula de Cre a cada semisito [29]. Una vez que cuatro moléculas de Cre unidas a dos sitios LoxP se unen, se forma el complejo sináptico tetramérico, que está listo para la catálisis [29].

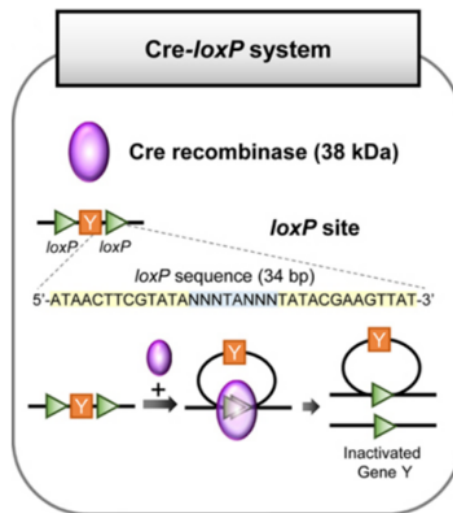


Figura 6. Sistema Cre-LoxP. La recombinasa Cre de 38 KDa reconoce las secuencias específicas LoxP de 34 pb [26].

Este sistema porta de grandes ventajas como una manipulación sencilla o que no necesita de factores adicionales para que la recombinación sea eficiente [26]. El mecanismo de recombinación consiste en que la recombinasa Cre reconoce los sitios específicos LoxP de forma directa y escinde el ADN flanqueado por estos sitios, de forma que el gen diana floxeado queda inactivo de forma dirigida [26]. Este sistema se utiliza principalmente para la escisión genética, pero también se puede inducir la inversión y translocación del ADN entre dos sitios LoxP, que lo determinará la orientación y posición de los sitios LoxP [26]. Existen tres situaciones principales: (1) se da una inversión cuando los sitios LoxP se encuentran en el mismo ADN, pero en direcciones opuestas, (2) se da una delección cuando los sitios LoxP están en el mismo ADN y en la misma orientación, (3) se da una translocación cromosómica cuando los sitios LoxP se encuentran en dos cromosomas diferentes [28].

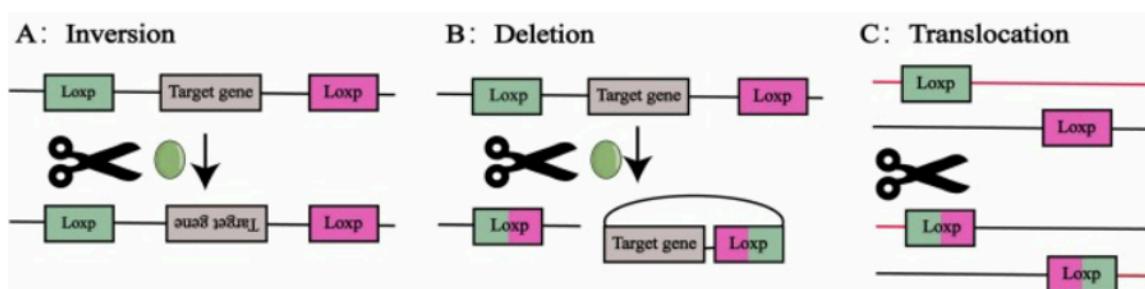


Figura 7. Acción del sistema Cre-LoxP sobre un gen diana en tres situaciones diferentes según la localización y orientación de los sitios LoxP [28].

Es importante tener en cuenta la complementariedad entre la Cre recombinasa y los sitios específicos LoxP que será una complementariedad tanto geométrica como electrostática (cargas) [27]. Se basa en dos estrategias independientes: lectura directa, cuando los aminoácidos de la enzima reconocen enlaces químicos directos con los grupos funcionales de las bases nitrogenadas expuestas, normalmente en el surco mayor del ADN y, lectura indirecta, donde no se reconocen

las bases directamente, sino que se reconoce la conformación y la flexibilidad de la doble hélice, de forma que algunas secuencias presentes en el ADN adoptan formas “especiales” que la enzima reconoce [27].

Para lograr mejores estudios funcionales genéticos, se diseñó un sistema mucho más fiable, preciso y sofisticado [26]. De esta forma, se podía controlar la actividad de Cre en un momento y lugar específico dentro de la célula [26]. Este sistema es un sistema Cre inducible, controlado por reguladores específicos determinados de cada célula, como potenciadores o promotores y es inducible de forma temporal por agentes externos como tamoxifeno o tetraciclina [26]. En el sistema Cre inducible por tamoxifeno (CreERT2/CreER) la idea general es que la enzima Cre se modifica para que sólo actúe cuando se administra tamoxifeno, de forma que se controla el momento en el que ocurre la recombinación genética [26]. Este sistema consiste en la unión de dos proteínas: Cre recombinasa y una parte modificada del receptor de estrógenos (ER-LBD) generando una proteína resultante llamada CreER [26]. Cuando no hay presencia de tamoxifeno, la proteína CreER está atrapada en el citoplasma porque se encuentra unida a HSP90 (proteína de choque térmico) y no es capaz de translocarse al núcleo, por lo que no se une a los sitios LoxP y no escinde el fragmento de ADN, quedando el gen de interés intacto [26]. Cuando se administra tamoxifeno, el tamoxifeno se une a la proteína CreER, se separa HSP90 y CreER es capaz de entrar en el núcleo, reconociendo los sitios específicos LoxP, escindiendo el gen de interés y silenciándolo, generando una recombinación genética [26].

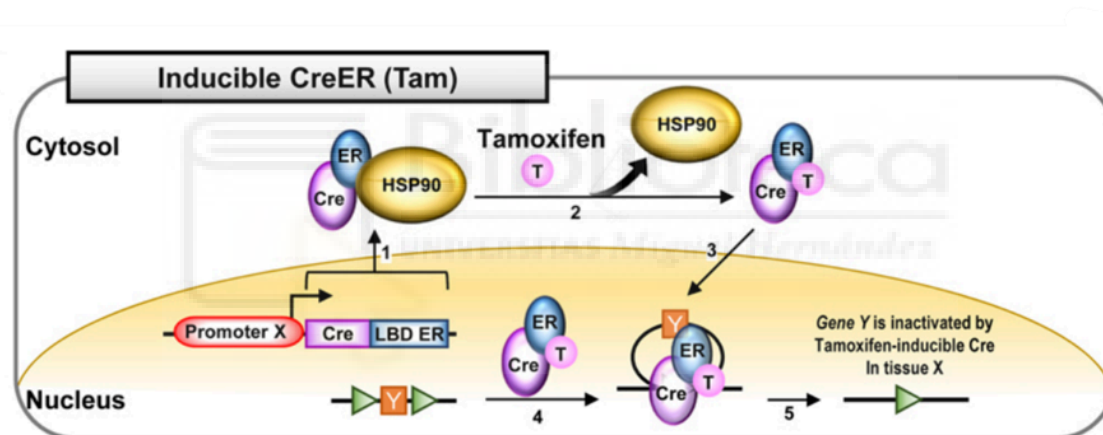


Figura 8. Sistema CreER inducible por tamoxifeno (Tam). Con la ausencia de tamoxifeno, la proteína CreER interactúa con la proteína HSP90 quedando en el citoplasma. Con la administración de tamoxifeno provoca la separación de CreER con HSP90 y se puede translocar al núcleo para realizar la recombinación genética [26].

3.2 Determinación del genotipo de los ratones

Para determinar el genotipo de los ratones utilizados, se recurrió a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ADN genómico obtenido a partir de biopsias de la cola de los ratones para la línea experimental SM49. Los productos amplificados se cargaron en un gel de agarosa y se realizó una electroforesis bajo luz ultravioleta. Se cargaron tres geles distintos, uno para cada marcador genético: CAMKII-CRE, LIS-FLOX, TOMATO, con el objetivo de saber qué ratón portaba cada gen e identificar los ratones mutantes y silvestres. De esta forma, se pudo observar diferentes bandas en los geles, identificando animales positivos o negativos para cada alelo. Aquellos ratones que presentaban dos

bandas eran heterocigotos, mostrando un alelo silvestre y otro mutante y, los que presentaban sólo una banda, eran homocigotos pudiendo tener dos alelos silvestres o dos alelos mutantes.

Cada gel presenta diferentes carriles que corresponden a los distintos ratones con los que se ha trabajado (1,2,3,4,5...) y cada banda representa el ADN genómico extraído de la cola de los ratones. En cada uno de los extremos del gel se cargó el marcador de peso molecular, que representa los distintos tamaños y pesos de las bandas de ADN, de forma que aquellos fragmentos más pequeños correrán antes en el gel y los fragmentos más grandes, tardarán más en correr a lo largo del gel. En todos los geles se han incluido controles específicos ubicados a la izquierda de los carriles donde C+HE (Control Positivo Heterocigoto) muestra aquellos ratones con el patrón esperado para un alelo mutado y otro alelo silvestre y, C- (Control Negativo) donde no deberían aparecer bandas de ADN.

En el análisis correspondiente al trasgén **CAMKII-CRE** (Figura 9) se observa que la mayoría de los carriles presentan bandas amplificadas de ADN, por lo que la mayoría de los ratones codifican para la recombinasa Cre, una enzima capaz de reconocer aquellos fragmentos de ADN que se encuentran flanqueados por las secuencias específicas LoxP y capaz de delecionar el gen de interés flanqueado por estos sitios. La interpretación de las bandas es la siguiente:

- **Dos bandas:** la especie es Cre positivo (*Cre* +) por lo que se codifica la recombinasa Cre bajo el promotor CaMKIIa y, por tanto, la delección del gen floxeado.
- **Una sola banda inferior:** la especie es Cre negativo (*Cre* -) por lo que el ratón no porta el trasgén y no se codifica la recombinasa Cre ni habrá delección del gen, aunque esté floxeado.



Figura 9. Genotipado mediante PCR del trasgén CAMKII-CRE

En el análisis correspondiente al trasgén **LIS-FLOX** (Figura 10), se estudia la presencia de sitios específicos LoxP flanqueando el gen de interés. Para interpretar las bandas, se observan una o dos bandas por carril:

- **Dos bandas:** indican una especie heterocigota (*Flox/Wt*) donde la banda superior (mayor peso) representa el alelo con las secuencias LoxP y la banda inferior (menor peso) representa el alelo silvestre, que es más corto al carecer de los sitios LoxP.
- **Una sola banda superior:** indica una especie homocigota floxeada (*Flox/Flox*) donde todos los fragmentos de ADN contienen los sitios específicos LoxP.
- **Una sola banda inferior:** indica una especie wild type, es decir silvestre, (*Wt/Wt*) que no presenta modificación genética en ninguno de los alelos.

LIS-FLOX

C+HE/C-/ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 32 33

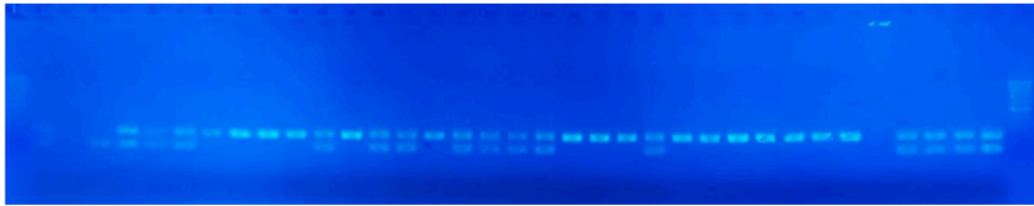


Figura 10. Genotipado mediante PCR del trasgén LIS-FLOX

En el análisis correspondiente al trasgén **TOMATO** (Figura 11), se trata de una proteína fluorescente que actúa como reportero para saber qué células han sufrido recombinación genética mediada por Cre. La interpretación de las bandas es la siguiente:

- **Dos bandas:** la especie es heterocigota (*Tomato/Wt*) ya que la banda superior representa el alelo de TOMATO, de forma que se marcarán aquellas células donde ha habido recombinación genética mediada por Cre.
- **Una sola banda superior:** la especie es homocigota (*Tomato/Tomato*), de forma que se podrá expresar el doble de cantidad de proteína fluorescente que en el ratón heterocigoto.
- **Una sola banda inferior:** se trata de una especie wild type (*Wt/Wt*) y el ratón no tendrá la capacidad de marcar las células modificadas genéticamente.

TOMATO

C+HE/C-/ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 32 33

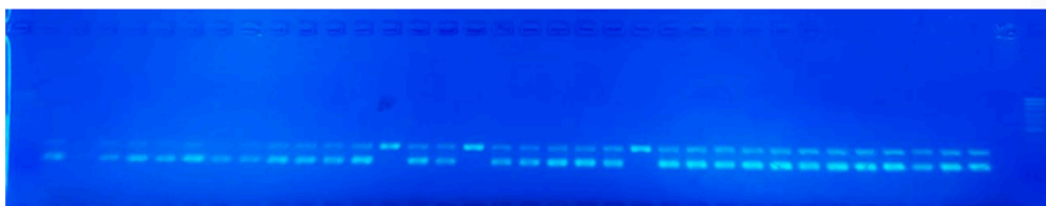


Figura 11. Genotipado mediante PCR del trasgén TOMATO

Para poder lograr la inactivación del gen *LIS1*, necesitaríamos una combinación de *Cre+ // Flox/Flox // Tomato/wt* o *Cre+ // Flox/Flox // Tomato/Tomato*. De esta forma la enzima Cre está presente en las células, el gen de interés se encuentra floxeado y hay señal fluorescente con el reportero de TOMATO en aquellas células que sufren recombinación genética mediada por Cre.

3.3 Obtención de muestras experimentales: preparación del tejido cerebeloso y cortes en el microtomo de congelación

Una vez los ratones mutantes han sido perfundidos, el cerebro se fija en etanol 70% para su conservación. Antes de cortar en el microtomo de congelación, es necesario preparar el tejido a través de una transferencia secuencial en soluciones de sacarosa a concentraciones crecientes. Primero, se transfiere el cerebro de la solución de etanol 70% a una solución de sacarosa 15%. Para preparar la solución de sacarosa 15% se pesaron 7,5 gramos de sacarosa en un tubo Falcon de 50 mL y se enrasa con PBS 1X hasta llegar al volumen de 50 mL. Este tubo Falcon se lleva a un dispositivo giratorio para que se disuelva el contenido. Mientras la solución se disuelve, se realizan paralelamente dos lavados del cerebro con PBS 1X para eliminar la posible presencia de etanol 70% en el cerebro. Una vez se han realizado los lavados y se ha disuelto la solución de sacarosa, se transfiere el cerebro a la solución de sacarosa 15% y se deja reposar en la pastelera a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se prepara una solución de sacarosa al 30% para poder transferir el cerebro. Para preparar esta solución de sacarosa 30% se pesaron 15 g de sacarosa en un tubo Falcon de 50 mL y se enrasa con PBS 1X hasta llegar al volumen de 50 mL. Este tubo Falcon se lleva a un dispositivo giratorio para que se disuelva el contenido y cuando se disuelva se transfiere el cerebro y se deja reposar en la pastelera a 4°C toda la noche.

Con este procedimiento de preparación del tejido, los cerebros estarían listos para cortar con el microtomo de congelación, un aparato histológico que permite realizar cortes ultrafinos del tejido y que los mantiene a temperaturas muy bajas (alrededor de -23°C). Como lo que nos interesa es el cerebelo, se separa el cerebro del cerebelo a través de una cuchilla. Se harán 4 series (A, B, C, D) a 60 micras cada corte a través de dos placas en donde cada pocillo se rellena con PBS 1X. Cuando el microtomo de congelación llega a una temperatura de -23°C, se fija el cerebelo en una base de gel OCT, un medio de inclusión muy utilizado para cubrir el tejido, sujetarlo, congelarlo y facilitar el corte en el microtomo. Una vez el cerebelo está sujeto y congelado, se realizan los cortes con precisión y se recoge cada corte con un pincel para poder traspasarlos a los pocillos con PBS 1X. Cuando ya están todos los cortes hechos, se cubren las dos placas con cintas de parafina para poder sellar y cerrar las placas.

Estas placas estarían listas para comenzar las pruebas de inmunohistoquímica con fluorescencia o DAB. Aquellas placas que no se usaron de inmediato y se dejaron reposar unos días antes de comenzar las pruebas de inmunohistoquímica, se les adicionó un par de gotas de Azida a cada pocillo con el fin de evitar el crecimiento de bacterias y hongos y mantener estables los cortes durante mucho más tiempo.

3.4 Inmunohistoquímica: inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es un tipo de técnica inmunohistoquímica que utiliza anticuerpos marcados con fluorescencia para detectar antígenos objetivo-específicos [30,31]. Es una técnica que se utiliza para visualizar la localización de diversos componentes celulares dentro de las células, tejidos y estructuras [30]. Estos fluoróforos o fluorocromos son compuestos que emiten luz cuando se exponen a una determinada longitud de onda [30]. Para la detección, las muestras biológicas se incuban con un anticuerpo específico donde el anticuerpo se puede acoplar a un fluoróforo (fluorescencia directa) o puede ser detectado por un anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo (fluorescencia indirecta) [30,31]. Para poder visualizar los componentes de interés se realiza un examen fluorescente o confocal, dependiendo de la cuestión biológica a analizar [30,31].

En este experimento se utilizaron dos colores de anticuerpo secundario (rojo y verde) para poder visualizar las células de Purkinje y sus sinapsis en el tejido cerebeloso previamente cortado, que se explicará más adelante.

En el primer día de protocolo los cortes cerebelosos se lavaron tres veces durante 10 minutos con PBT 0,1% (PBS con Tritón añadido, un detergente). Tras los lavados, se realizó una incubación en oscuridad durante 30 minutos en peróxido de hidrógeno con el fin de asegurar la prevención de la peroxidasa endógena del tejido y especificidad de la técnica. Al terminar la incubación, se realizaron nuevamente tres lavados de 10 minutos cada uno con PBT 0,1%. Seguidamente, se realizó un bloqueo con BSA 5% + Azida 0,1% + Lysine 10% que incubó alrededor de una hora y media, con el objetivo de pretender que la unión anticuerpo – antígeno fuera lo más específica posible, evitando la aparición de fondo al observar con el microscopio de fluorescencia. Cuando termina la incubación, se retira el medio de bloqueo y sin realizar lavados, se incubaron los cortes con el anticuerpo primario que se vaya a utilizar (veremos a continuación cuáles se usaron) diluido en una solución DAKO y se deja incubando toda la noche a 4°C en la pastelera, en agitación constante (ver anexo 1).

En el segundo día de protocolo, se retira la placa de la pastelera y se recupera el anticuerpo primario. Seguidamente, se realizan tres lavados de 10 minutos cada uno con PBT 0,1%. Acabados los lavados, se incubaron durante 2 horas los cortes cerebelosos con el anticuerpo secundario (se verán a continuación los utilizados) junto con DAPI, protegidos de la luz bajo oscuridad. Terminada la incubación de 2 horas, se realizaron tres o cuatro lavados en PBS 1X de 10 minutos cada uno en oscuridad. Finalmente, los cortes se montaron en Mowiol (una resina sintética transparente que tiene el objetivo de fijar y sujetar muestras en el portaobjetos) siguiendo un orden creciente del tejido (ver anexo 1).

Anticuerpos primarios y secundarios fluorescentes utilizados

Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios
Vglut2 (V2) → Guinea-pig (1:250)	Fl-2°-5 (570 orange-red) → Guinea-pig IgG, Cy3 (1:200)
Vglut2 (V2) → Guinea-pig (1:350)	Fl-2°-5 (570 orange-red) → Guinea-pig IgG, Cy3 (1:200)
Vglut2 (V2) → Guinea-pig (1:350)	Fl-2°-38 (Alexa Fluor 488) → Guinea-pig IgG H&L (1:200)
Vglut2 (V2) → Guinea-pig (1:500)	Fl-2°-5 (570 orange-red) → Guinea-pig IgG, Cy3 (1:200)
Vglut2 (V2) → Guinea-pig (1:1000)	Fl-2°-5 (570 orange-red) → Guinea-pig IgG, Cy3 (1:200)
R9.2 (α-RFP) → RFP rabbit polyclonal IgG (1:250)	Fl-2°-49 (Alexa Fluor 568) → Rabbit IgG (H+L) (1:500)
R10 (α-RFP) → RFP Rat monoclonal antibody (5F8) IgG2a (1:500)	Fl-2°-43 (Alexa 488 monoclonal) → Rat IgG2a (1:500)
CB (C1.2) → Mouse monoclonal IgG (1:500)	Fl-2°-6 (Alexa Fluor 488) → Mouse IgG (1:500)

Descripción de los anticuerpos utilizados

El anticuerpo Vglut2 marca el transportador vesicular de glutamato tipo 2, expresado en terminales sinápticos excitatorios de las fibras trepadoras sobre células de Purkinje [32]. De esta forma, se pueden visualizar las principales entradas excitatorias hacia las células de Purkinje, lo que permite analizar la abundancia sináptica y la distribución espacial en las sinapsis paralelas de fibras y fibras trepadoras sobre las sinapsis celulares de Purkinje, respectivamente [32]. En el caso del anticuerpo R9.2 y R10, son capaces de detectar la proteína roja fluorescente (RFP), una proteína muy utilizada para marcar células genéticamente modificadas [33]. Aquellas células de Purkinje que sean identificadas como RFP positivo (células rojas) serán aquellas células en las que ha ocurrido recombinación a través de la recombinasa Cre, silenciando el gen *LIS1* floxeado y activando la expresión de RFP simultáneamente. Por otra parte, el anticuerpo calbindina (CB) es un marcador bien establecido de las células de Purkinje ya que es una proteína que se une al calcio y que apoya el rápido tampón de calcio necesario para las propiedades de disparo de alta frecuencia de estas células permitiendo visualizar tanto el cuerpo celular como el árbol dendrítico de las células de Purkinje, además de expresarse de forma abundante [32]. De esta forma, se puede comprobar si hay cambios en la organización estructural de las células de Purkinje transformadas.

En el caso del anticuerpo Vglut2 se han ido cambiando las concentraciones para analizar cómo varía la señal en las células de Purkinje cerebelosas transducidas. Con una concentración de 1:250 está más concentrado por lo que se espera más anticuerpo y más señal, con la concentración 1:350, se espera una señal con adecuada intensidad de marcaje y menor ruido de fondo, con la concentración 1:500 se espera un equilibrio entre especificidad e intensidad y con la concentración de 1:1000, una concentración más diluida, se espera menor señal, pero mucha más especificidad, reduciendo el ruido de fondo.

3.5 Inmunohistoquímica: tinción con DAB

Debido a que muchos de los experimentos realizados con inmunohistoquímica de fluorescencia presentaban una ausencia de señal, quisimos dar una explicación a por qué no obtuvimos resultados si el protocolo se realizó de forma correcta. Por ello, quisimos comprobar si existía algún problema asociado al tejido y por ello, recurrimos a la técnica de DAB ya que si había señal positiva tras el revelado se podría afirmar que el tejido no estaba alterado.

La técnica de DAB (diaminobencidina) es un método cromogénico que permite visualizar la presencia de antígenos o proteínas específicas en tejidos y células a través de un cambio de color [34,35]. El DAB, un compuesto químico, reacciona con la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno, unida a los anticuerpos específicos originando un precipitado de color marrón visible en aquellas áreas donde se ubican los antígenos [34,35]. Este método es bastante útil pues presenta alta sensibilidad para detectar antígenos, genera un precipitado estable e identificable y es compatible con una gran variedad de sistemas inmunológicos [35]. Es importante mencionar que el DAB es un reactivo muy tóxico ya que puede generar irritación en la piel y ojos, efectos adversos respiratorios o carcinogenicidad [35], por lo que se trabajó en todo momento con guantes y siguiendo las normas de seguridad del laboratorio. La tinción DAB, también incluye el complejo avidina – biotina – peroxidasa (complejo ABC) que se une a los anticuerpos primarios y secundarios previamente fijados y que se combina con un anticuerpo secundario biotinilado (conjugado a biotina), que es capaz de unirse al sistema por su alta afinidad de la avidina por la biotina [36]. Como la avidina es tetravalente, se forman grandes complejos generando una alta intensidad de señal [36].

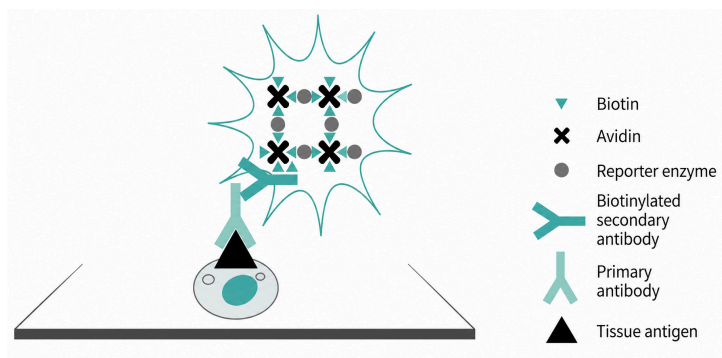


Figura 12. Detección de anticuerpos a través del método ABC [36].

El primer día de protocolo se realizó idéntico al primer día de inmunofluorescencia (ver anexo 1). En el segundo día de protocolo se recupera el anticuerpo primario y se hacen tres lavados de 10 minutos cada uno con PBT 0,1%. Acabados los lavados se incubó el anticuerpo secundario biotinilado (se verán a continuación los utilizados) durante 1 hora. Terminada la incubación se realizaron nuevamente tres lavados con PBT 0,1% de 10 minutos cada uno y se incubó el complejo ABC durante 1 hora, en agitación constante y en oscuridad. El complejo ABC es necesario prepararlo con media hora de antelación para que exista una buena unión entre el reactivo A (avidina) y el reactivo B (biotina unida a peroxidasa), asegurándose de una correcta formación del complejo. El complejo ABC se preparó a una dilución 1:500 en PBT 0,1% y se añadió la misma cantidad de reactivo A (avidina) que de reactivo B (biotina unida a peroxidasa) que fueron 3 µl en 1500 µl de PBT 0,1%.

Acabada la incubación, se realizó un lavado de 10 minutos en PBT 0,1% y dos lavados de 10 minutos en PBS 1X para eliminar el Tritón que podría precipitar en el paso de revelado con DAB.

Para la tinción DAB preparamos un volumen final de 5000 µl PBS al que adicionamos 50 µl DAB y 0,5 µl de peróxido de hidrógeno. Los cortes sagitales cerebelosos se incubaron en la solución de revelado en oscuridad hasta presentar la señal correspondiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS 1X para frenar la reacción.

Finalmente, los cortes se deshidrataron en la batería de alcoholes y se montaron en orden creciente con el medio de montaje Eukitt (ver anexo 1).

Anticuerpos primarios y secundarios biotinilados utilizados:

Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios
Vglut2 (V2) → Guinea-pig (1:1000)	BI-2°-1 → α-guinea pig IgG (1:200)
CB (C1.2) → Mouse monoclonal IgG (1:500)	BI-2°-5 → α-mouse IgG (1:200)

3.6 Programa informático: ImageJ para análisis de imágenes en microscopía confocal

Uno de los grandes objetivos de los científicos, es poder comparar o analizar a nivel estadístico la intensidad de las tinciones o los experimentos de fluorescencia, pero muchos de estos sistemas necesitan costosos accesorios de software o hardware para el análisis y almacenamiento de imágenes [37]. Por ello, se diseñó una alternativa mucho más económica y fiable, el programa ImageJ [37]. Se trata de un programa de procesamiento y análisis de imágenes en Java, ejecutable en cualquier ordenador que posea Java o versiones posteriores [37]. Es accesible para todo público por tener la ventaja de ser gratuito [37]. Para evaluar el análisis y captura de imágenes de técnicas de inmunofluorescencia, las imágenes se guardan en el disco duro del ordenador y posteriormente se abren las imágenes para evaluar índices de positividad en inmunohistoquímica [37]. Para medir y analizar las imágenes de fluorescencia, el programa es capaz de contar los perfiles celulares directamente sobre la pantalla del ordenador marcando con diferentes colores los núcleos positivos o negativos y generando un índice inmunohistoquímico [37].

De esta forma, se obtuvieron imágenes de los cortes cerebelosos de secciones sagitales, especialmente de la folia X, previamente tratados con inmunohistoquímica de fluorescencia, tanto de ratones de especie silvestre (wild type) como de ratones mutantes para poder comparar la estructura y morfología de las células de Purkinje y las señales excitatorias entre neuronas (ver anexo 2).

RESULTADOS



Para analizar cómo repercute la inactivación del gen *LIS1* en las neuronas de Purkinje cerebelosas, se analizaron y compararon cortes sagitales de cerebelo de ratones tanto mutantes como silvestres, mediante experimentos de inmunohistoquímica y microscopía confocal. El análisis se centró especialmente en la organización a nivel morfológico y funcional de las neuronas de Purkinje en la corteza cerebelosa, así como la distribución de las señales glutamatérgicas con el fin de demostrar si el silenciamiento de *LIS1* provoca alteraciones o cambios en la morfología de las neuronas y en sus conexiones sinápticas.

De esta forma, se utilizaron dos anticuerpos clave, calbindina que marca las células de Purkinje con el objetivo de poder distinguir y diferenciar de forma clara sus somas y dendritas y, Vglut2, un marcador específico de los terminales glutamatérgicos de tipo 2, expresado en terminales sinápticos excitatorios de las fibras trepadoras sobre células de Purkinje. Otro anticuerpo utilizado fue el R9.2, un α -RFP que identifica aquellas neuronas que han sufrido recombinación genética e intensifica su señal (los animales mutantes expresan un reportero llamado TOMATO) que se activa solo en aquellas células que hayan experimentado recombinación genética mediada por Cre tras la administración de tamoxifeno y, por tanto se marcarán de color rojo como identificador. Los animales silvestres no presentan este reportero al no existir recombinación genética en ellos.

Para el análisis, se hizo una valoración cualitativa de la distribución y expresión de las distintas señales fluorescentes en las diferentes folias cerebelosas. De esta forma, los resultados obtenidos de las inmunohistoquímicas y procesamiento de dichas inmunohistoquímicas en microscopía confocal, mostraron que tras 21 días después de la inyección de tamoxifeno en ratones neonatales y en 3 ratones MUT, se produjo una distribución no homogénea de la señal asociada a

la recombinación genética que se visualiza con mayor intensidad en las folias posteriores, concretamente folia IX y X (Figura 13). A partir de estas observaciones, se analizaron hasta 4 regiones de interés (ROI) aleatorias tanto en los cortes sagitales cerebelosos mutantes como silvestres para comparar la organización de las neuronas de Purkinje y sus respectivas señales de Vglut2 (Figura 13C).

La Figura 13 muestra una región de la corteza cerebelosa de un ratón mutante marcada con los anticuerpos Vglut2 y α -RFP, de forma que la señal roja se corresponde con α -RFP (permite identificar las neuronas que han sufrido la recombinación y han activado el reportero TOMATO y, donde se ha producido recombinación genética mediada por Cre) y la señal verde se asocia a Vglut2 (marcaje asociado a las sinapsis de terminales glutamatérgicas). En la figura 13A, se muestra el canal rojo correspondiente al marcaje con α -RFP. La señal roja no se distribuye de forma homogénea en la corteza cerebelosa sino en zonas concretas de la folia. En la imagen se aprecia la capa molecular (cM), la capa de Purkinje (cP) y la capa granular (cG). La presencia de señal α -RFP identifica las células que han sufrido recombinación en la capa de Purkinje (cP). En la Figura 13B se muestra el canal verde correspondiente a Vglut2. Esta señal aparece distribuida a lo largo de la corteza cerebelosa y permite identificar los terminales glutamatérgicos. En la capa granular (cG), la señal Vglut2 positiva se asocia a terminales glutamatérgicos que están presentes en los glomérulos, en la capa molecular (cM), la señal Vglut2 positiva se asocia a terminales de fibras trepadoras que sinaptan con las dendritas de las neuronas de Purkinje. La capa de Purkinje (cP), zona intermedia entre la capa granulosa y la capa molecular, es una capa en la que se ubican los somas de las neuronas de Purkinje. En la figura 13C, se muestra la combinación de ambos canales, es decir, se aprecia tanto Vglut2 como α -RFP. Las zonas donde ambas señales se superponen o se aproximan se visualizan en tonos amarillos, relacionando así las células recombinadas con sus terminales glutamatérgicos. A partir de esta imagen, se seleccionaron aleatoriamente varias regiones de interés (ROI), concretamente 4 ROI por ratón, para realizar el análisis cuantitativo de densidad sináptica.

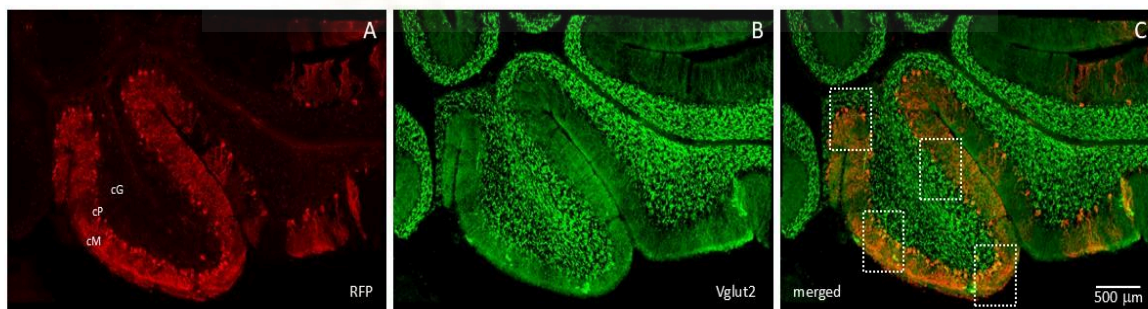


Figura 13. Representación de la inmunohistoquímica realizada en cortes sagitales de cerebelo mutante donde se muestra la folia IX y X de un ratón mutante tras 21 días después de la inyección de tamoxifeno en su nacimiento.

Al analizar las regiones ROI aleatorias para el estudio cuantitativo de este TFG, tuvimos que tener en cuenta la elección del anticuerpo secundario. En los casos del tejido nervioso mutante (MUT) el Vglut2 se marcó con un anticuerpo fluorescente y absorción de longitud de onda de 488 nm (verde; Fig.14B). En el caso del tejido silvestre (WT) la elección del anticuerpo secundario tuvo que ser con una absorbancia de 568 nm (rojo; Fig.15A). En la Figura 14 se muestra una región (ROI) de la corteza cerebelosa de un ratón mutante marcada con los anticuerpos Vglut2 y α -RFP, de forma que la señal roja se corresponde con α -RFP (marcaje de recombinación genética) y la señal verde se asocia a

Vglut2 (marcaje de señales glutamatérgicas). En la figura 14A, se muestra una señal roja correspondiente al reportero TOMATO que es detectado y amplificado con el anticuerpo α -RFP, por lo que permite detectar aquellas células donde se ha producido recombinación genética. Como vemos en la imagen, la señal roja positiva solo se ve en algunas células indicando que la mutación no es homogénea en el tejido lo cual puede indicar que durante el nacimiento solo algunas neuronas de Purkinje tiene suficiente Cre, es decir, producen suficiente CaMKIIa para que el transgén haga su efecto de delección. La morfología y distribución de estas neuronas no es fisiológica. Como se puede apreciar el soma de una de ellas se encuentra en la capa molecular, sus somas son ovalados y el árbol dendrítico es inclinado y no transversal a la superficie pial. En la figura 14B, se muestra una señal verde correspondiente a Vglut2. Se puede observar que la distribución es más amplia a lo largo del tejido y permite analizar la distribución de los terminales sinápticos glutamatérgicos que corresponden con los puntos en la capa molecular. En la figura 14C, se aprecia una combinación de ambas imágenes mostrando la relación entre las señales glutamatérgicas (marcaje verde) y las células recombinadas (marcaje rojo).

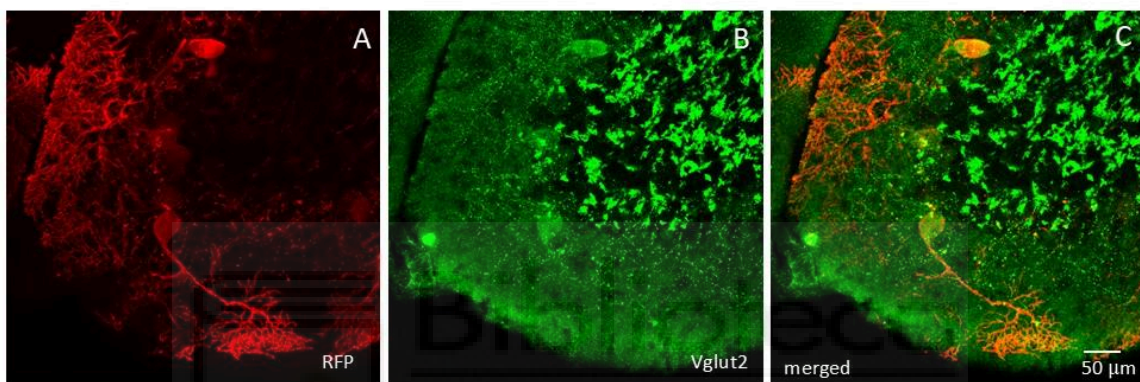


Figura 14. Representación de la inmunohistoquímica realizada en cortes sagitales de cerebelo donde se muestra una región ROI seleccionada de forma aleatoria de un ratón mutante tras 21 días después de la inyección de tamoxifeno.

En el cerebelo silvestre (figura 15) se muestra una región (ROI) de la corteza cerebelosa marcada con los anticuerpos Vglut2 y calbindina (CB), de forma que la señal roja se corresponde con Vglut2 (marcaje de señales glutamatérgicas) y la señal verde se asocia a calbindina (marcaje de neuronas de Purkinje). En la figura 15A, se muestra una señal roja correspondiente al anticuerpo Vglut2 que marca las señales glutamatérgicas. En este caso, como es un ratón silvestre, no existe marcaje del reportero TOMATO ya que es una especie silvestre sin modificaciones o mutaciones. Desde un punto de vista cualitativo, se puede apreciar una mayor uniformidad del puntaje de terminales sinápticos en la capa molecular. En la figura 15B, se puede observar una señal verde correspondiente a calbindina que marca las neuronas de Purkinje, tanto sus somas en la capa de Purkinje como sus prolongaciones dendríticas en la capa molecular teniendo una visión de la morfología natural de las neuronas de Purkinje. En la figura 15C, se muestra una combinación de ambos canales que relacionan las neuronas de Purkinje con las señales glutamatérgicas, diferenciando claramente la capa granular, la capa de Purkinje y la capa molecular.

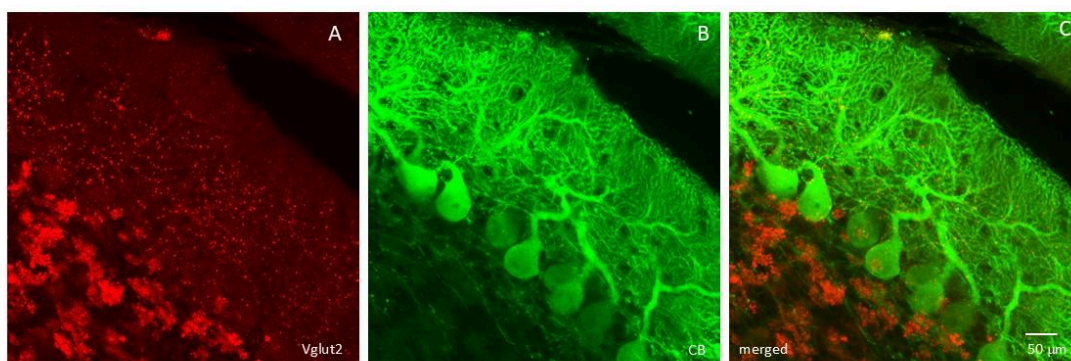


Figura 15. Representación de la inmunohistoquímica realizada en cortes sagitales de cerebelo donde se muestra una región ROI seleccionada de forma aleatoria de un ratón silvestre tras 21 días después de la inyección de tamoxifeno.

Por lo tanto, el análisis cualitativo preliminar de los casos estudiados, procesados y documentados de las imágenes de inmunofluorescencia entre ratones mutantes y silvestres permitió analizar la organización y distribución de la corteza cerebelosa. A nivel morfológico, el marcaje con calbindina ayudó a mostrar que el grupo silvestre presentó un patrón uniforme de las neuronas de Purkinje ya que se distinguía con claridad los somas ubicados en la capa de Purkinje y sus respectivas dendritas proyectando hacia la capa molecular. Sin embargo, en el caso del grupo mutante, se pudo observar una organización reconocible citoarquitectónicamente a nivel general pero, la expresión de TOMATO reveló que existía una distribución no homogénea de las células recombinadas ya que la señal roja/TOMATO no aparecía de la misma manera en todo el corte ni en todas las zonas.

Para el análisis cuantitativo de la señal Vglut2, se utilizó el programa ImageJ y el plugin de “Analyze Particles”, lo que permitió obtener el número de partículas Vglut2 positivas (count), y el área total de donde se encontraban dichas partículas (ver anexo 3). Con estos datos se estudió la densidad sináptica mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad sináptica} = \frac{\text{Count}}{\text{Total Área}}$$

De esta forma, y definiendo inicialmente un Threshold para transformar los grises en blancos y negros y filtrar aquellas partículas mayores o menores del tamaño de un terminal sináptico (0.2-5 micras), pudimos determinar y comparar estadísticamente, mediante gráficos de columnas agrupadas, los ROIs de los cortes sagitales mutantes con los silvestres con el fin de determinar si el silenciamiento de *LISI* en neuronas de Purkinje generaba alteraciones en las señales glutamatérgicas y sinápticas.

Primero, se realizó un análisis del número de partículas Vglut2 positivas en estos cortes cerebelosos. Los ratones silvestres (WT) presentaron una media de $192,82 \pm 104,05$ de partículas mientras que los ratones mutantes (MUT) presentaron una media de $351 \pm 473,31$ de partículas. Al observar la gráfica (ver anexo 3), se aprecia que el grupo de los mutantes presenta una media superior y también, una desviación estándar mayor que los silvestres, lo que significa

que presenta una elevada dispersión de los datos. A la hora de comparar estadísticamente ambos grupos, el test no paramétrico Mann-Whitney reveló que los valores entre animales mutantes y silvestres no eran significativos.

Seguidamente, se analizó el área total que contenía las partículas Vglut2 positivas (ver anexo 3). En este caso, el grupo silvestre (WT) presentó una media de $88,91 \pm 46,78 \mu\text{m}^2$, mientras que el grupo de los mutantes (MUT) presentó una media de $152,49 \pm 171,29 \mu\text{m}^2$. Al igual que antes, aunque la media y desviación estándar del grupo mutante tuvieran un valor mayor, el test no paramétrico Mann-Whitney no identificó diferencias significativas entre las diferencias de ambos grupos.

Finalmente, se calculó y analizó la densidad sináptica Vglut2 positiva, correspondiente a la relación entre el número de partículas por área seleccionada. En este parámetro, el grupo de los silvestres (WT) obtuvo una media de $2,19 \pm 0,34 \mu\text{m}^2$ y para el grupo mutante (MUT) se obtuvo una media de $2,16 \pm 0,45 \mu\text{m}^2$. Estos resultados indicaron gran semejanza entre ellos y a la hora de comparar estadísticamente ambos grupos, el test no paramétrico Mann-Whitney reveló que los valores entre animales mutantes y silvestres no eran significativos, de forma que la densidad sináptica global se mantenía prácticamente igual en ambos grupos.

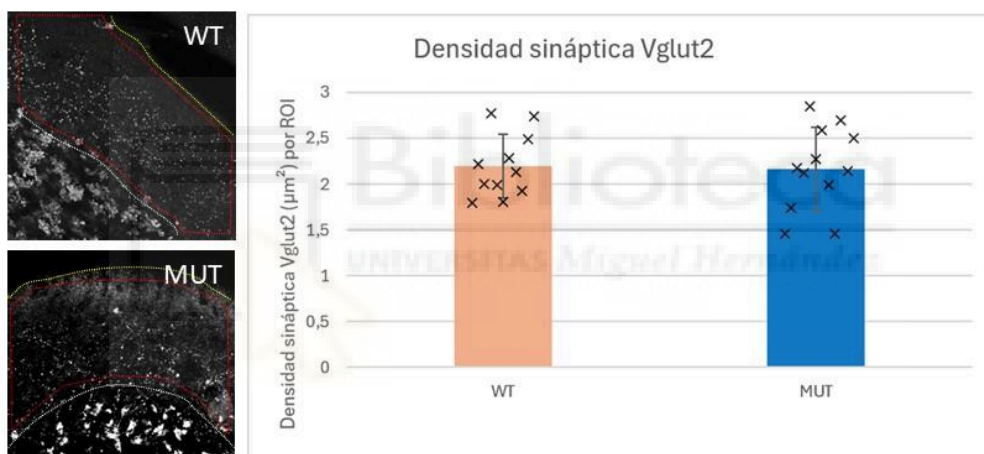


Figura 16. Análisis cuantitativo de la densidad sináptica Vglut2 positivas en los cortes sagitales cerebelosos de ratones silvestres (WT) y mutantes (MUT).

Por lo tanto, a nivel sináptico/funcional la señal Vglut2 nos permite estudiar cuantitativamente las sinapsis glutamatérgicas alrededor de las neuronas de Purkinje, tanto en ratones mutantes como silvestres. La comparación reveló que la densidad sináptica de ambos grupos son muy parecidos y, aunque el grupo mutante presente una mayor media de número de partículas y área de señal Vglut2 positiva, las diferencias no son estadísticamente significativas y no se tomó como un cambio importante a nivel sináptico.

DISCUSIÓN

En condiciones fisiológicas, las neuronas de Purkinje se encuentran localizadas en una disposición en monocapa entre la capa granulosa y la capa molecular de la corteza cerebelosa [14,43]. Sus somas se encuentran principalmente en la capa de Purkinje y presentan un soma con forma circular, con proyecciones dendríticas verticales que se extienden hacia la capa molecular [43]. En este TFG hemos descubierto que la inactivación de *LIS1* en neuronas de Purkinje de ratones mutantes desde estadios neonatales hasta P21, ha afectado a la organización y distribución de estas neuronas ya que han experimentado ciertos cambios morfológicos como la deslocalización de los somas ya que muchos se hallan de forma pluriestratificada, superpuestos unos a otros o dentro de la capa molecular/granular (disposición ectópica) y también hemos observado que sus árboles dendríticos se encuentran desviados, en una angulación más pronunciada hacia la superficie pial en comparación con las neuronas silvestres. Hemos podido observar desde un punto de vista cualitativo que los somas de las neuronas carentes de *LIS1* pasan de una forma circular a una forma ovalada, alargada y estrecha. Estos resultados sugieren que la inactivación de *LIS1* afecta al proceso de localización y organización de las neuronas de Purkinje durante el desarrollo cerebeloso. Esta observación se describe en la literatura en la corteza cerebral en la que la proteína LIS1 se acopla a la dineína citoplasmática junto con otras proteínas asociadas, formando un complejo implicado en el posicionamiento nuclear, transporte intracelular y migración neuronal [7]. Dado que *LIS1* está silenciado, el complejo falla y podría ser la razón por la que en el cerebelo las neuronas de Purkinje (sus somas y dendritas) se encuentran en posiciones poco habituales y anómalas dando lugar a la desorganización y falta de maduración del tejido cerebeloso [7].

Así mismo, el análisis cuantitativo de la señal Vglut2, en condiciones fisiológicas observamos que las neuronas de Purkinje reciben dos tipos de entradas excitatorias principales que son las fibras paralelas, procedentes de las células granulares y, las fibras trepadoras procedentes del núcleo olivar inferior [42,44]. Vglut2 se considera un marcador clave asociado generalmente a identificar los terminales sinápticos glutamatérgicos de las fibras trepadoras que contactan con las neuronas de Purkinje [32]. En nuestro estudio, los análisis a través de inmunofluorescencia, microscopía confocal e ImageJ demostraron que no existían diferencias significativas entre el grupo de ratones mutantes con el grupo de ratones silvestre ya que en los valores del número de partículas y el área total ocupada por dichas partículas se observó una gran dispersión de los datos y en los valores de densidad sináptica se observaron valores altamente similares entre ambos grupos. De esta forma, aunque parecía que había una tendencia a un aumento en la señal Vglut2 en los mutantes, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Esta observación significa que la inactivación de *LIS1* en las neuronas de Purkinje no generó un cambio global detectable en la densidad sináptica de la señal Vglut2 por lo que, aunque la inactivación de *LIS1* genere variaciones en la morfología y localización de las neuronas de Purkinje, no significa que tenga que existir una modificación cuantitativa en las sinapsis de los terminales glutamatérgicos Vglut2 de estas neuronas. Al comparar estos resultados con la literatura, estudios describen que Vglut2 se expresa especialmente en las fibras trepadoras procedentes del núcleo olivar inferior y, que estas fibras trepadoras generan contactos con las dendritas de las neuronas de Purkinje [42,44]. Por ello, en estudios donde se altera la conectividad neuronal, se podrían esperar cambios en la distribución o conexiones de las entradas Vglut2 glutamatérgicas. Por ejemplo, un estudio realizó una delección condicional de todas las neuroliginas (moléculas de adhesión celular postsináptica) en células cerebelosas de Purkinje y se observó una pérdida de sinapsis distales de fibras trepadoras que debilitó a su vez las sinapsis de fibras trepadoras [45]. Por eso, en nuestro trabajo se podría haber esperado cierta alteración en la distribución de las entradas glutamatérgicas Vglut2 pero no se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo mutante y el grupo silvestre.

CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

- 1) La ablación de *LISI* específicamente en las neuronas de Purkinje del cerebelo desde estadios neonatales hasta los 21 días, tiene como consecuencia una distribución citoarquitectónica aberrante, localizándose sus somas fuera de la propia capa de Purkinje.
- 2) La anatomía/morfología de estas células carentes de *LISI* es anómala con somas ovalados e inclinaciones de su árbol dendrítico.
- 3) La inactivación de *LISI* sobre estas células nerviosas, centro neurálgico de la decodificación del circuito cerebeloso y receptor indirecto de la información motora/propioceptiva de la corteza cerebral o médula espinal, no parece cambiar el número de sinapsis proveniente al menos de la Oliva Inferior (fibras trepadoras).

Las perspectivas futuras de este TFG podrían centrarse en profundizar las alteraciones provocadas por el silenciamiento de *LISI* en las neuronas de Purkinje:

- Caracterizar con más exactitud las entradas excitatorias que llegan a las neuronas de Purkinje, incorporando otro tipo de marcadores que identifiquen señales de las fibras paralelas, fibras trepadoras y fibras musgosas independientemente.
- Estudiar la función de la glía de Bergmann ya que actúa como soporte y andamiaje de las neuronas de Purkinje durante el desarrollo cerebeloso.
- Estudiar si la glía de Bergmann y vías como la Reelina actúan en las posibles alteraciones de localización y organización de las neuronas de Purkinje mutantes.
- Estudiar si las neuronas de Purkinje mutantes presentan una actividad eléctrica anómala en estudios electrofisiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]Vallee, R. B., & Tsai, J. (2006). The cellular roles of the lissencephaly gene LIS1, and what they tell us about brain development. *Genes & Development*, 20(11), 1384-1393. <https://doi.org/10.1101/gad.1417206>
- [2]Wynshaw-Boris, A. (2007). Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clinical Genetics*, 72(4), 296-304. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00888.x>
- [3]Koenig, M., Dobyns, W. B., & Di Donato, N. (2021). Lissencephaly: Update on diagnostics and clinical management. *European Journal Of Paediatric Neurology*, 35, 147-152. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2021.09.013>
- [4]Wynshaw-Boris, A., Pramparo, T., Youn, Y. H., & Hirotsume, S. (2010). Lissencephaly: Mechanistic insights from animal models and potential therapeutic strategies. *Seminars In Cell And Developmental Biology*, 21(8), 823-830. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.07.008>
- [5]Uyanik, G., Morris-Rosendahl, D. J., Stiegler, J., Klapceki, J., Gross, C., Berman, Y., Martin, P., Dey, L., Spranger, S., Korenke, G. C., Schreyer, I., Hertzberg, C., Neumann, T. E., Burkart, P., Spaich, C., Meng, M., Holthausen, H., AdèS, L., Seidel, J., . . . Winkler, J. (2007b). Location and type of mutation in the LIS1 gene do not predict phenotypic severity. *Neurology*, 69(5), 442-447. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000266629.98503.d0>
- [6]Del Castillo Velilla, I., Jiménez, M. M., Martín, M. P., & Cabezas, M. G. (2019). Lisencefalia, hipoplasia cerebelar y atresia de vías biliares extrahepáticas: una asociación inusual. *Neurología*, 35(7), 502-503. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2019.02.001>
- [7]Vallee, R. B. y Tsai, J.-W. (2006). Los roles celulares del gen lisencefalia LIS1 y lo que nos dicen sobre el desarrollo cerebral. *Desarrollo de genes*, 20(11), 1384–1393. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16751177/>
- [8][Molecular mechanism of lissencephaly--how LIS1 and NDEL1 regulate cytoplasmic dynein?]. (2008, 1 abril). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18421979/>
- [9]*Human Molecular Genetics*, Volumen 9, Número 20, 12 de diciembre de 2000, páginas 3019–3028, <https://doi.org/10.1093/hmg/9.20.3019>
- [10]Saillour, Y., Carion, N., Quelin, C., et al. (2009). *Lisencefalia aislada relacionada con LIS1: Espectro de mutaciones y relaciones con la gravedad de las malformaciones*. *Archives of Neurology*, 66(8), 1007–1015. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.149>
- [11]Emsley, J. G., Mitchell, B. D., Kempermann, G., & Macklis, J. D. (2005). *Neurogenesis adulta y reparación del SNC adulto con progenitores neuronales, precursores y células madre*. *Progress in Neurobiology*, 75(5), 321–341. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.04.002>
- [12][Structure and function of the cerebellum]. (2001, 1 octubre). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11784952/>
- [13]Beckinghausen, J., & Sillitoe, R. V. (2018). Insights into cerebellar development and connectivity. *Neuroscience Letters*, 688, 2-13. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.05.013>

- [14]Rodríguez-Takeuchi, S., Baena-Caldas, G., Orejuela-Zapata, J., & Sánchez, A. G. (2020). Análisis del patrón de activación funcional del cerebelo y su correlación topográfica. *Radiología*, 62(4), 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2019.11.009>
- [15]Sudarov, A. y Joyner, A. L. (2007). Morfogénesis del cerebelo: el patrón de foliación está orquestado por centros de anclaje multicelulares. *Neural Development*, 2, Artículo 26. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2246128/>
- [16]Hirano, T. (2018). Purkinje Neurons: Development, Morphology, and Function. *The Cerebellum*, 17(6), 699-700. <https://doi.org/10.1007/s12311-018-0985-7>
- [17]Fujishima, K., Galbraith, K. K., & Kengaku, M. (2018). Dendritic Self-Avoidance and Morphological Development of Cerebellar Purkinje Cells. *The Cerebellum*, 17(6), 701-708. <https://doi.org/10.1007/s12311-018-0984-8>
- [18]Sotelo, C., & Dusart, I. (2009). Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje cell dendrites. *Neuroscience*, 162(3), 589-600. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.035>
- [19]Kapfhammer, J. P. (2004). Control celular y molecular del crecimiento y desarrollo dendrítico de células de Purkinje cerebelosas. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 39(2), 51-82. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2004.07.002>
- [20]Duffy, C. J., & Rakic, P. (1983). Differentiation of granule cell dendrites in the dentate gyrus of the rhesus monkey: A quantitative golgi study. *The Journal Of Comparative Neurology*, 214(2), 224-237. <https://doi.org/10.1002/cne.902140210>
- [21]Hashimoto, K., & Kano, M. (2013). Synapse elimination in the developing cerebellum. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 70(24), 4667-4680. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1405-2>
- [22]Neniskyte, U., & Gross, C. T. (2017). Errant gardeners: glial-cell-dependent synaptic pruning and neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(11), 658-670. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.110>
- [23]Wang, X., Zhang, C., Szábo, G., & Sun, Q. (2013). Distribution of CaMKII α expression in the brain in vivo, studied by CaMKII α -GFP mice. *Brain Research*, 1518, 9-25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.042>
- [24]Brown, C. N., & Bayer, K. U. (2024). Studying CaMKII: Tools and standards. *Cell Reports*, 43(4), 113982. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113982>
- [25]Yasuda, R., Hayashi, Y., & Hell, J. W. (2022). CaMKII: a central molecular organizer of synaptic plasticity, learning and memory. *Nature Reviews. Neuroscience*, 23(11), 666-682. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00624-2>
- [26]Kim, H., Kim, M., Im, S., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory Animal Research*, 34(4), 147. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>
- [27]Foster, M. P., Benedek, M. J., Billings, T. D., & Montgomery, J. S. (2024). Dynamics in Cre-loxP site-specific recombination. *Current Opinion In Structural Biology*, 88, 102878. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2024.102878>
- [28]Chen, M.-Y., Zhao, F.-L., Wen-Lin Chu, W.-L., Bai, M.-R. y Zhang, D.-M. (2023). Revisión de la optimización del régimen de administración de tamoxifeno para el sistema Cre/loxP en un estudio de huesos de ratón. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, Artículo 115045. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37379643/>

- [29]Hoersten, J., Ruiz-Gómez, G., Paszkowski-Rogacz, M., Gilioli, G., Guillem-Gloria, P. M., Lansing, F., Pisabarro, M. T., & Buchholz, F. (2024). Engineering spacer specificity of the Cre/loxP system. *Nucleic Acids Research*, 52(13), 8017-8031. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae481>
- [30]Joshi, S. y Yu, D. (2017). Inmunofluorescencia. En *Métodos de Ciencia Básica para Investigadores Clínicos* (pp. 135-150). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00008-4>
- [31]Moreno, V., Smith, E. A., & Piña-Oviedo, S. (2021). Fluorescent immunohistochemistry. *Methods In Molecular Biology*, 2422, 131-146. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3_9
- [32]A Guide to Immunostaining the Cerebellum. (2024, 16 octubre). *Proteintech*. <https://www.ptglab.com/news/blog/a-guide-to-immunostaining-the-cerebellum/>
- [33]Consortium, S. C. G. E. (s. f.). *Ai9 mouse | SCGE Toolkit*. Somatic Cell Gene Editing Toolkit. <https://scge.mcw.edu/toolkit/data/models/model?id=13000000041&>
- [34]Daudi, A., & O'Brien, J. A. (2012, 20 septiembre). *Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in Arabidopsis Leaves*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4932902/>
- [35]*Diaminobencidina: definición médica | Diccionario CUN*. (s. f.-b). <https://www.cun.es.https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/diaminobencidina>
- [36]*Antibodies, proteins, kits & reagents for life science | Abcam*. (s. f.). Abcam. (s. f.). *Detection and amplification systems*. Abcam. <https://www.abcam.com/en-us/technical-resources/guides/ihc-guide/detection-and-amplification-systems>
- [37]Jensen, E. C. (2013). Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ. *The Anatomical Record*, 296(3), 378-381. <https://doi.org/10.1002/ar.22641>
- [38]Herman, T. E., & Siegel, M. J. (2008). Miller–Dieker syndrome, type 1 lissencephaly. *Journal Of Perinatology*, 28(4), 313-315. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211920>
- [39]Azizi, S. A., & Woodward, D. J. (1987). Inferior olivary nuclear complex of the rat: Morphology and comments on the principles of organization within the olivocerebellar system. *The Journal Of Comparative Neurology*, 263(4), 467-484. <https://doi.org/10.1002/cne.902630402>
- [40]Lefler, Y., Amsalem, O., Vrieler, N., Segev, I., & Yarom, Y. (2020). Using subthreshold events to characterize the functional architecture of the electrically coupled inferior olive network. *eLife*, 9. <https://doi.org/10.7554/elife.43560>
- [41]Chen, X. Y., Wang, Y., Chen, Y., Chen, L., & Wolpaw, J. R. (2016). The inferior olive is essential for long-term maintenance of a simple motor skill. *Journal Of Neurophysiology*, 116(4), 1946-1955. <https://doi.org/10.1152/jn.00085.2016>
- [42]Paul, M. S., & Das, J. M. (2023, 24 julio). *Neuroanatomy, Superior and Inferior Olivary Nucleus (Superior and Inferior Olivary Complex)*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542242>
- [43]Van der Heijden, M. E., & Sillitoe, R. V. (2021). *Interactions between Purkinje cells and granule cells coordinate the development of functional cerebellar circuits*. *Neuroscience*, 462, 4–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.06.010>

- [44]Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H., & Watanabe, M. (2003). *Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre–Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum*. *European Journal of Neuroscience*, 17(12), 2563–2572. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02698>
- [45]Zhang, B., Chen, L. Y., Liu, X., Maxeiner, S., Lee, S., Gokce, O., & Südhof, T. C. (2015). Neuroligins Sculpt Cerebellar Purkinje-Cell Circuits by Differential Control of Distinct Classes of Synapses. *Neuron*, 87(4), 781-796. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.020>



ANEXOS

ANEXO 1: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA CON FLUORESCENCIA O DAB

DÍA 1

- 1. Lavados 3 x 10 minutos, con PBS 1X + Tritón 0,1% (en movimiento)**
- 2. Paso con H₂O₂ al 3% (partiendo de H₂O₂ al 30%), incubando durante 30 minutos en oscuridad a R.T. (en movimiento)**

Para 100 mL de solución: 3 mL de H₂O₂ al 30%

97 ml de PBS 1X + Tritón 1%

Aquí queremos inhibir la peroxidasa endógena del tejido, al mismo tiempo que nos sirve para blanquear.

- 3. Lavados 3-6 x 10 minutos, con PBS 1X + Tritón 0,1% (en movimiento)**
- 4. Bloqueo con BSA 5% (originario era al 10%) + Azida 0,1% (en PBS 1X + Tritón 0,1%) + Lysine 1M al 10%, incubar durante 1-2 horas (mínimo 45 minutos) a R/t (en movimiento).**

Para 100 mL de solución: 10 mL de Lysine 1M

90 mL de BSA 5% + Azida 0,1% (en PBS 1X + Tritón 0,1%)

En este paso pretendemos que la unión de antígeno – anticuerpo sea lo más específica posible, evitando así también que salga fondo.

5. Incubar Anticuerpo 1°

1/500 en DAKO

Dejar incubar O/N a 4°C (en movimiento)

DÍA 2 CON INMUNOFLUORESCENCIA

- 1. Recuperar el Anticuerpo 1° (Si lo reutilizamos, genera menos fondo)**
- 2. Lavados 3-6 x 10 minutos, con PBS 1X + Tritón 0,1% (en movimiento)**
- 3. Incubar Anticuerpo 2° + DAPI**

Utilizamos un Anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo

1/200 2 horas

DAPI: 1/1000

- 4. Lavados 3-4 x 10 minutos, con PBS 1X (en movimiento)**
- 5. Montar los cortes cerebelosos en Mowiol y guardar en la nevera.**

DÍA 2 CON DAB

1. Recuperar el Anticuerpo 1° (Si lo reutilizamos, genera menos fondo)

2. Lavados 3-6 x 10 min, con PBS 1X + Tritón 0,1% (en movimiento)

3. Incubar Anticuerpo 2°

Utilizamos un Anticuerpo secundario conjugado a biotina que dependerá de cuál sea la especie en que esté hecho el Anticuerpo primario.

Lo diluimos normalmente a 1/200 en solución BSA 1% (en PBS 1X + Tritón 0,1%)

Incubar 1 hora a R.T. (en movimiento)

4. Lavados 2-3 x 10 minutos, con PBS 1X + Tritón 0,1% (en movimiento)

5. Incubar con ABC Standard (Complejo Avidina- Biotina- Peroxidasas)

Se hace a una dilución 1/500 en solución de PBT

Incubar durante 1 hora (en movimiento y protegido de la luz)

Es importante prepararlo al menos media hora antes para que sea buena la unión del reactivo “A” (avidina) con el reactivo “B” (la biotina unida a la peroxidasas).

6. Lavados 1 x 10 minutos, con PBS 1X + PBT 0,1% (en movimiento)

7. Lavados 2 x 10 minutos, con PBS 1X (en movimiento)

Pusimos 20 mL de PBS 1X + 200 µL de DAB y filtramos + 1µL de H₂O₂

Diaminobenzidine (DAB).....volumen final: 100 mL...99 mL PBS 1X

1 mL de DAB (3,33%)

6 µL de H₂O₂ al 30%

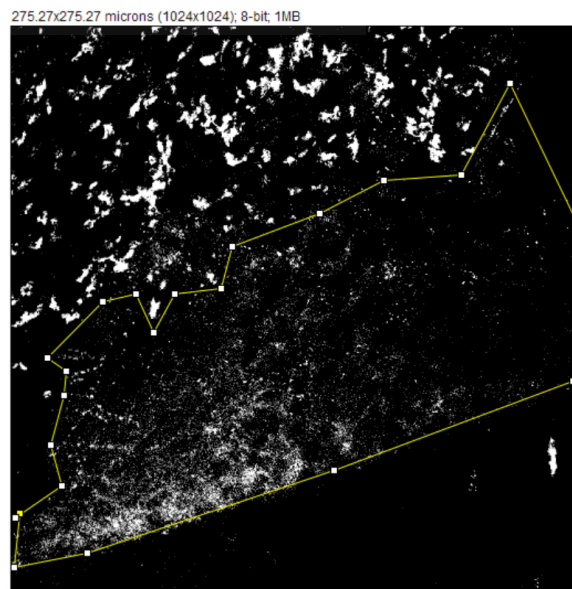
8. Lavados 2 x 10 minutos, con PBS 1X para parar la reacción.

9. Montar los cortes cerebelosos con Tris-gelatina

10. Deshidratar los portaobjetos con los cortes cerebelosos en la batería de alcoholes y montar con Eukitt.

ANEXO 2: PROTOCOLO PARA CALCULAR LA DENSIDAD SINÁPTICA CON EL PROGRAMA IMAGEJ

1. Nos descargamos el programa ImageJ / Fiji de Internet que se encontrará de forma gratuita.
2. Abrimos el programa y cargamos la imagen de interés tomada en el microscopio confocal de los cortes sagitales cerebelosos.
3. Se nos abre una pantalla llamada “Bio-Formats Import Options” en la que marcamos la opción de “Split Channels”, en “Color mode” → colorized y, pinchar “Autoscale”.
4. Se nos abrirán varias series de cada imagen → pulsamos la que vayamos a analizar → OK
5. Se nos abrirán 3 imágenes (una marcada con DAPI, una marcada con CB y otra marcada con Vglut2). Para ver las tres imágenes en fila y poder apreciarlas mejor → Window → Tile.
6. Para ver la composición de todas las imágenes juntas → Image → Color → Merge Channels.
7. Cuando se haga la composición → Image → Stacks → Z Project → Max Intensity → OK. Para guardar la imagen le damos a Image → Type → RGB Color y luego a File → Save as → Tiff .
8. En este estudio nos interesan las imágenes marcadas con Vglut2 así que cerramos las ventanas correspondientes a las imágenes marcadas con DAPI y CB.
9. Cargamos la imagen control correspondiente a la imagen con la que estamos trabajando.
10. Para ambas imágenes → Image → Stack → Z Project. Cerramos las ventanas de las imágenes originales y nos quedamos solo con las de máxima intensidad.
11. Para restar las imágenes → Process → Image calculator (muestra – control) → se nos abre una nueva imagen con la que trabajaremos.
12. Para convertir la imagen en binario (blanco y negro) → Image → Adjust → Thershold → ajustamos el rango de intensidad a 130-255 → Apply → OK.
13. En la barra de herramientas seleccionamos el polígono y elegimos la región de interés (ROI) que serán las zonas donde veamos sinapsis.
14. Pulsamos Analyze → Analyze Particles → ajustamos el rango de “size” y “circularity” ($0.2-5 \mu\text{m}^2$) → comprobamos que está puesta la opción de “Summarize” → OK.
15. Se nos abre una tabla con el número de sinapsis que hay en el ROI seleccionado.
16. Para calcular la densidad sináptica se divide el número de partículas entre el área de ROI (región de interés), expresada en μm^2 .



ANEXO 3: TABLAS DE DATOS OBTENIDAS CON EL PROGRAMA IMAGEJ Y EL PLUGIN “ANALYZE PARTICLES”

Tabla mutante

Slice	Count	Total Área μm^2	Densidad sináptica μm^2
Results of MAX_13_15_26.lif - Series001 - C=2	190	130,434	1,456675407
Results of MAX_13_15_26.lif - Series001 - C=2	101	58,099	1,738412021
Results of MAX_14_5_26.lif - Series004 - C=1	218	100,156	2,176604497
Results of MAX_14_5_26.lif - Series007 - C=1	835	393	2,122920936
MAX_14_11_24_cerebl_f oliaX.lif-Vglut2 - C=2	1681	589,949	2,849398846
Results of MAX_15_5_26mut.lif - Series002 - C=2	63	27,749	2,270352085
Results of MAX_15_5_26mut.lif - Series003 - C=2	25	9,667	2,58611772
MAX_Vglut2_CB_caso MAITE_TFG.lif -TileScan 1 - Series004 - C=2	311	156,449	1,987868251
MAX_Vglut2_CB_caso MAITE_TFG.lif -TileScan 1 - Series005 - C=2	144	98,494	1,462017991
MAX_Vglut2_CB_caso MAITE_TFG.lif -TileScan	357	132,674	2,690806036

1 - Series0010 - C=2			
MAX_Vglut2_CB_caso MAITE_TFG.lif -TileScan 1 - Series0011 - C=2	276	128,772	2,143323083
MAX_Vglut2_CB_caso MAITE_TFG.lif -TileScan 1 - Series0025 - C=2	11	4,408	2,495462795

Tabla silvestre

Slice	Count	Total Area μm^2	Densidad sináptica
Results of MAX_21_5_26_WT.lif - Series001 - C=2	116	64,601	1,795637838
Results of MAX_21_5_26_WT.lif - Series002 - C=2	46	20,791	2,212495791
Results of MAX_28 de mayo WT-33.lif - Series001 - C=2	253	126,552	1,999178203
Results of MAX_28 de mayo WT-33.lif - Series003 - C=2	387	140	2,765214036
Results of MAX_28 de mayo WT-33.lif - Series004 - C=2	301	151,204	1,990688077
Results of MAX_28 de mayo WT-33.lif - Series005 - C=2	272	150,415	1,808330286
Results of MAX_28 de mayo wt-32.lif - Series001 - C=2	102	44,642	2,284843869

Results of MAX_28 de mayo wt-32.lif - Series002 - C=2	186	87,39	2,128389976
Results of MAX_28 de mayo wt-32.lif - Series003 - C=2	109	56,686	1,922873373
Results of MAX_28 de mayo wt-32.lif - Series004 - C=2	227	91,081	2,492287085
Results of MAX_28 de mayo wt-32.lif - Series006 - C=2	122	44,645	2,732668832

