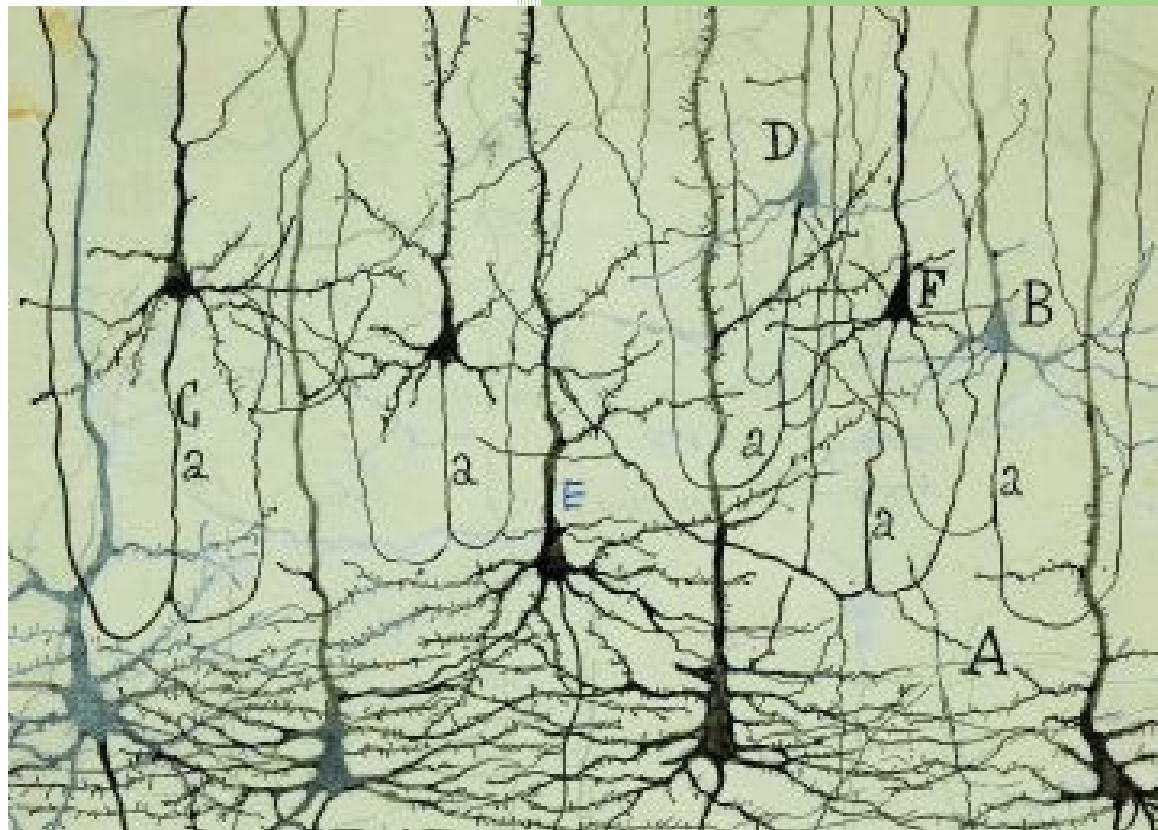




VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

TREBALL FI DE GRAU

ROL DE LES XARXES PERINEURONALS EN LA PLASTICITAT D'INTERNEURONES DE L'ESCORÇA CEREBRAL ADULTA



Edna Ripollés Campos

Tutor acadèmic: Juan Nácher Roselló.

Universitat de València. 4t Biologia,

Itinerari de Fonaments en Biologia

Sanitària. Curs 2017-2018.

Títol: Rol de les xarxes perineuronals en la plasticitat d'interneurons de l'escorça cerebral adulta

Estudiant: Edna Ripollés Campos. edricam@alumni.uv.es

Tutor acadèmic: Dr. Juan Nácher Roselló. PDI- Catedràtic de la Universitat de València. Departament de Biologia Cel·lular, Biologia Funcional i Antropologia Física, Facultat de Ciències Biològiques. Juan.Nacher@uv.es

Modalitat Treball Fi de Grau: Experimental. Treball d'investigació. Àrea Neurobiologia.

Universitat de València. Grau de Biologia. Curs 2017-2018.

Data d'entrega: 2 de juliol de 2018.

ÍNDEX

Resum.....	3
Abstract.....	3
1. Introducció.....	4
2. Materials i mètodes.....	9
2.1. Animals i declaració ètica.....	9
2.2. Tractament. Depleció de les xarxes perineuronals en el còrtex prefrontal medial.....	10
2.3. Perfusió, microtomia i immunohistoquímica.....	11
2.4. Microscòpia confocal i anàlisi d'imatges.....	13
2.5. Tractament estadístic.....	15
3. Resultats.....	16
3.1. Comprovació de la depleció de xarxes perineuronals.....	16
3.2. Densitat sinàptica.....	16
3.3. Intensitat de fluorescència de la CaMKII i la parvalbúmina.....	17
3.4. Àrea mitjana dels puncta perisomàtics parvalbúmina positius sobre neurones piramidals.....	17
4. Discussió.....	20
Agraïments.....	25
Annex 1.....	26
Bibliografia.....	27

Rol de les xarxes perineuronals en la plasticitat d'interneurones en l'escorça cerebral adulta

Edna Ripollés Campos¹, Juan Nácher Rosselló^{2,3,4}.

¹Grau Biologia. Departament de Biologia Cel·lular, Biologia Funcional i Antropologia Física, Universitat de València, Burjassot 46100, Espanya,. ²Neurobiology Unit, Cell Biology Department, Interdisciplinary Research Structure for Biotechnology and Biomedicine (BIOTECMED), Universitat de València, Burjassot 46100, Espanya, ³CIBERSAM: Spanish National Network for Research in Mental Health, 28029 Madrid, i ⁴Fundación Investigación Hospital Clínico De Valencia, INCLIVA, Valencia 46010, Espanya.

Resum

L'esquizofrènia és un trastorn psiquiàtric complex que afecta a aproximadament el 1% de la població mundial. Tot i que els mecanismes etiopatològics exactes romanen sense esclarir, un recent cos d'evidències apunta a la possible implicació de les xarxes perineuronals, uns agregats especialitzats de la matriu extracel·lular presents en el neocòrtex de mamífers. La formació de les xarxes perineuronals durant el desenvolupament postnatal, el seu possible paper en el control de la plasticitat sinàptica i la seva co-localització amb diferents poblacions neuronals GABAèrgiques que expressen parvalbúmina, suggereixen que l'alteració d'aquestes estructures podria trencar el balanç d'excitació/inhibició en els circuits neurals corticals, conduint a l'emergència d'alguns dels símptomes de l'esquizofrènia i la disfunció de les capacitats cognitives. En el present article hem comprovat els efectes de la depleció artificial de les xarxes perineuronals mitjançant la injecció intracerebral d'un enzim específic (la condroïtinasa ABC) en ratolins adults. Hem mesurat els canvis en la densitat de connexions sinàptiques GABAèrgiques sobre els somes de neurones piramidals del còrtex prefrontal medial, a més d'altres paràmetres d'interès relacionats amb la funcionalitat d'aquests elements neuronals. Tot i que no s'han observat diferències en la connectivitat, proposem l'existència d'algun mecanisme de compensació front la pèrdua d'eficàcia sinàptica.

Paraules clau: balanç d'excitació/inhibició, plasticitat sinàptica, xarxes perineuronals, interneurones GABAèrgiques-PV⁺, esquizofrènia.

Abstract

Schizophrenia is a complex psychiatric disorder that affects approximately 1% of the world population. Although the exact etiopathological mechanisms remain unclear, an increasing body of evidence links schizophrenia to perineuronal nets, specialized aggregates of the extracellular matrix present in the neocortex of mammals. The formation of perineuronal nets during postnatal development, their possible role in the control of synaptic plasticity and its co-location with different GABAergic neuronal populations that express parvalbumin, suggest that the alteration of these structures could disrupt excitement/ inhibition balance in cortical neural circuits, leading to the emergence of some of the symptoms and dysfunction of cognitive abilities detected in schizophrenia patients. In the current article, we have tested the effects of the depletion of perineuronal nets by intracerebral injection of a specific enzyme (chondroitinase ABC) in adult mice. We have calculated changes in the density of parvalbumin-positive GABAergic synaptic connections on the somata of pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex, as well as other parameters of interest related to the functionality of these neuronal elements. Even though we have not noticed differences in connectivity, we propose the existence of any compensation mechanisms against the loss of synaptic efficacy.

Keywords: excitatory/Inhibitory balance, synaptic plasticity, perineuronal nets PV⁺-GABAergic interneurons, schizophrenia.

1. Introducció

Un dels principals reptes als que s'enfronta la neurociència actual és esbrinar com el pensament i la conducta complexa emergeixen de l'organització i l'activitat coordinada de milers de milions d'elements neurals. Una de les àrees més complexes i evolutivament més moderna és l'escorça prefrontal (PFC), una regió del neocòrtex localitzada en la part més anterior de l'encèfal. El còrtex prefrontal és una estructura altament elaborada en primats, encara que també poden trobar-se algunes regions homòlogues en rosegadors. Rep i envia connexions a pràcticament tots els sistemes corticals sensorials, motors i vàries àrees subcorticals. Es troba involucrat en diverses

funcions cognitives que inclouen la presa de decisions, la comprensió del llenguatge, l'atenció selectiva o la memòria de treball [1–3]. No obstant, aquesta complexitat suposa un compromís amb la taxa d'emergència d'errades. Diferents desordres psiquiàtrics com l'esquizofrènia, la síndrome bipolar o la depressió s'han relacionat amb un incorrecte equilibri de l'excitació/inhibició causant d'alteracions funcionals i estructurals dels circuits neurals en el còrtex prefrontal [4,5]. La natura de tals perturbacions i la seva relació amb els trastorns roman sense esclarir.

De forma general s'accepta l'harmonia global en el sistema nerviós entre els senyals excitatoris i inhibitoris de manera que tendeixen a anul·lar-se mútuament [6]. Perquè s'encete un potencial d'acció, s'han suggerit dos escenaris diferents. Un d'ells suposa un control mitjançant l'activitat inhibidòria sobre un flux elèctric continu establert per defecte [7,8]. En contraposició, s'ha plantejat com senyals antagònics iniciats espaiadament en el temps són capaços de controlar el dispar en la neurona postsinàptica [9,10]. En qualsevol dels casos, existeixen mecanismes homeostàtics establerts en l'etapa fetal i postnatal a través dels processos de sinaptogènesi i remodelat sinàptic que assegurin el correcte balanç en cada moment. Si aquests són deficientes i manquen els mecanismes de compensació, el desencadenament de la hipofunció del sistema inhibitori dona lloc al processament aberrant de la informació i, com a conseqüència, el deteriorament de les capacitats cognitives [5]; un procés observat en l'esquizofrènia.

L'esquizofrènia és un desordre multifactorial greu que afecta aproximadament al 1% de la població mundial [11]. Al peu de la lletra significa “ment escindida” tot i que no implica personalitat dividida o múltiple. El mot fou encunyat per Eugen Bleuler (1911-1950) per evidenciar la ruptura amb la realitat produïda per la desorganització de les diverses funcions de la ment [12–14]. Aquesta dolència es caracteritza per la manifestació clínica de tres categories de símptomes: positius, negatius i dèficits cognitius. Els primers inclouen conductes intrusives que no haurien de presentar-se en individus sans. Típicament comprenen trastorns del pensament, deliris i al·lucinacions. Pel que fa als símptomes negatius, fan referència a l'absència de conductes normals com la falta de reactivitat emocional, parla escassa, anhedònia o aïllament social. A més, els pacients esquizofrènics experimenten un deteriorament progressiu de les seves capacitats cognitives [15,16]. Malgrat que l'etiologia exacta de l'esquizofrènia no és coneguda, recents estudis evidencien com la disfunció de les neurones inhibitories en el cistell de tipus GABAèrgic (GABA, àcid γ -aminobutíric) que expressen parvalbúmina

(PV⁺)- una classe principal d'interneurons en el còrtex prefrontal [17]- presenta un rol essencial en el seu desenvolupament [18–21]. Aquestes dades són consistents amb els estudis farmacològics i de neuroimatge on es prova una estreta relació entre els símptomes positius de l'esquizofrènia i un increment significatiu de l'activitat d'alguns nuclis dopaminèrgics (fonaments de la hipòtesi dopaminèrgica) [22,23]. Algunes de les conjectures enunciades en relació al detriment de les neurones PV⁺ senyalen, entre d'altres factors, a l'estrès oxidatiu. Les interneurons PV⁺ mostren una elevada freqüència de disparos de potencials d'acció (comportament anomenat *fast-spiking*), pel que és concebible que l'alta taxa metabòlica cel·lular facilite la formació d'espècies reactives d'oxigen [24,25]. Altres sospites recauen en la hipofunció dels receptors glutamatèrgics NMDA (N-metil-D-aspartat) implicats en la inhibició de les pròpies interneurons mitjançada per *feedback* [26,27] i la disminució de l'expressió i activitat de la calci/calmodulina-proteïnaquinasa II (CaMKII) [28]. Aquests són suggerits com mecanismes comuns als canvis de la plasticitat funcional i estructural glutamatèrgica (hipòtesi glutamatèrgica). Tanmateix, la implicació de la CaMKII en l'esquizofrènia i altres desordres resulta encara motiu de debat. En els últims anys, els esforços s'han dirigit a l'estudi d'un potencial mecanisme addicional: l'alteració de les xarxes perineuronals (PNNs).

Les xarxes perineuronals van ser descrites per primera vegada al segle XIX per Camilo Golgi (1843–1926) i, de fet, va emprar el seu descobriment per argumentar la teoria reticular sobre l'organització del sistema nerviós. Golgi les va definir com “un fi embolcall, presumiblement de neuroqueratina, entramat o continu que envolta no sols el soma de les cèl·lules, sinó també les seves branques” [29]. No obstant, les conclusions extreïdes a partir d'unes mateixes dades no sempre s'ajusten i són font de conflictes entre estudiosos. L'existència de les xarxes perineuronals va ser negada per Santiago Ramon i Cajal suggerint que eren un mer artefacte de la fixació tissular. Rere les declaracions de Cajal, l'estudi de les PNNs va caure en l'oblit (figura 1A) [30]. Els darrers avanços en la histoquímica i la immunohistoquímica han permès la confirmació de l'existència d'aquesta estructura i el plantejament d'un nou enfocament en la neuroanatomia funcional i patològica. Hui en dia se sap que les xarxes perineuronals són agregats especialitzats de molècules de la matriu extracel·lular (EMC) que envolten el soma, les dendrites i el segment inicial de l'axó de diferents poblacions neuronals [31,32].

Els principals constituents de les PNNs són els proteoglicans de condroitín sulfat (CSPGs), l'àcid hialurònic, la tenascina-R i proteïnes d'unió. D'altres importants inclouen la reelina i la semaforina 3A [32] (figura 1B).

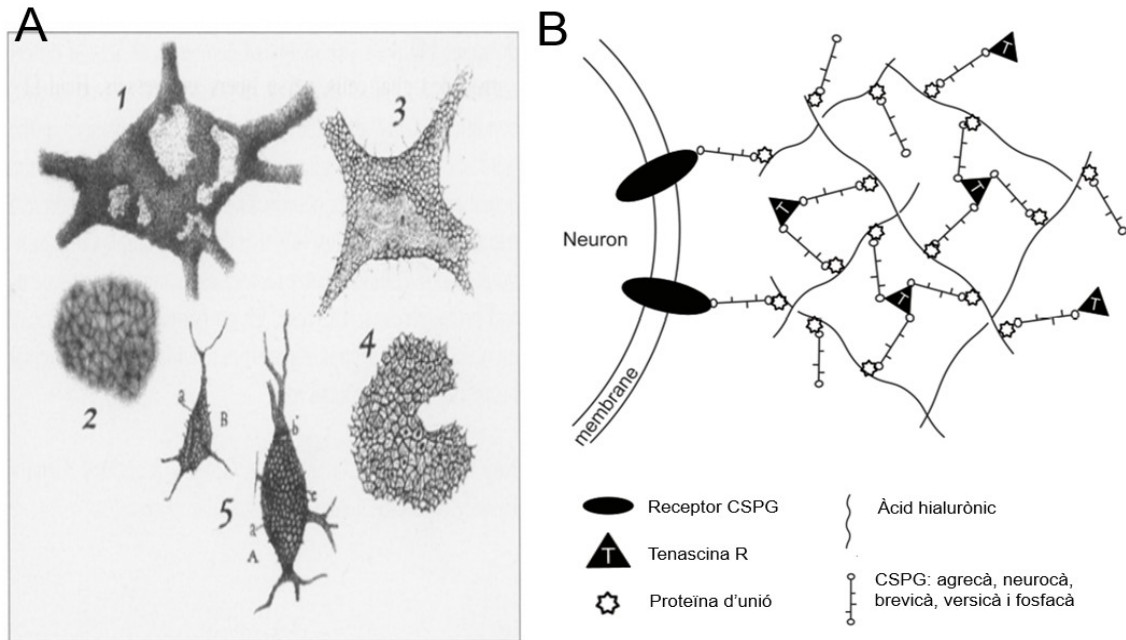


Figura 1. A) Dibuixos realitzat a mà per Camilo Golgi, Santiago Ramon i Cajal i Arturo Donaggio. Les numeracions corresponen a les següents estructures tissulars: 1. Cèl·lula nerviosa amb un recobriment reticular procedent de l'asta dorsal de la medul·la espinal d'un gat (Golgi). 2. Patró geomètric de les xarxes perineuronals (Golgi). 3. Cèl·lula nerviosa procedent de l'asta dorsal de la medul·la espinal d'un gos (Donaggio). 4. Detall d'una xarxa pericel·lular formada per fins filaments que s'irradien des d'un punt central (Donaggio). 5. Neurona d'axó curt del cervell d'un gat. Plecs en la xarxa pericel·lular que podrien confondre's amb fibres nervioses (Cajal). Font: Vitellaro-Zucarello, L. De Biasi, S. Spreafico, R. 1998 **B)** Esquema a nivell molecular de la composició i organització de les xarxes perineuronals. L'àcid hialurònic i els proteoglicans de condroitín sulfat (CSPG) s'entrecreuen formant una estructura reticular laxa emprant les proteïnes d'unió i la tenascina R com aconcatge. Aquesta estructura es troba connectada a les neurones que embolcalla a través dels receptors de CSPG, com la contactina-1, RPTP σ , LAR i NgR. Font: Qing-Long, M. Qian, Y. Xiao, Z. 2014

La composició de la matriu extracel·lular i, per tant, les seves propietats experimenten una modificació al llarg del desenvolupament postnatal. La forma juvenil- la qual afavoreix la neurogènesi, la migració cel·lular, el creixement axònic i la sinaptogènesi- és gradualment substituïda per la conformació adulta, caracteritzada per la seva acció restrictiva de la plasticitat sinàptica [33]. Les xarxes perineuronals es formen tardanament durant aquesta última etapa. En particular, apareixen progressiva i paral·lelament a la definició del període crític en el neocòrtex en formació. En la majoria dels animals el repertori de comportaments- entre ells les estratègies de busca

d'aliment, lluita i aparellament- depèn en gran part dels patrons de connectivitat establerts pels mecanismes intrínsecs del desenvolupament. No obstant, el sistema nerviós dels animals complexos, inclosos els éssers humans, s'adapta a les circumstàncies particulars del medi exterior i rep la seva influència. Aquests factors ambientals tenen especial importància per a la vida en fase primerenca durant les finestres temporals denominades períodes crítics. Els períodes crítics són les etapes durant les quals la plasticitat neuronal es troba particularment augmentada i tenen relació amb la maduració de determinats circuits neuronals. En alguns casos, com l'adquisició del llenguatge, les influències instructives del medi ambient són òbviament necessàries pel desenvolupament normal del comportament. La pèrdua de les xarxes perineuronals prolonga el període crític [33–35]. S'especula que el seu rol en la regulació de la plasticitat és mitjançat per tres mecanismes: (i) formant una barrera física que impedeix la innervació [36]; (ii) unint o segrestant neurotrofines i factors de transcripció de manera que queden accessibles als receptors de la superfície cel·lular o permetent el seu pas cap al citoplasma [37]; i (iii) compartimentant la superfície cel·lular per controlar la difusió lateral de receptors a través de la membrana cel·lular [38,39].

En el cas de què les xarxes perineuronals també es troben implicades en el refinament sinàptic en el còrtex prefrontal humà durant el període prepuberal d'una manera semblant amb la que col·laboren amb el tancament del període crític, es podria esperar que la formació deficient en aquestes comprometés la consolidació de les connexions sinàptiques dependents de l'activitat neural generada per interaccions amb el món exterior. Com a conseqüència, l'estructura del PFC romandria excessivament plàstica, en una mena d'estat juvenil permanent. L'equilibri excitació/inhibició es trencaria i la integritat, estabilitat i fidelitat dels circuits neurals en relació a la transmissió de la informació es veuria compromesa. Tenint en compte que s'ha detectat un menor marcatge de PNNs en diverses regions cerebrals de subjectes amb esquizofrènia (amígdala, còrtex entorhinal i prefrontal) [40,41], aquest escenari podria explicar, almenys en part, l'edat de debut dels primers brots psicòtics i la persistència dels dèficits cognitius i símptomes que caracteritzen el curs d'aquesta malaltia debilitant.

Amb l'objectiu de recrear les condicions patològiques trobades en pacients afectats d'esquizofrènia segons els antecedents presents i poder comprovar quin paper exerceixen les xarxes perineuronals en relació al balanç en l'excitació/inhibició i la

permissivitat en la remodelació sinàptica, el nostre laboratori ha dut a terme la depleció de les xarxes perineuronals de l'escorça prefrontal adulta. Açò s'ha aconseguit amb la injecció intracerebral d'un enzim (condroïtinasa ABC) que digereix específicament aquests elements de la matriu extracel·lular. Posteriorment, s'ha recuperat el material encefàlic i s'ha comparat amb immunohistoquímica la densitat de les sinapsis GABAèrgiques-PV⁺ establertes sobre les neurones piramidals del còrtex prefrontal medial- més concretament, la capa III i V del còrtex cingulat (àrea 1), el prelímbic i l'infralímbic- amb el fenotip sense tractar (grup control). També s'ha quantificat la intensitat de fluorescència del marcatge immunohistoquímic de la CaMKII en les mateixes neurones piramidals d'ambdós grups experimentals per tal de detectar variacions en la seva expressió, així com la intensitat de la parvalbúmina dels punts que rodegen les neurones piramidals i la seva àrea mitjana. La generació de nous coneixements en aquesta àrea és fonamental, no sols per assentar les bases dels mecanismes que subjauen el correcte desenvolupament del sistema nerviós central, sinó també per esclarir l'etiologia de trastorns psiquiàtrics amb un possible denominador comú i dissenyar noves estratègies de prevenció, diagnòstic i tractament.

2. Materials i mètodes

2.1. Animals i declaració ètica

14 ratolins Pvalb-tdTomato [C57BL/6-Tg(Pvalb-tdTomato)15Gfng/J] amb tres mesos d'edat han estat emprats en aquest estudi (n= 7 condroïtinasa ABC, n=7 control; The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Aquesta soca transgènica expressa la proteïna fluorescent roja tdTomato sota el control del promotor *Pvalb* del ratolí, de manera que el marcatge es detecta amb un patró similar a la parvalbúmina endògena en aquelles neurones que l'expressen [42]. Els animals s'han mantingut en grups de tres o quatre en gàbies de les nostres instal·lacions sota condicions estàndard de temperatura, humitat i llum (cicle de 12 hores de llum/obscuritat), i amb accés a aigua i menjar *ad libitum*.

Tots els procediments experimentals amb els animals s'han dut a terme d'acord amb la directiva 2010/63/EU del Parlament Europeu i el consell del 22 de setembre de 2010 per la protecció dels animals emprats amb finalitats científiques, i han estat aprovats pel

Comitè de Bioètica de la Universitat de València. S'han realitzat tots els esforços per minimitzar el nombre d'animals emprats i el seu sofriment.

2.2. Tractament. Depleció de les xarxes perineuronals en el còrtex prefrontal medial

Els ratolins van ser inicialment anestesiats via intraperitoneal (i.p) amb una barreja de quetamina (50 mg/kg; Imalgene, Merial) i medetomidina (1 mg/kg; Sedator, Dechra). Aquests compostos instauren un estat d'inconsciència acompanyat d'analgèsia, relaxació muscular, supressió dels reflexos neurals i asseguren el manteniment de les constants vitals dels animals. A continuació, es van situar en un instrument estereotàxic (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) i se'ls va realitzar les injeccions intracerebrals en el còrtex prefrontal medial mitjançant una xeringa Hamilton de 10 µl i una agulla 26G emprant les coordenades de l'atles de Paxinos i Watson [43] en els següents punts (en mm des de bregma i la superfície del crani): Bregma +2,00; mediolateral $\pm 0,25$; profunditat -2,00. Les injeccions es van realitzar en l'hemisferi dret de cada animal. L'agulla es va mantindre en posició durant 1 minut i tot seguit es va injectar 1 µl de l'enzim condroitinasa ABC (ChABC 50 U/ml en tampó fosfat salí i 0,02% BSA; Sigma-Aldrich St. Louis, MO) mantenint el flux constant durant 1 minut. Seguidament a la subministració de la solució, l'agulla es va deixar de nou en posició durant 2 minuts més per reduir el reflux i finalment es va retirar. Es va realitzar el mateix procediment per als animals control (penicil·lasa 50 U/ml en tampó fosfat salí i 0,02% BSA; Sigma-Aldrich).

Mitjançant experiments pilot es va estimar el temps necessari d'incubació per obtenir el grau desitjat de degradació de la matriu i es va constatar l'abast de la difusió de l'enzim. Resumidament, van consistir en la realització d'injeccions intracerebrals de condroitinasa ABC i penicil·lasa seguint el mateix procediment que s'ha descrit fins el moment. Els ratolins van ser perfosos transcardialment deixant passar un nombre diferent de dies entre la injecció intracerebral i el sacrifici. Es va recuperar el material encefàlic i aquest va ser tallat en seccions coronàries de 50 µm mitjançant un vibràtom (Leica VT 1000E; Leica, Nussloch). Els talls resultants van ser sotmesos a una tinció immunohistoquímica seguint el protocol general que empra el mètode d'avidina-biotina peroxidasa (ABC). Primerament el teixit es va incubar amb tampó fosfat salí (PBS) amb

un 3% de H₂O₂ durant 10 minuts per eliminar l'efecte de l'activitat endògena de la peroxidasa. Amb l'objectiu de marcar les xarxes perineuronals, el teixit va ser incubat amb l'aglutinina biotilada *Wisteria floribunda* (se'n parla en detall en el següent apartat) seguit d'una solució del complex avidina-biotina peroxidasa en PBS. El desenvolupament del color es va aconseguir amb la incubació dels talls histològics amb una barreja al 0,05% de 3,3-tetrahidroclorur de diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich) i 0,033% de H₂O₂. El DAB és un cromogen donador d'electrons que esdevé un producte acolorit quan s'oxida [44]. Posteriorment, les seccions es van muntar en portaobjectes, es van assecar a temperatura ambient durant un dia, es van deshidratar amb un tren d'alcohols ascendent i es van rentar amb xilè. Finalment, les seccions es van cobrir amb medi de muntatge Eukitt i un cobreobjectes. Les xarxes perineuronals es van visualitzar amb el microscopi òptic convencional com unes agregacions en color marronós al voltant de les neurones en aquells animals que se'ls va injectar la solució control (figura 2B).

La condroitinasa ABC produeix una escissió endolítica dels enllaços 1,4-β-galactosamínics entre la N-acetilgalactosamina i l'àcid D-glucurònic o l'àcid L-idurònic, produint una barreja d'oligosacàrids de diferents grandàries. Aquest enzim, llavors, degrada una gran varietat de glicosaminoglicans del tipus condroitín sulfats i dermatan sulfats. També és capaç de lisar, tot i que a una taxa molt menor, l'àcid hialurònic [45]. Tal i com s'ha indicat anteriorment, els proteoglicans de condroitín sulfat són els principals components de les xarxes perineuronals, a més de l'àcid hialurònic, la tenascina-R i diverses proteïnes d'unió [46]. Per la qual cosa, la condroitinasa ABC resulta especialment adequada al nostre estudi.

D'altra banda, la penicil·lasa és un enzim β-lactamasa que hidrolitza antibiòtics del grup de les penicil·lines i aminopenicil·lines. És emprat com control negatiu ja que no existeix cap molècula estructural de la matriu extracel·lular que l'enzim empre com substrat.

Per a la reversió de l'anestèsia va ésser necessari l'administració d'atipamezol (0,5 mg/ml, 0,05 ml/animal i.p). Per últim, els ratolins es van retornar a les gàbies on hi van romandre fins el seu sacrifici.

2.3. Perfusió, microtomia i immunohistoquímica

Quatre dies després de les injeccions intracerebrals, els ratolins van ser perfosos transcardialment sota els efectes anestesiants del pentobarbital sòdic (150 mg/kg), primer amb NaCl 0,9% durant un minut per eliminar la sang dels vasos i tot seguit amb una solució de paraformaldehid (4%) en tampó fosfat salí (PBS; 0,1 M, pH 7,4) durant 20 minuts. L'objectiu de la fixació és preservar ràpida i uniformement les estructures histològiques en un estat realista. Mentre que la immersió directa en substàncies fixadores és efectiva per a porcions menudes de teixit, les mostres més grans com el cervell plantegen un problema ja que sovint els canvis en resposta a la hipòxia comencen abans de què el teixit es pugui conservar. L'avantatge que ofereix la perfusió és la ràpida distribució del fixador per totes bandes de l'organisme emprant la xarxa vascular natural. Trenta minuts rere la perfusió, els cervells van ser extrets del crani i els hemisferis van ser separats. L'hemisferi dret es van tallar en seccions coronals de 100 µm de grossor amb un vibràtom (Leica VT 1000E). Els talls es van recollir en 6 subsèries i es van emmagatzemar a 4°C en tampó fosfat (PB; 0,1M) amb fosfat d'azida (0,05%), un agent microbicida.

A fi de comprovar el paper de les xarxes perineuronals en la remodelació sinàptica del còrtex prefrontal medial i determinar els nostres paràmetres d'interès (intensitat de fluorescència de CaMKII en les neurones piramidals intensitat de la parvalbúmina en els puncta i grandària d'aquests) les seccions es van sotmetre a una tinció immunohistoquímica de la següent manera. El teixit va ser breument rentat amb PBS i a continuació es va incubar a temperatura ambiental i en agitació durant 2h amb sèrum d'ase al 10% (NDS; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) diluït en PBS amb 0,2% de Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) per tal de bloquejar les unions no específiques anticòs-antigen. Posteriorment els talls es van incubar en les mateixes condicions amb el còctel d'anticòs primaris amb tampó fosfat salí amb Tween 20 (PBST) i 5% NDS: (a) IgG1 anti-calci/calmodulina-proteïnquinasa II de ratolí (CaMKII; 1:500, Abcam) i (b) anti-PV de conillet d'Índies (1:2000, Synaptic Systems). Aquest últim anticòs ha estat emprat amb la finalitat d'augmentar el senyal fluorescent roig de la proteïna tdTomato. Per últim, els talls van ser incubats durant 1-2h a temperatura ambient amb els anticòs secundaris diluïts en PBST i 5% NDS (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories): (a) AlexaFluor-488 anti-ratolí IgG i (b) AlexaFluor-555 anti-conillet d'Índies. Aquesta selecció de marcadors immunohistoquímics va permetre visualitzar el nombre de puncta perisomàtics que

expressen parvalbúmina (emissió de llum roja) sobre els cossos cel·lulars de les neurones piramidals, el citoplasma de les quals s'observa en color verd (marcatge de la CaMKII).

Les xarxes perineuronals han estat marcades amb la l'aglutinina biotinitada *Wisteria floribunda* (Bio-WFA; 1:200, Sigma-Aldrich). És una lectina conjugada amb biotina que s'uneix selectivament als residus N-acetilgalactosamina β o α de les glicoproteïnes de les xarxes perineuronals que envolten algunes poblacions de cèl·lules nervioses [47]. La incubació amb streptavidina-AlexaFluor-405 (1:200, Life Technologies, Carlsbad, CA) revetlla la localització del marcatge. La unió avidina-biotina és irreversible i estable als canvis de pH, els solvents orgànics o els detergents.

Els talls histològics es van rentar amb PB 0,1 M i es van muntar ordenadament en portaobjectes gelatinitzats, des de les seccions més frontals a les més dorsals, emprant el medi de muntatge aquós Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako North America, CA).

2.4. Microscòpia confocal i anàlisi d'imatges

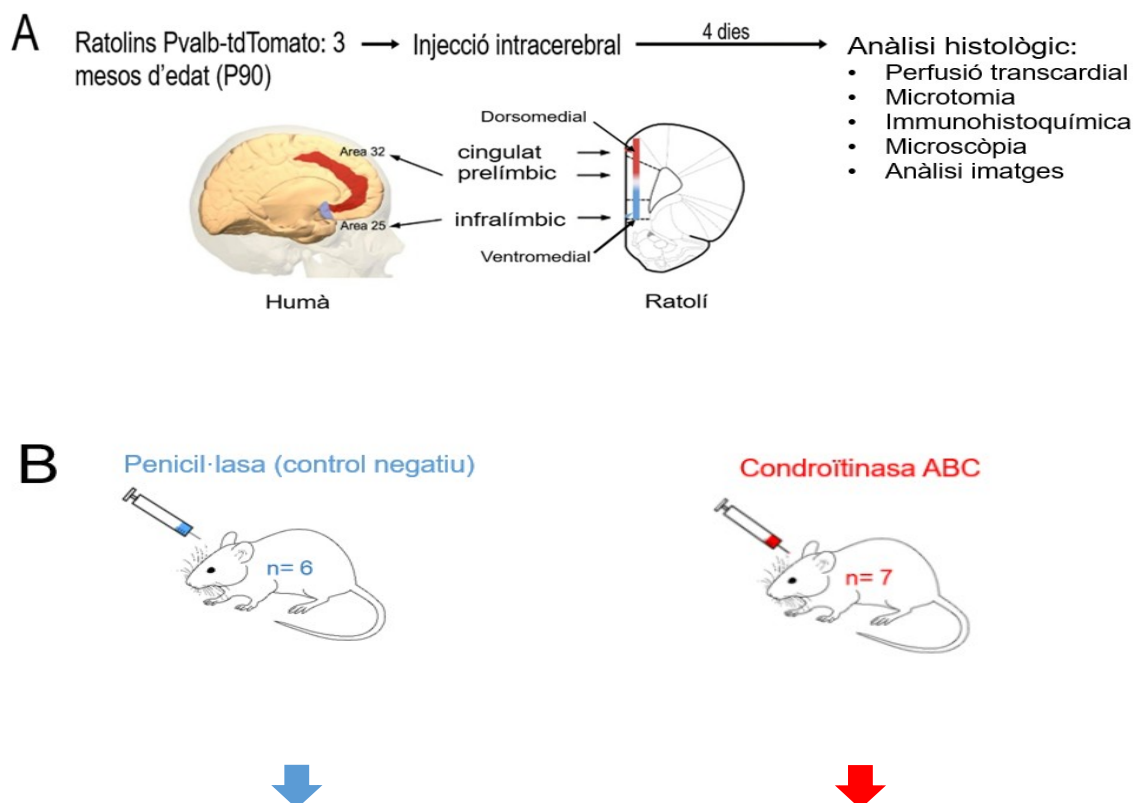
L'estudi s'ha centrat en les capes III i V de diferents àrees del còrtex prefrontal medial: el còrtex cingulat (àrea 1), el prelímbic i l'infraquímbic. Les imatges emprades per a la determinació de la quantitat de contactes sinàptics que reben les neurones excitadores de les interneurons PV⁺, així com els paràmetres relacionats la funcionalitat d'aquestes poblacions cel·lulars, es van realitzar amb un microscopi confocal (Leica TCS SPE) emprant l'objectiu x63 d'oli d'immersió i amb un zoom digital addicional de x2. Cada secció coronal de teixit, en tota la seva grossària, ha estat enregistrat mitjançant un *z-step* de 0,38 μm .

Per a la confirmació de la depleció de les xarxes perineuronals en els experiments pilot es va emprar un microscopi òptic convencional (Olympus BX). No es van realitzar imatges destinades al seu anàlisi en aquest cas. Per a la confirmació de la depleció en els animals de l'experiment, es va emprar el microscopi confocal emprant el canal per a l'ultraviolat. L'animal 1 va ser enretirat de l'estudi en detectar que la injecció amb l'enzim no va resultar efectiva.

Les imatges van ser processades emprant el software FIJI/ImageJ [48]. Les instruccions per al programa van ser compilades en un macro el qual va permetre la generació automàtica dels paràmetres desitjats (annex 1): perímetre de les neurones piramidals, intensitat de fluorescència de la CaMKII, nombre de punta sobre les neurones piramidals, intensitat de fluorescència de la parvalbúmina i àrea mitja dels punta perisomàtics. La densitat de les sinapsis s'ha calculat com el nombre de punta sobre la neurona piramidal dividit entre el perímetre d'aquesta. S'han seleccionat els plans amb el nivell de penetració òptima per a cada anticòs. Pel que fa a la parvalbúmina, pot detectar-se amb una alta intensitat en tot el gruix del teixit. No obstant, el marcador de la CaMKII presenta un penetrància limitada, pel que ha estat necessari seleccionar els *stacks* més propers a la superfície. A més, s'hi va aplicar el filtre *threshold* al 97,5% per reduir el soroll de fons de la tinció de parvalbúmina i discriminar amb major fiabilitat els contactes sinàptics amb el mateix criteri en tots els *stacks*.

Per cada animal es van seleccionar una mitjana de 15 neurones piramidals. Aquestes van ser triades a l'atzar amb l'únic requisit de poder distingir amb claredat els somes.

L'esquema general del procediment experimental es mostra resumit en la figura 2.



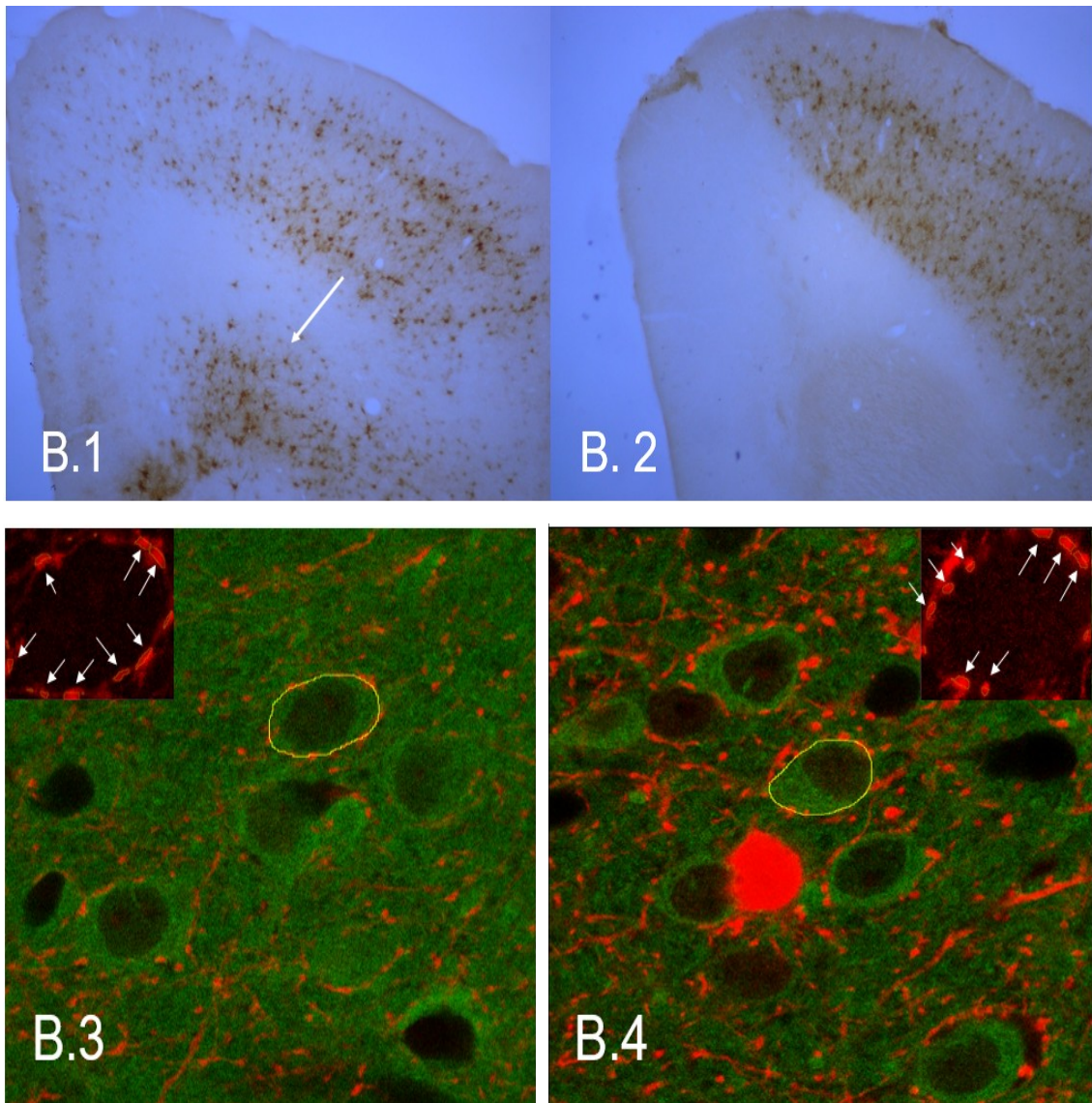


Figura 2. A. Esquema temporal del procediment experimental. Els ratolins transgènics PvalbtTomato consten de 3 mesos d'edat (P90) a l'inici de l'estudi. Aquests van ser injectats intracranialment en eixe moment amb el seu tractament corresponent. Es van deixar passar 4 dies abans de sacrificar els animals. Aquest és el temps necessari per aconseguir el grau desitjat de degradació de les xarxes perineuronals. El teixit es va fixar mitjançant una perfusió transcardial. El material encefàlic es va recuperar i tractar (microtomia i tinció immunohistoquímica) per a la seva anàlisi (microscòpia i obtenció d'imatges). S'observa, a més, un esquema d'un tall coronal del còrtex prefrontal del ratolí (Bregma 2.76 aproximadament) on es troben assenyalades les regions d'interès en el nostre estudi (còrtex cingulat, prelímbic i infralímbic) i l'estructura anatòmica homòloga en l'encèfal d'un humà. **B.1, B.2.** Exemple d'imatges obtingudes per microscòpia convencional òptica de cada grup experimental (condroïtinasa ABC i penicil·lasa per al grup control negatiu). En la imatge B.1 (control) i B.2 (condroïtinasa ABC) es pot comprovar com el tractament enzimàtic ha digerit les xarxes perineuronals, les qual apareixen marcades sols en la primera fotografia amb una clara coloració marró (àrea senyalada amb la fletxa blanca). **B.3, B.4.** Exemple d'imatges obtingudes per microscòpia confocal. Corresponen al moment d'obtenció dels paràmetres. En color verd apareix marcada la CaMKII, present en el citoplasma de les neurones piramidals excitatòries. En color roig apareix marcada la parvalbúmina. Aquesta es pot observar tant en somes

d'interneurons GABAèrgiques com en els punta que contacten sobre les neurones piramidals. Mitjançant el programa informàtic FIJI, la delimitació manual dels somes piramidals permet identificar els punts marcats en parvalbúmina que contacten sobre el seu perímetre. Aquest anàlisi apareix en una finestra menuda en un dels cantons superiors de la imatge principal. Les fletxes blanques senyalen els puncta identificats.

2.5. Tractament estadístic

Les diferències entre grups (factor: tractament i control) s'han comprovat aplicant el Test T per a mostres independents emprant el nombre d'animals com a grandària mostral (n=6 tractament, n=7 control) i un nivell de significació al 95%. S'han considerat com a variables independents: densitat de puncta PV⁺, l'àrea mitjana del total de puncta sobre un mateix soma, la intensitat de fluorescència de la CaMKII i la intensitat de fluorescència de la parvalbúmina. Abans de la realització del test estadístic, s'han eliminat els outliers de cada animal. Aquests han estat detectats per la conversió de les dades en puntuacions típiques (Z). També s'ha comprovat la normalitat amb el test de Shapiro-Wilk per a mostres de grandària menuda (<30) i l'homogeneïtat de variàncies amb la prova de Levene.

El programa estadístic utilitzat en tots les casos ha estat l'IBM SPSS Statistics 23.

3. Resultats

3.1. Comprovació de la depleció de xarxes perineuronals

Aquests resultats corresponen a l'experiment pilot que s'ha esmentat anteriorment en l'apartat de Material i mètodes. No s'ha realitzat cap quantificació del grau de degradació de les xarxes perineuronals. L'anàlisi ha consistit en la determinació *de visu* del moment en què hem considerat que la degradació de les xarxes perineuronals ha estat completada i exitosa. El dia òptim ha estat el quart rere la injecció de l'enzim.

3.2. Densitat sinàptica

La disminució de la densitat de les xarxes perineuronals s'ha descrit tant en pacients esquizofrènics post-mortem com en models animals que reproduïxen la malaltia. Per

determinar com afecta aquesta alteració a la connectivitat de les xarxes neuronals, es va estimar la densitat de punta PV⁺ sobre les neurones piramidals del còrtex prefrontal medial en dues condicions diferents: PNNs intactes i PNNs degradades enzimàticament. Per a fer aquesta estimació es va mesurar la densitat lineal de punta immunoreactius per a la parvalbúmina.

Aparentment, les mitjanes dels grups experimentals per a la variable “densitat de punta perisomàtics” no semblaren ser diferents en excés. A més, la desviació estàndard dels animals d’un grup difereixen poc respecte dels de l’altre. Tampoc s’intueixen valors molt dispars entre els animals d’un mateix grup experimental, fet que insinua que el procediment experimental i les anàlisis han estat realitzats correctament (taula 1).

La depleció de les xarxes perineuronals no va induir un descens significatiu en la densitat lineal de punta perisomàtics PV⁺ (test T per a mostres independents, ChABC: $0,28 \pm 0,03$ puncta/ μm Control: $0,39 \pm 0,04$ puncta/ μm ; p-valor $0,277 > 0,05$) (figura 3).

3.3. Intensitat de fluorescència de la CaMKII i la parvalbúmina

La intensitat de fluorescència de la CaMKII i parvalbúmina són paràmetres anàlegs a l’expressió d’aquestes molècules i, per tant, poden ser indicatives a la funcionalitat dels elements neuronals que les sintetitzen. A l’igual que amb la densitat sinàptica, s’ha quantificat la intensitat de fluorescència en les dues condicions experimentals.

Pel que fa a la CaMKII, els valors semblen presentar una major variabilitat entre els grups i, fins i tot, dins dels mateixos s’observen algunes mesures baixes respecte de la resta. Les desviacions estàndard mostrades són d’una escala aproximadament igual entre els animals tractats i els control (taula 1). En el cas de la fluorescència de la parvalbúmina, les mitjanes es mostren heterogènies d’un grup front a l’altre, així com una escala de desviació més estable. En concret, els animals tractats presenten valors més alts que el grup control.

La realització del test estadístic T per a mostres independents va mostrar que no existien diferències significatives en la intensitat de fluorescència de la CaMKII dins dels somes de neurones piramidals entre grups (ChABC: $54,89 \pm 15,31$ arbitrary units, Control: $59,34 \pm 26,78$ arbitrary units ; p-valor $0,727 > 0,05$) (figura 3). Tampoc es van trobar diferències significatives en la intensitat de fluorescència dels punta PV⁺ perisomàtics

(ChABC: $105,49 \pm 41,76$ *arbitrary units* , Control: $89,25 \pm 47,85$ *arbitrary units*; p-valor $0,532 > 0,05$) (figura 3).

3.4. Àrea mitjana dels puncta perisomàtics parvalbúmina positius sobre neurones piramidals

L'àrea mitjana del botons sinàptics és indicativa de la força en la transmissió de neurotransmissors entre l'element presinàptic i el postsinàptic. Aquest paràmetre es va calcular per al dos grups experimentals. El grup tractat aparenta presentar valors més alts, de mitjana, que el grup control. Per contra, l'escala d'error és pràcticament la mateixa (taula 1).

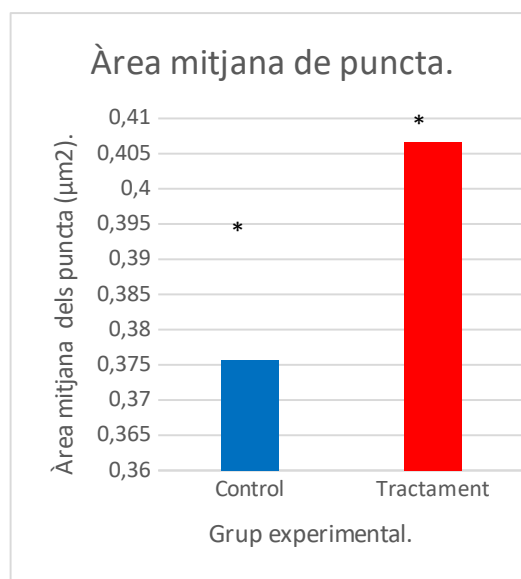
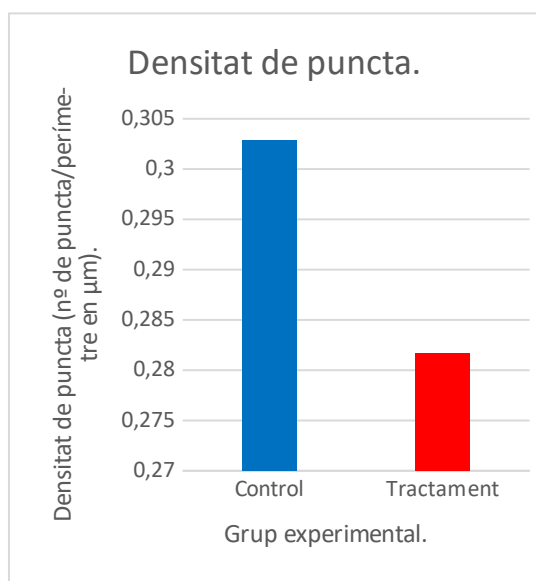
En aquest cas, la depleció de les xarxes perineuronals va conduir a un augment significatiu de l'àrea mitjana total dels puncta perisomàtics que expressaven PV (test T per a mostres independent, ChABC: $0,41 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$, Control: $0,37 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$; p-valor $0,03 < 0,05$) (figura 3).

Taula 1.-Resum de les dades obtingudes mitjançant l'anàlisi de les micrografies amb el programa ImageJ. Es presenta la mitjana dels valors de cada variable obtinguts de l'anàlisi de neurones individuals en cada animal (aproximadament 15-20 neurones per animal), juntament amb la seva desviació típica. El grup experimental al qual es troba assignat cada animal es troba indicat com: tractament (ChABC) o control. La variable "densitat de puncta PV⁺" ha estat calculada segons la relació nombre de puncta sobre la neurona piramidal escollida/perímetre de la neurona piramidal.

Mitjanes dels paràmetres.

Animal	Grup	Densitat puncta PV⁺ (nombre punta/ μm)	Fluorescència CaMKII <i>arbitrary</i> <i>units</i>	Fluorescència PV <i>arbitrary units</i>	Àrea puncta PV⁺ (μm^2)
Animal 2	Tractament	$0,31 \pm 0,06$	$50,24 \pm 10,94$	$59,88 \pm 13,27$	$0,39 \pm 0,09$
Animal 3	Tractament	$0,25 \pm 0,06$	$48,83 \pm 16,42$	$115,85 \pm 35,11$	$0,48 \pm 0,13$
Animal 4	Tractament	$0,26 \pm 0,05$	$74,8 \pm 10,51$	$132,31 \pm 38,86$	$0,41 \pm 0,07$
Animal 5	Tractament	$0,27 \pm 0,06$	$64,43 \pm 6,92$	$53,14 \pm 13,28$	$0,39 \pm 0,06$
Animal 6	Tractament	$0,32 \pm 0,05$	$30,51 \pm 2,38$	$111,11 \pm 17,87$	$0,35 \pm 0,07$

Animal 7	Tractament	0,28 ± 0,03	60,58 ± 13,21	160,63 ± 22,77	0,42 ± 0,08
Animal 8	Control	0,32 ± 0,05	35,42 ± 4,83	48,43 ± 13,87	0,37 ± 0,05
Animal 9	Control	0,31 ± 0,06	31,21 ± 10,59	72,83 ± 6,31	0,36 ± 0,11
Animal 10	Control	0,28 ± 0,06	31,18 ± 1,65	66,61 ± 15,47	0,46 ± 0,09
Animal 11	Control	0,29 ± 0,06	84,94 ± 17,98	100,17 ± 29,67	0,36 ± 0,07
Animal 12	Control	0,25 ± 0,04	95,22 ± 9,51	135,91 ± 37,01	0,39 ± 0,08
Animal 13	Control	0,29 ± 0,05	72,47 ± 14,31	166,54 ± 32,01	0,37 ± 0,07
Animal 14	Control	0,38 ± 0,07	64,96 ± 10,63	34,29 ± 10,96	0,32 ± 0,06



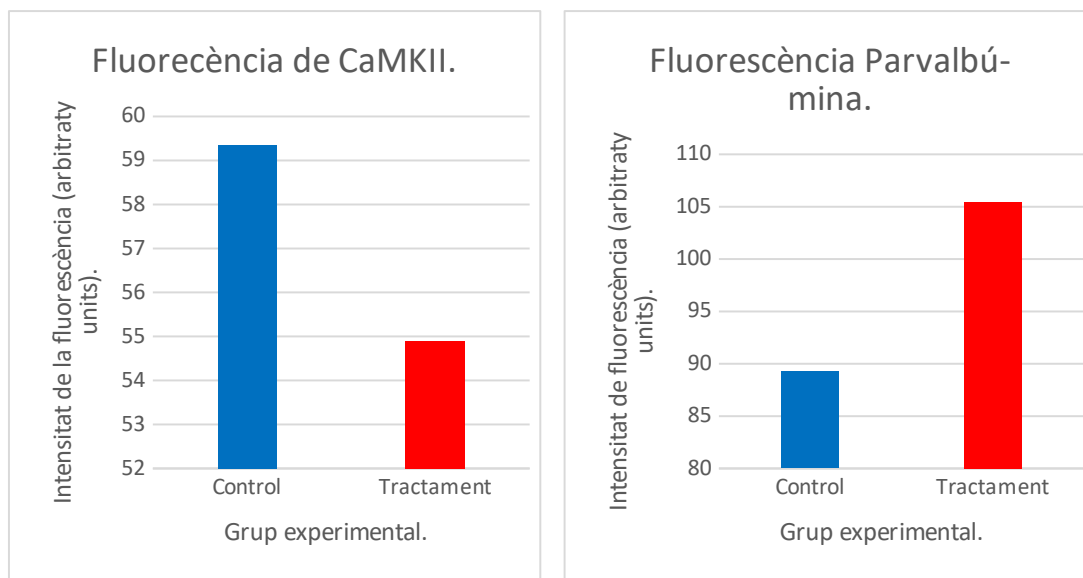


Figura 3. Representació en histogrames de la mitjana de cada grup experimental per a tots els paràmetres estudiats. L'escala de l'eix vertical s'ha ajustat per facilitar la visualització dels histogrames. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard per a cada cas. p-valor: * < 0,05. S'observa com no existeixen diferències significatives en les variables de densitat de puncta perisomàtics ni la fluorescència de la CaMKII o parvalbúmina. No obstant, l'àrea dels puncta és significativament major en el grup tractat on s'han eliminat enzimàticament les xarxes perineuronals.

4. Discussió

4.1. Efectes de la depleció de les xarxes perineuronals sobre la innervació perisomàtica de les neurones piramidals de l'escorça prefrontal adulta

Durant el desenvolupament postnatal del neocòrtex s'estableix el correcte balanç d'excitació/inhibició [6]. Les interneurons en cistell que expressen parvalbúmina formen un excés de sinapsis perisomàtiques sobre les neurones piramidals i posteriorment la innervació es redueix de manera progressiva fins adquirir una densitat sinàptica òptima [49]. En el còrtex prefrontal, l'activitat d'aquestes neurones PV⁺ regula el dispar de potencials d'acció excitatoris i sincronitza les poblacions de neurones piramidals, la qual cosa assegura el manteniment de la funció normal dels processos cognitiu complexos com, per exemple, la memòria de treball [50]. Alteracions en la densitat de les sinapsis inhibidores es troben relacionades amb les disfuncions cognitives que caracteritzen trastorns psiquiàtrics com l'esquizofrènia.

En els últims anys, s'han presentat les xarxes perineuronals- agregats especialitzats de matriu extracel·lular- com candidats potencials en la remodelació de les connexions sinàptiques. Tal i com s'ha comprovat en diferents estructures encefàliques com l'amígdala [51], l'escorça visual [34] o l'hipocamp [52], la formació de les PNNs restringeix la reestructuració de les connexions entre els elements neuronals i estableix les sinapsis ja establertes. Per contra, la seva eliminació artificial mitjançant el tractament enzimàtic restaura l'estat juvenil plàstic.

En el present estudi, hem descrit els efectes de la injecció intracranial de l'enzim condroitinasa ABC en relació a diferents paràmetres implicats amb la connectivitat dels circuits inhibitoris neuronals del còrtex prefrontal adult.

S'ha observat com la depleció de les xarxes perineuronals no indueix alteracions significatives en la densitat de punts perisomàtics PV⁺ al voltant de les neurones piramidals del còrtex prefrontal medial tot i que s'observa una tendència a una disminució del nombre d'aquests. Aquests resultats es troben en contraposició amb els d'un article publicat molt recentment en el qual l'eliminació de les xarxes perineuronals amb el mateix enzim emprat en el nostre estudi va disminuir la densitat de les sinapsis perisomàtiques GABAèrgiques en el PFC de cultius organotípics de ratolí [53]. A més, en aquest estudi s'ha proposat un possible mecanisme molecular que relaciona el neurocà, un tipus de CSPG (proteoglicà de condroitín sulfat) present en les PNNs, amb la restricció de la plasticitat sinàptica. El neurocà inhibeix l'associació de la NCAM (molècula d'adhesió cel·lular neuronal) amb l'efrinaA3 (EphA3) induïda pel lligand efrina-A5. Concretament, bloqueja físicament el lloc d'unió per a l'efrinaA3 situant-se dins el domini immunoglobulina-2 de la NCAM. En absència de neurocà, els lligands efrina-A activen el complex receptor consistent en la tirosina quinasa Eph3 i la NCAM, la qual cosa inicia cascades de senyalització en els terminals dels axons GABAèrgics per restringir la densitat de sinapsis perisomàtiques en les neurones piramidals a través del col·lapse del con de creixement en les interneurons. Així, doncs, l'eliminació de les xarxes perineuronals implica la desinhibició de la repulsió axònica o, dit en altres paraules, l'aturament de l'establiment de les sinapsis.

L'estructura i composició de les xarxes perineuronals és heterogènia i varia en funció de la seva localització i el moment del desenvolupament del sistema nerviós [54]. El nombre, longitud i complexitat de les cadenes de glucosaminoglicans; el seu patró de sulfatació (per exemple, en la posició CS-6 o CS-4) i la localització dels residus

sulfatats dins del conjunt de cadenes, són factors que afecten a la funcionalitat de les xarxes perineuronals [55–57]. A més del neurocà, entre els principals tipus de proteoglicans de condroitín sulfat consten el brevicà, el versicà i el fosfacà [46]. Donat que fins la data no s'ha descrit la composició de les xarxes perineuronals a nivell molecular en el còrtex prefrontal medial (cingulat, prelímbic i infralímbic), la discordança dels resultats obtinguts podria deure's, llavors, a la natura intrínseca d'aquestes formacions en diferents àrees del cervell.

Altra de les causes plausibles de la manca de diferències significatives en la densitat de puncta perisomàtics quantificats podria ser la depleció insuficient de les xarxes perineuronals, ja siga per una dosi deficient de condroitinasa ABC o per un sacrifici prematur dels ratolins. Molts dels articles publicats en relació a alteracions de la plasticitat sinàptica mitjançada per les xarxes perineuronals empren models organotípics de cultius neuronals on incuben directament el teixit amb l'enzim. D'aquesta manera resulta complicat realitzar extrapolacions als resultats produïts en una injecció intracerebral on juga un paper important la interferència d'altres elements i sistemes fisiològics corporals com, per exemple, el desencadenament de la resposta inflamatòria en l'àrea danyada per l'agulla, l'activació de les cèl·lules de micròglia, el tràfec molecular de citoquines... En el nostre laboratori vam dur a terme experiments pilot on es va comprovar mitjançant microscòpia òptica convencional el grau de degradació de les xarxes perineuronals. És possible que una determinació més acurada millorés la qualitat del resultat final.

4.2.- Expressió de la parvalbúmina i àrea dels puncta sinàptics

Un important cos d'evidències accepta la implicació de la matriu extracel·lular en la funció sinàptica. Els seus components modulen l'activitat dels canals iònics i receptors dels elements pre- i postsinàptics. També són capaços de respondre als canvis en l'activitat dels circuits neuronals captant compostos secretats, eliminant els dominis extracel·lulars de proteïnes transmembrana i alliberant els productes d'aquestes escissions a mode de molècules de senyalització [58]. El terme sinapsi tetrapartita s'ha proposat com una ampliació de la clàssica sinapsi tripartita en la que s'inclouen les cèl·lules nervioses i la glia [59].

Les alteracions de les PNNs en l'esquizofrènia igualment podrien tindre efectes adversos substancials sobre la funció de les neurones afectades. Primerament, les PNNs

tenen un alt grau de càrrega negativa i poden funcionar com embornals de cations [60,61]. Aquest paper pot ser particularment important per a què les interneurons PV⁺ mantinguin el seu comportament *fast-spiking*. Segon, la matriu extracel·lular és crítica en l'establiment local de la concentració d'ions clorur (Cl⁻) [62]. Per aquest fet, la interrupció de les xarxes perineuronals podria alterar l'establiment dels potencials postsinàptics inhibitoris. Estudis anteriors han detectat una reducció significativa en l'expressió de la parvalbúmina en el còrtex prefrontal dorsolateral en subjectes amb esquizofrènia [20,63] i en l'hipocamp de ratolins rere l'eliminació de les xarxes perineuronals [64].

La parvalbúmina és una proteïna encarregada d'unir ions calci (Ca²⁺) amb alta afinitat. Estructural i funcionalment és similar a la calmodulina i la troponina C. Es troba implicada en la regulació de l'alliberació del neurotransmissor en la fenedura sinàptica [50]. Així doncs, la reducció en la seva expressió podria resultar en una inhibició alterada de les neurones piramidals i contribuir als trets clínics típics de l'esquizofrènia. Tanmateix, el nostre equip no ha aconseguit detectar canvis en la intensitat de la fluorescència del marcatge en els puncta que envolten les neurones piramidals.

La síntesi de parvalbúmina, així com la formació de les xarxes perineuronals, és dependent de l'activitat dels circuits neuronals [65,66]. Per exemple, s'ha postulat com l'augment en l'expressió d'agrecà (un tipus de CSPG present en les PNNs) i la parvalbúmina en l'escorça sensorial durant el tancament del període crític podria deure's a l'increment dels imputs excitatoris en la regió [67]. Donades aquestes evidències i tenint en compte que la densitat dels puncta tampoc ha variat, seria esperable no detectar-hi tampoc canvis. Ara bé, la funcionalitat ha pogut veure's afectada a través d'altres mecanismes que no necessàriament impliquen la parvalbúmina. Com s'ha esmentat anteriorment, les xarxes perineuronals creen un microambient favorable a la transmissió del senyal nerviós a través dels circuits neurals. També es troben implicades en la protecció front l'estrès oxidatiu actuant com una mena d'esmoreïdors dels efectes nocius de les espècies reactives d'oxigen [68]. L'alteració en les interneurons PV⁺ podria causar una desregulació en els programes d'expressió gènica, de manera que la transmissió GABAèrgica resultés compromesa. L'increment en l'àrea dels puncta perisomàtics que hem detectat en els animals tractats amb condroitinasa ABC podria ser el resultat d'un mecanisme primerenc de compensació al decrement d'eficàcia d'aquesta neurotransmissió.

4.3. Expressió de la CaMKII

Nombrosos estudis han relacionat les alteracions en la neurotransmissió de les amines biogèniques en l'emergència dels brots psicòtics característics de l'esquizofrènia. L'anomenada hipòtesi dopaminèrgica va sorgir a mitjans del segle passat a partir de la caracterització de fàrmacs antipsicòtics (neuroleptics) amb acció antagònica sobre receptors de dopamina [69]. Per exemple, alguns d'aquests compostos com l'haloperidol, l'olanzapina o la clozapina tenen com a diana els receptors D2 [70]. En recolzament a aquesta hipòtesi, l'administració de drogues d'abús com la cocaïna i l'amfetamina, les quals actuen augmentant l'excitabilitat de les xarxes neuronals que empen aquest neurotransmissor, provoquen canvis en el comportament similars als que presenten els pacients d'esquizofrènia [71].

Durant un període de 40 anys, la indústria farmacèutica ha desenvolupat una bateria de fàrmacs antipsicòtics basats en la hipòtesi dopaminèrgica. No obstant, aquests són deficientes en varis aspectes: aproximadament un 25% dels pacients no experimenta una millora, sols és possible revertir els símptomes positius de l'esquizofrènia, els efectes secundaris derivats de la prolongació del tractament són nombrosos i amb freqüència greus [72]... L'acumulació d'aquestes evidències junt els avanços en la generació de models animals adequats a l'estudi de l'esquizofrènia han conduït a l'acceptació de que la hiperfunció dopaminèrgica sols constitueix part dels mecanismes etiològics de la malaltia. Dades experimentals posteriors van implicar a la neurotransmissió glutamatèrgica en l'anomenada hipòtesi de la hipofunció dels receptors NMDA (àcid α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolpropionat) [73]. Aquesta hipòtesi, al igual que l'anterior, deriva de la detecció d'antagonistes dels receptors de glutamat com la fenilciclidina (PCP), la zocilpina (MK-801) o la ketamina, els quals provoquen de forma mimètica tant els símptomes positius, com els negatius i els cognitius de l'esquizofrènia [74–76]. En canvi, l'administració a pacients esquizofrènics de coagonistes dels receptors millora, encara que de manera modesta, molts dels trets que impliquen aquest trastorn [77,78].

La calci/calmodulina-proteïnaquinasa II (CaMKII) i l'NMDA es troben involucrats en formes durables de plasticitat sinàptica, les quals constitueixen substrats per a canvis permanents en el comportament. L' α CaMKII és ben coneguda per la seva implicació en

la potenciació a llarg termini (LTP) en les sinapsis excitatòries. Aquest terme fa referència a l'augment prolongat de l'eficiència i força sinàptica; en l'hipocamp, aquest procés ocorre durant l'aprenentatge i resulta essencial per a molt tipus de memòria [79,80]. Com a exemple, els ratolins heterozigòtics per a mutacions nul·les de la isoforma α CaMKII (α CaMKII^{+/-}) presenten un comportament profundament desregulat i una formació neuronal alterada de la circumvolució dentada de l'hipocamp, fenotips detectats en l'esquizofrènia i altres malalties psiquiàtriques [81].

A nivell molecular s'accepta, de forma general, que l'activació de la CaMKII per autofosforilació de residus de treonina enforteix les sinapsis glutamatèrgiques a través de l'estimulació de la translocació dels receptors de glutamat NMDA a la densitat postsinàptica de la dendrita i l'augment de la conductància d'aquests [79]. Seria esperable, llavors, que es donaren alteracions en l'expressió o funció de la CaMKII.

Existeixen evidències que impliquen l'acció de les xarxes perineuronals en el correcte funcionament de la regulació dels tràfec dels receptors NMDA. La superfície neuronal es troba compartimentada físicament per aquestes estructures. D'aquesta manera actuen a mode de barreres que impedeixen la difusió lateral dels receptor NMDA i el seu intercanvi per d'altres nous durant els períodes d'increment de la freqüència i intensitat del dispar de potencials d'acció entre dos elements neuronals. En el nostre estudi s'ha intentat determinar canvis quantitius en la síntesi de CaMKII relacionats amb l'eliminació de les xarxes perineuronals.

La CaMKII és una molècula crítica en múltiples processos que impliquen la transducció dels senyal mitjançada per l'ió calci (Ca^{2+}). La regulació de la seva expressió i activitat és complexa i, de fet, els mecanismes pels quals es veu afectada en algunes de les malalties psiquiàtriques com l'esquizofrènia no són clars i constitueixen un dels temes de debat actuals [28]. En el nostre estudi no s'han obtingut resultats significatius que relacionen l'eliminació de les xarxes perineuronals i canvis en la concentració de CaMKII en el soma de les neurones piramidals.

Seria interessant realitzar darrers anàlisis moleculars més precisos com la quantificació de l'expressió de la CaMKII mitjanant l'obtenció de cDNA dels transcrits del gens d'interès i la realització d'una qPCR. La determinació de la fluorescència en aquest cas pot haver estat subjecta a múltiples errors; com s'ha esmentat anteriorment, la penetrància del marcador immunohistoquímic de la CaMKII és lleu i podria no haver-se

unit a la seva diana de la forma esperada. A més, l'estat del teixit encefàlic després d'haver realitzat la perfusió als animals també és determinant per la identificació correcta dels elements neurals i l'eliminació de marcatge no específic.

Agraïments

Primerament, agrair al meu tutor per donar-me l'oportunitat de formar-me una mica més com a biòloga durant la meva col·laboració al departament i la realització d'aquest treball. També a Hèctor, per la seva infinita paciència i els seus consells.

Gràcies al meus amics, per les hores de riures i plors que hem compartit al llarg d'aquests anys; a la meua parella, per haver-me ajudat inclòs quan no ho mereixia, i a la meua família, que m'ha empenyat sempre a fer allò que estimo i m'apassiona. Per últim, tot i ser sols un Treball Fi de Grau, el dedico al meu "uelo" Paco, qui no m'ha pogut veure amb el títol a la mà, però sé que n'estaria molt orgullós.

Annex 1

Taula 2. Instruccions dirigides al programa informàtic ImageJ emprades per a la quantificació automàtica del nombre de puncta perisomàtics sobre l'àrea delimitada manualment corresponent a la perifèria de les neurones piramidals. El programa és capaç de discriminar amb fiabilitat suficient el marcatge de fons en color roig amb el nombre de botons gràcies a l'establiment de filtres que descarten tots aquells píxels el valor dels quals es troba sota la intensitat considerada com crítica. No obstant, hem de parlar de puncta perquè no hi ha evidència de què totes les estructures marcades es tracten de sinapsis (caldría la realització de fotografies de microscòpia electrònica). A través d'aquest macro també s'ha quantificat la intensitat de fluorescència de la CaMKII i de la parvalbúmina, a més de l'àrea mitjana total del nombre de puncta que contacten sobre una mateixa neurona.

macro-edna.ijm	
Nombre instrucció	Mode d'execució en el FIJI (Just ImageJ)
1	run("Set Measurements...", "area mean perimeter redirect=None decimal=2");
2	run("ROI Manager...");
3	roiManager("Add");
4	roiManager("Select", 0);

5	run("Measure");
6	run("Enlarge...", "enlarge=-0.5");
7	roiManager("Add");
8	roiManager("Select", newArray(0,1));
9	roiManager("XOR");
10	//change the channel to measure camkii intensity 2 is green
11	run("Duplicate...", "duplicate channels=2");
12	run("Measure");
13	close();
14	roiManager("Select", 0);
15	run("Enlarge...", "enlarge=0.5");
16	roiManager("Add");
17	roiManager("Select", newArray(0,2));
18	roiManager("XOR");
19	//change the channel to measure PV intensity 1 is red
20	run("Duplicate...", "duplicate channels=1");
21	run("Gaussian Blur...", "sigma=1");
22	run("Duplicate...", "duplicate");
23	run("Clear Outside");
24	tissueThreshPerc = 97.5;
25	nBins = 255;
26	getHistogram(values, count, nBins);
27	cumSum = getWidth() * getHeight();
28	tissueValue = cumSum * tissueThreshPerc / 100;
29	cumSumValues = count;
30	for (i = 1; i<count.length; i++)
31	{
32	cumSumValues[i] += cumSumValues[i-1];
33	}
34	for (i = 1; i<cumSumValues.length; i++)
35	if (cumSumValues[i-1] <= tissueValue && tissueValue <= cumSumValues[i])
36	{
37	setThreshold(i,255);
38	setOption("BlackBackground", false);
39	run("Convert to Mask");
40	}
41	run("Fill Holes");
42	run("Watershed");
43	run("Create Selection");
44	run("Copy");
45	run("Analyze Particles...", "size=0.05-Infinity summarize");
46	close();

47	run("Restore Selection");
48	run("Measure");
49	//close();
50	roiManager("Deselect");
51	roiManager("Delete");

Bibliografía.

1. Miller, E. K. & Cohen, J. D. 2001 An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 167–202. (doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.167)
2. Miller, E. K. Freedman, D. J. Wallis, J. D. 2002 The prefrontal cortex: Categories, concepts and cognition. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **357**, 1123–1136. (doi:10.1098/rstb.2002.1099)
3. Valverde, F. 2002 Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Rev. Neurol.* **34**, 758–780.
4. Price, J. L. & Drevets, W. C. 2012 Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. *Trends Cogn. Sci.* **16**, 61–71. (doi:10.1016/j.tics.2011.12.011)
5. Marín, O. 2012 Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 107–120. (doi:10.1038/nrn3155)
6. Shadlen, M. N. & Newsome, W. T. 1994 Noise, neural codes and cortical organization. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 569–579. (doi:10.1016/0959-4388(94)90059-0)
7. Oishausen, B. A. Anderson, C. H. Essenla, D. C. Van. 1993 A Neurobiological Model of Visual Attention and Invariant Pattern Recognition Based on Dynamic Routing of Information. *J. Neurosci.* **13**, 4700–4719. (doi:10.1.1.66.2555)

8. Vogels, T. P. 2005 Signal Propagation and Logic Gating in Networks of Integrate-and-Fire Neurons. *J. Neurosci.* **11**, 615–627. (doi:10.1523/JNEUROSCI.3508-05.2005)
9. Haider, B. 2006 Neocortical Network Activity In Vivo Is Generated through a Dynamic Balance of Excitation and Inhibition. *J. Neurosci.* **26**, 4535–4545. (doi:10.1523/JNEUROSCI.5297-05.2006)
10. Kremkow, J. Aertsen, A. Kumar, A. 2010 Gating of Signal Propagation in Spiking Neural Networks by Balanced and Correlated Excitation and Inhibition. *J. Neurosci.* **30**, 15760–15768. (doi:10.1523/JNEUROSCI.3874-10.2010)
11. Stilo, S. A. & Murray, R. M. 2010 The epidemiology of schizophrenia: replacing dogma with knowledge. *Dialogues Clin. Neurosci.* **12**, 305–315.
12. Bleuler, E. 1908 Die Prognose der Dementia praecox (Schizophreniegruppe). *Allg. Zeitschrift für Psychiatr. und ihre Grenzgebiete* , 1–30. (doi:10.1017/CBO9781107415324.004)
13. Heinrichs, R. W. 2003 Historical origins of schizophrenia: Two early madmen and their illness. *J. Hist. Behav. Sci.* **39**, 349–363. (doi:10.1002/jhbs.10152)
14. Maatz, A. & Hoff, P. 2014 The birth of schizophrenia or a very modern Bleuler: a close reading of Eugen Bleuler’s ‘Die Prognose der Dementia praecox’ and a re-consideration of his contribution to psychiatry. *Hist. Psychiatry* **25**, 431–440. (doi:10.1177/0957154X14546606)
15. Crow, T. J. 1976 Positive and negative schizophrenic symptoms and the role of dopamine. *Br. J. Psychiatry* **137**, 383–386.
16. Andreasen, N. 1995 Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. *Lancet* **346**, 477–481. (doi:10.1016/s0140-6736(95)91325-4)
17. Gabbott, P. L. A. Dickie, B. G. M. Vaid, R. R. Headlam, A. J. N. Bacon, S. J. 1997 Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: Morphology and quantitative distribution. *J. Comp. Neurol.* **14**, 1–19. (doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19970127)377:4<465::AID-CNE1>3.0.CO;2-0)
18. Benes, F. M. & Berretta, S. 2001 GABAergic interneurons: Implications for

- understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* **25**, 1–27. (doi:10.1016/S0893-133X(01)00225-1)
19. Hashimoto, T. Volk, D. W. Eggen, S. M. Mirnics, K. Pierri, J. N. Sun, Z. Sampson, A. R. Lewis, D. A. 2003 Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J. Neurosci.* **23**, 6315–6326. (doi:10.2967/jnumed.108.060368)
 20. Gonzalez-Burgos, G. Hashimoto, T. Lewis, D. A. 2010 Alterations of cortical GABA neurons and network oscillations in schizophrenia. *Curr. Psychiatry Rep.* **12**, 335–344. (doi:10.1007/s11920-010-0124-8)
 21. Nakazawa, K. Zsiros, V. Jiang, Z. Nakao, K. Kolata, S. Zhang, S. Belforte, J. E. 2012 GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology* **62**, 1574–1783. (doi:10.1016/j.neuropharm.2011.01.022)
 22. Creese, I. Burt, D. R. Snyder, S. H. 1976 Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science (80-.)*. **192**, 481–483. (doi:10.1126/science.3854)
 23. Lodge, D. J. & Grace, A. A. 2007 Aberrant Hippocampal Activity Underlies the Dopamine Dysregulation in an Animal Model of Schizophrenia. *J. Neurosci.* **27**, 11424–11430. (doi:10.1523/JNEUROSCI.2847-07.2007)
 24. Behrens, M. M. & Sejnowski, T. J. 2009 Does schizophrenia arise from oxidative dysregulation of parvalbumin-interneurons in the developing cortex? *Neuropharmacology* **57**, 193–200. (doi:10.1016/j.neuropharm.2009.06.002)
 25. Bitanhirwe, B. K. Y. & Woo, T. U. W. 2011 Oxidative stress in schizophrenia: An integrated approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **35**, 878–893. (doi:10.1016/j.neubiorev.2010.10.008)
 26. Olney, J. W. Newcomer, J. W. Farber, N. B. 1999 NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* **33**, 523–33. (doi:10.1016/S0022-3956(99)00029-1)
 27. Lisman, J. E. Coyle, J. T. Green, R. W. Javitt, D. C. Benes, F. M. Heckers, S. Grace, A. A. 2008 Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci.* **31**, 234–242.

- (doi:10.1016/j.tins.2008.02.005)
28. Robison, A. J. 2014 Emerging role of CaMKII in neuropsychiatric disease. *Trends Neurosci.* **37**, 653–662. (doi:10.1016/j.tins.2014.07.001)
 29. Golgi, C. 1898 Intorno alla struttura delle cellule nervose. *Bolletino della Soc. Med. Chir. à degli hospedali Prov. di Cremona* **1**, 1–14.
 30. Spreafico, R. De Biasi, S. Vitellaro-Zuccarello, L. 1999 The Perineuronal Net: A Weapon for a Challenge. *J. Hist. Neurosci.* **36**, 11459–11468. (doi:10.1076/jhin.8.2.179.1834)
 31. Celio, M. R. Spreafico, R. De Biasi, S. Vitellaro-Zuccarello, L. 1998 Perineuronal nets: Past and present. *Trends Neurosci.* **21**, 510–5. (doi:10.1016/S0166-2236(98)01298-3)
 32. Deepa, S. S. Carulli, D. Galtrey, C. Rhodes, K. Fukuda, J. Mikami, T. Sugahara, K. Fawcett, J. W. 2006 Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: A different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **281**, 17789–17800. (doi:10.1074/jbc.M600544200)
 33. Gundelfinger, E. D. Frischknecht, R. Choquet, D. Heine, M. 2010 Converting juvenile into adult plasticity: A role for the brain's extracellular matrix. *Eur. J. Neurosci.* **31**, 2156–2165. (doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07253.x)
 34. Pizzorusso, T. Medini, P. Berardi, N. Chierzi, S. Fawcett, J. W. Maffei, L. 2002 Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* **298**, 1248–1251. (doi:10.1126/science.1072699)
 35. Nowicka, D. Soulsby, S. Skangiel-Kramska, J. Glazewski, S. 2009 Parvalbumin-containing neurons, perineuronal nets and experience-dependent plasticity in murine barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* **30**, 2053–2063. (doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06996.x)
 36. Corvetti, L. 2005 Degradation of Chondroitin Sulfate Proteoglycans Induces Sprouting of Intact Purkinje Axons in the Cerebellum of the Adult Rat. *J. Neurosci.* **25**, 7150–7158. (doi:10.1523/JNEUROSCI.0683-05.2005)
 37. Deepa, S. S. Umehara, Y. Higashiyama, S. Itoh, N. Sugahara, K. 2002 Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-

- binding growth factors: Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *J. Biol. Chem.* **277**, 43707–43716. (doi:10.1074/jbc.M207105200)
38. Fawcett, J. 2009 Molecular control of brain plasticity and repair. *Prog. Brain Res.* **175**, 501–509. (doi:10.1016/S0079-6123(09)17534-9)
 39. Frischknecht, R. Heine, M. Perrais, D. Seidenbecher, C. I. Choquet, D. Gundelfinger, E. D. 2009 Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* **12**, 897–904. (doi:10.1038/nn.2338)
 40. Pantazopoulos, H. Woo, T. U. W. Lim, M. P. Lange, N. Berretta, S. 2010 Extracellular matrix-glia abnormalities in the amygdala and entorhinal cortex of subjects diagnosed with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* **67**, 155–166. (doi:10.1001/archgenpsychiatry.2009.196)
 41. Mauney, S. A. Athanas, K. M. Pantazopoulos, H. Shaskan, N. Passeri, E. Berretta, S. Woo, T. U. W. 2013 Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **74**, 427–435. (doi:10.1016/j.biopsych.2013.05.007)
 42. Kaiser, T. Ting, J. T. Monteiro, P. Feng, G. 2016 Transgenic labeling of parvalbumin-expressing neurons with tdTomato. *Neuroscience* **321**, 236–245. (doi:10.1016/j.neuroscience.2015.08.036)
 43. Paxinos, G. & Watson, C. 1998 The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Acad. Press* **37**. (doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2)
 44. Katikireddy, K. R. & O’Sullivan, F. 2011 Immunohistochemical and immunofluorescence procedures for protein analysis. *Methods Mol. Biol.* **784**, 155–67. (doi:10.1007/978-1-61779-289-2_11)
 45. BRENDA: BRAunschweig ENzyme Database [Internet]. Braunschweig: Technische Universität Braunschweig; 1987 [actualizat 1 gener 2018; 29 maig 2018]. Disponible en: <https://www.brenda-enzymes.org/>
 46. Berretta, S. Pantazopoulos, H. Markota, M. Brown, C. Batzianouli, E. T. 2015 Losing the sugar coating: Potential impact of perineuronal net abnormalities on

- interneurons in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **167**, 18–27. (doi:10.1016/j.schres.2014.12.040)
47. Härtig, W. Brauer, K. Brückner, G. 1992 Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport* (doi:10.1097/00001756-199210000-00012)
48. Schindelin, J. *et al.* 2012 Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–82. (doi:10.1038/nmeth.2019)
49. Wu, X. Fu, Y. Knott, G. Lu, J. Di Cristo, G. Huang, Z. J. 2012 GABA Signaling Promotes Synapse Elimination and Axon Pruning in Developing Cortical Inhibitory Interneurons. *J. Neurosci.* **32**, 331–343. (doi:10.1523/JNEUROSCI.3189-11.2012)
50. Hu, H. Gan, J. Jonas, P. 2014 Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science* **345**. (doi:10.1126/science.1255263)
51. Gogolla, N. Caroni, P. Lüthi, A. Herry, C. 2009 Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science* **325**, 1258–61. (doi:10.1126/science.1174146)
52. Geissler, M. Gottschling, C. Aguado, A. Rauch, U. Wetzel, C. H. Hatt, H. Faissner, A. 2013 Primary Hippocampal Neurons, Which Lack Four Crucial Extracellular Matrix Molecules, Display Abnormalities of Synaptic Structure and Function and Severe Deficits in Perineuronal Net Formation. *J. Neurosci.* **33**, 7742–7755. (doi:10.1523/JNEUROSCI.3275-12.2013)
53. Sullivan, C. S. Gotthard, I. Wyatt, E. V. Bongu, S. Mohan, V. Weinberg, R. J. Maness, P. F. 2018 Perineuronal Net Protein Neurocan Inhibits NCAM/EphA3 Repellent Signaling in GABAergic Interneurons. *Sci. Rep.* **8**, 6143. (doi:10.1038/s41598-018-24272-8)
54. Yamaguchi, Y. 2000 Lecticans: Organizers of the brain extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 276–89. (doi:10.1007/PL00000690)
55. Wang, H. *et al.* 2008 Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth. *J. Cell Sci.* **121**, 3083–3091. (doi:10.1242/jcs.032649)
56. Maeda, N. 2010 Structural variation of chondroitin sulfate and its roles in the

- central nervous system. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* **10**, 22–31. (doi:10.2174/187152410790780136)
57. Karus, M. Samtleben, S. Busse, C. Tsai, T. Dietzel, I. D. Faissner, A. Wiese, S. 2012 Normal sulfation levels regulate spinal cord neural precursor cell proliferation and differentiation. *Neural Dev.* **7**, 20. (doi:10.1186/1749-8104-7-20)
58. Dityatev, A. Rusakov, D. A. 2011 Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21**, 353–359. (doi:10.1016/j.conb.2010.12.006)
59. Araque, A. Parpura, V. Sanzgiri, R. P. Haydon, P. G. 1999 Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* **22**, 208–215. (doi:10.1016/S0166-2236(98)01349-6)
60. Brückner, G. *et al.* 1993 Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* **8**, 183–200. (doi:10.1002/glia.440080306)
61. Härtig, W. Derouiche, A. Welt, K. Brauer, K. Grosche, J. Mäder, M. Reichenbach, A. Brückner, G. 1999 Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res.* **842**, 15–29. (doi:10.1016/S0006-8993(99)01784-9)
62. Glykys, J. *et al.* 2015 Response to Comments on “Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration”. *Science (80-.).* **345**, 1130. (doi:10.1126/science.1253146.Response)
63. Enwright, J. F. Sanapala, S. Foglio, A. Berry, R. Fish, K. N. Lewis, D. A. 2016 Reduced labeling of parvalbumin neurons and perineuronal nets in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **41**, 2206–2214. (doi:10.1038/npp.2016.24)
64. Yamada, J. Ohgomori, T. Jinno, S. 2015 Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **41**, 368–378. (doi:10.1111/ejn.12792)

65. Kinney, J. W. 2006 A Specific Role for NR2A-Containing NMDA Receptors in the Maintenance of Parvalbumin and GAD67 Immunoreactivity in Cultured Interneurons. *J. Neurosci.* **26**, 1604–1615. (doi:10.1523/JNEUROSCI.4722-05.2006)
66. Dityatev, A. Brückner, G. Dityateva, G. Grosche, J. Kleene, R. Schachner, M. 2007 Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev. Neurobiol.* **67**, 570–588. (doi:10.1002/dneu.20361)
67. McRae, P. A. Baranov, E. Sarode, S. Brooks-Kayal, A. R. Porter, B. E. 2010 Aggrecan expression, a component of the inhibitory interneuron perineuronal net, is altered following an early-life seizure. *Neurobiol. Dis.* **39**, 439–448. (doi:10.1016/j.nbd.2010.05.015)
68. Cabungcal, J. H. Steullet, P. Kraftsik, R. Cuenod, M. Do, K. Q. 2013 Early-life insults impair parvalbumin interneurons via oxidative stress: Reversal by N-acetylcysteine. *Biol. Psychiatry* **73**, 574–582. (doi:10.1016/j.biopsych.2012.09.020)
69. Carlsson, A. & Lindqvist, M. 1963 Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-Methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* **41**, 222–228. (doi:10.1111/j.1600-0773.1963.tb01730.x)
70. Carlsson, A. 1988 The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **1**, 179–186. (doi:10.1016/0893-133X(88)90012-7)
71. Seeman, P. & Lee, T. 1975 Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science (80-.).* **188**, 1217–1219. (doi:10.1126/science.1145194)
72. Lau, C. I. Wang, H. C. Hsu, J. L. Liu, M. E. 2013 Does the dopamine hypothesis explain schizophrenia? *Rev. Neurosci.* **24**, 389–400. (doi:10.1515/revneuro-2013-0011)
73. Howes, O. McCutcheon, R. Stone, J. 2015 Glutamate and dopamine in schizophrenia: An update for the 21st century. *J. Psychopharmacol.* **29**, 97–115.

(doi:10.1177/0269881114563634)

74. Javitt, D. C. 1987 Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside J. Clin. Psychiatry* **9**, 12–35. (doi:Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review)
75. Javitt, D. C. & Zukin, S. R. 1991 Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* **148**, 1301–1308. (doi:10.1176/ajp.148.10.1301)
76. Javitt, D. C. 2007 Glutamate and Schizophrenia: Phencyclidine, N-Methyl-d-Aspartate Receptors, and Dopamine-Glutamate Interactions. *Int. Rev. Neurobiol.* **78**, 69–108. (doi:10.1016/S0074-7742(06)78003-5)
77. Millan, M. J. 2005 N-Methyl-d-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: Novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacology (Berl)*. **179**, 30–53. (doi:10.1007/s00213-005-2199-1)
78. Lindsley, C. W. Shipe, W. D. Wolkenberg, S. E. Theberge, C. R. Williams, D. L. Sur, C. Kinney, G. G. 2006 Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Curr. Top. Med. Chem.* **6**, 771–785. (doi:10.2174/156802606777057599)
79. Colbran, R. J. & Brown, A. M. 2004 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 318–327. (doi:10.1016/j.conb.2004.05.008)
80. Coultrap, S. J. & Bayer, K. U. 2012 CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci.* **35**, 607–618. (doi:10.1016/j.tins.2012.05.003)
81. Yamasaki, N. *et al.* 2008 Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders. *Mol. Brain* **1**, 6. (doi:10.1186/1756-6606-1-6)