

Tesis Doctoral

Cambios en la conectividad funcional de la vía hipocampo-prefrontal luego de la adolescencia en un modelo murino de esquizofrenia

Alvarez, Rodrigo Javier

2016

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Alvarez, Rodrigo Javier. (2016). Cambios en la conectividad funcional de la vía hipocampo-prefrontal luego de la adolescencia en un modelo murino de esquizofrenia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6080_Alvarez

Cita tipo Chicago:

Alvarez, Rodrigo Javier. "Cambios en la conectividad funcional de la vía hipocampo-prefrontal luego de la adolescencia en un modelo murino de esquizofrenia". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016.

https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6080_Alvarez

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Cambios en la conectividad funcional de la vía hipocampo-prefrontal
luego de la adolescencia en un modelo murino de esquizofrenia.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Rodrigo Javier Alvarez

Director de tesis: Juan Emilio Belforte.

Consejero de Estudios: Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Grupo de Neurociencia de Sistemas, IFIBIO-Houssay, Facultad de Medicina, UBA-CONICET.

Buenos Aires, 2016.

Cambios en la conectividad funcional de la vía hipocampo-prefrontal luego de la adolescencia en un modelo murino de esquizofrenia.

La teoría de la hipofunción glutamatérgica postula que un déficit en los receptores NMDA (NMDAR) en interneuronas corticales es central para la patofisiología de la esquizofrenia. En un trabajo previo de nuestro grupo, la ablación restringida del NMDAR a interneuronas parvalbúmina positivas del sistema córtico-límbico (KO) durante el desarrollo postnatal temprano resulta en fenotipos compatibles con esquizofrenia en la adultez. Para adentrarnos en la patofisiología subyacente analizamos el impacto de la mutación y el desarrollo sobre diferentes procesos fisiológicos en un área cortical involucrada en la esquizofrenia. Para ello colocamos tetrodos en la corteza prefrontal media (mPFC) de ratones anestesiados controles y KO, juveniles y adultos. Encontramos un incremento significativo en la frecuencia de disparo espontánea y una sincronización alterada con ritmos locales y distales en las neuronas de ratones KO juveniles y adultos. Dado que los ratones KO juveniles carecen del NMDAR pero no muestran el fenotipo compatible con esquizofrenia, los cambios mencionados anteriormente no pueden explicar las anormalidades comportamentales de los adultos. El podado sináptico normal de las aferencias locales y distales de la mPFC ocurre durante la adolescencia. Analizamos la conectividad funcional de la vía hipocampo ventral-corteza prefrontal media (vHP-mPFC) antes y después de la adolescencia. Los ratones adultos KO presentan una amplitud disminuida de la respuesta evocada en la mPFC. También medimos el estado de plasticidad del circuito y encontramos que los adultos KO y no los juveniles son más susceptibles de sufrir depotenciación a largo plazo (LTD). Proponemos que la ablación temprana del NMDAR en interneuronas lleva a un circuito cortical sobreexcitado e incordiando que propicia la depotenciación durante la adolescencia. Esto resulta en una conectividad funcional disminuida en adultos y podría subyacer el fenotipo compatible con esquizofrenia.

Palabras claves: Esquizofrenia, interneuronas, receptor tipo NMDA, ratones genéticamente modificados, electrofisiología.

Functional connectivity changes in the hippocampus-prefrontal pathway after adolescence in a mouse model of schizophrenia.

The glutamatergic hypofunction theory postulates that a dysfunction in NMDA receptors (NMDAR) in cortical interneurons is central in the pathophysiology of schizophrenia. In our previous work, restricted ablation of NMDAR in corticolimbic parvalbumin interneurons (KO) during early postnatal development resulted in schizophrenia-like phenotypes in adulthood. To elucidate the underlying pathophysiology, we analyzed the impact of the mutation and the development over different physiological processes in a cortical area involved in schizophrenia. To achieve that, we placed tetrodes in the medial prefrontal cortex (mPFC) in anesthetized control and mutant, juvenile and adult mice. We found a significant increase in spontaneous firing rate and altered entrainment to cortical local and distant rhythms in mutant juvenile and adult mice neurons. Since juvenile mutant mice lack NMDAR but show no schizophrenia-like phenotype, the above mentioned changes could not explain the behavioral abnormalities of adults. Normal synaptic pruning of local and distant inputs to mPFC occurs during adolescence. We analyzed functional connectivity of the ventral hippocampus- medial prefrontal cortex (vHP-mPFC) pathway before and after adolescence. Mutant adult mice present diminished amplitude of the evoked response in mPFC. We also measured the status of circuit plasticity and found that adult but not juvenile mutant mice are more susceptible to undergo long term depression (LTD). We propose that early ablation of NMDAR in interneurons leads to an overexcited/uncoordinated cortical circuit that propitiates LTD during adolescence. This results in a decreased functional connectivity in adults that may underlie the schizophrenia-like phenotype.

Keywords: Schizophrenia, interneurons, NMDA receptor, transgenic mice, electrophysiology.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	7
Esquizofrenia.....	7
EPIDEMIOLOGÍA Y RELEVANCIA.....	7
ETIOLOGIA.....	10
SINTOMATOLOGÍA.....	11
CURSO TEMPORAL.....	15
FISIOPATOLOGÍA.....	17
Clasificación de las interneuronas.....	21
CLASIFICACIÓN ANATÓMICA.....	23
CLASIFICACIÓN MOLECULAR.....	24
CLASIFICACIÓN FISIOLÓGICA.....	24
Funciones de las interneuronas.....	25
Ritmos theta y gamma.....	30
RITMO THETA.....	30
RITMO GAMMA.....	32
Cambios normales durante el desarrollo de la PFC.....	33
DESARROLLO DEL CIRCUITO GLUTAMATÉRGICO DE LA PFC.....	33
DESARROLLO DEL CIRCUITO GABAÉRGICO EN LA PFC.....	34
Rol de GABA en el desarrollo.....	36
Teorías sobre la fisiopatología de la esquizofrenia.....	38
Terapéutica y modelos animales.....	41
Nuestro modelo.....	42
OBJETIVO.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
Modelo experimental y genotipado.....	47
Experimentos electrofisiológicos.....	49
ANESTESIA Y CIRUGÍA.....	49
EXPERIMENTOS UTILIZANDO TETRODOS.....	51
EXPERIMENTOS MIDIENDO CONECTIVIDAD FUNCIONAL Y PLASTICIDAD DE LA VÍA vHP-mPFC.....	58
Estadística.....	60
Histología <i>post-mórtem</i> para comprobar la posición de los electrodos.....	61
RESULTADOS.....	62

La frecuencia media de disparo se encuentra aumentada en los animales KO tanto juveniles como adultos.....	67
Las neuronas piramidales se encuentran menos sincronizadas con ritmos generados local y distalmente en los animales KO independientemente de la edad.....	71
Sólo los ratones KO adultos muestran una conectividad funcional vHP-mPFC disminuida.....	76
El LTD se encuentra exacerbado en ratones KO adultos pero no en juveniles.....	80
CONCLUSIÓN.....	83
La frecuencia media de disparo de las neuronas de la mPFC se encuentra aumentada en los animales KO tanto juveniles como adultos.....	85
Las neuronas piramidales se encuentran menos sincronizadas con ritmos generados local y distalmente en los animales KO independientemente de la edad.....	88
Sólo los ratones KO adultos muestran una disminución en la conectividad funcional de la vía vHP-mPFC.....	90
El LTD se encuentra exacerbado en ratones KO adultos pero no en los juveniles.....	91
RESUMEN.....	96
BIBLIOGRAFÍA.....	97
ANEXO.....	111

Abreviaturas en orden alfabético.

ANOVA: análisis de la varianza.

BS: interneuronas de disparo en salva, *burst spiking*.

CB: calbindina.

CCK: colecistoquinina.

CR: calretinina.

CxM: Corteza Motora.

ECoG: electrocorticograma.

FFT: transformada rápida de Fourier, *fast Fourier transform*.

FS: interneuronas de disparo rápido, *fast spiking*.

GAD67: glutamato descarboxilasa 67.

KO: *knock-out* condicional de la subunidad NR1 del NMDAR.

LFP: potencial de campo local, *local field potential*.

LFS: estimulación de baja frecuencia, *low frequency stimulation*.

LS: interneuronas de disparo lento, *low spiking*.

LTD: depotenciación de largo término, *long term depotenciation*.

mPFC: Corteza Prefrontal media.

NMDAR: receptor glutamatérgico de tipo NMDA.

NPY: neuropéptido Y.

PCP: fenciclidina.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, *polymerase chain reaction*.

PFC: Corteza Prefrontal.

PV: parvalbúmina.

PV+: parvalbúmina positivo.

SEM: error estándar de la media, *standard error of the mean*.

SOM: somatostatina.

STD: depotenciación de corto término, *short term depotenciation*.

vHP: hipocampo ventral.

VIP: péptido intestinal vasoactivo.

INTRODUCCIÓN

Esquizofrenia.

EPIDEMIOLOGÍA Y RELEVANCIA.

La esquizofrenia es una enfermedad neuropsiquiátrica que tiene consecuencias devastadoras sobre el individuo afectado. Su prevalencia (proporción de la población que padece la condición) es de alrededor del 1% (Eaton 1985), mientras que la incidencia (número de nuevos diagnósticos por unidad de tiempo) es de alrededor de 0.2 cada 1000 por año, el doble de lo observado para enfermedades tales como Alzheimer y seis veces más prevalente que la diabetes insulino-dependiente (Jablensky 1997), diagnosticándose alrededor de 8000 casos nuevos en Argentina por año (Gattaz & Häfner 1999).

De los individuos diagnosticados con la enfermedad, más de la mitad padece problemas psiquiátricos intermitentes de largo término, y alrededor de un 20% presenta síntomas crónicos (Barbato 1998). La expectativa de vida de las personas afectadas se encuentra reducida de 10 a 20 años (Chesney et al. 2014) y alrededor de un 10% termina eventualmente cometiendo suicidio. La mayoría de ellos experimentan discapacidad a lo largo de sus vidas con fuertes implicancias para la sociedad; incluyendo problemas como criminalidad, violencia, y falencias concernientes a la sexualidad y matrimonio. Como resultado, la esquizofrenia conlleva una carga emocional sustancial para las familias de los afectados. El desempleo es de 80 a 90% (Marwaha & Johnson 2004). Además, la enfermedad provoca enormes costos económicos a nivel mundial en términos de gastos médicos y pérdida de productividad: se estima un costo de

60 millones de dólares anuales únicamente en los Estados Unidos (Wu et al. 2005) y de £11.8 millones por año en Inglaterra (Commission 2012).

El curso sintomático de la esquizofrenia es variado. En un estudio clásico llevado a cabo por Ciompi (Ciompi 1980), se reporta que la mitad de los pacientes tuvieron un curso ondulante, con remisiones parciales o totales de los síntomas seguidas de recurrencias en un patrón impredecible. Alrededor de un tercio tuvo un curso crónico sin que la terapéutica lograra resultados favorables. Solo una pequeña minoría mostró un patrón estable de recuperación con buenos resultados. La tasa de éxito de los tratamientos contra la esquizofrenia es variable y depende significativamente de las drogas utilizadas (Suarez & Haro 2008), pero es baja en todos los trabajos.

El riesgo de desarrollar esquizofrenia es directamente proporcional al grado de relación genética con un individuo afectado (Gottesman 1991). Sin embargo, el grado de riesgo conferido por cada gen en particular es pequeño, y, para la mayoría de los genes, las bases biológicas de este riesgo incrementado no están claras. Estudios de heredabilidad realizados en gemelos y estudios de adopción marcan una clara relación entre el grado de concordancia de la enfermedad y el porcentaje de genes compartidos con un individuo con esquizofrenia (Petronis et al. 1999). El grado de coocurrencia de la esquizofrenia entre individuos con la misma carga genética (gemelos monocigóticos) criados en entornos distintos es del 50% (Gottesman 1991; Rapp & Bachevalier 2003). Esto indica que la carga genética es un componente importante en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, estos estudios también demuestran que la heredabilidad no puede ser explicada por herencia mendeliana simple, y abogan por un importante componente ambiental para el desarrollo de la enfermedad.

A pesar de los avances realizados en el campo, la causa de la esquizofrenia es aún desconocida. Las teorías actuales abogan por causas multifactoriales que involucran la interacción de un contexto genético y factores ambientales que afectan la predisposición. Dado que ambos factores inciden sustancialmente en el desarrollo de la enfermedad, se cree que la etiología de la esquizofrenia requiere una interacción entre susceptibilidad génica y factores de riesgo ambientales que inciden sobre procesos del neurodesarrollo y que llevan a la

BOX 1. Corteza prefrontal media.

La corteza prefrontal media (mPFC) en ratones es considerada como análogo funcional a la corteza dorsolateral prefrontal de los humanos, que es una región de la corteza prefrontal (PFC). Numerosos roles han sido atribuidos a esta estructura, entre ellos se destaca su rol en toma de decisiones, incluyendo detección de errores (Holroyd et al. 2002), control ejecutivo (POSNER et al. 2007) y aprendizaje dependiente de recompensa (Rushworth et al. 2011) así como también su rol en la memoria, tanto en lo concerniente a evocación de memorias remotas (Frankland et al. 2004; Takashima et al. 2006) como recientes (Corcoran & Quirk 2007). Además, la mPFC cumple una función clave en la memoria de trabajo (Goldman-Rakic 1987; Alexander & Goldman 1978). Esta área subyace muchas de las funciones que se encuentran alteradas en los pacientes de esquizofrenia y, además, presenta alteraciones tanto estructurales como funcionales en las personas que padecen la enfermedad. Por esta razón, la mPFC resulta de especial interés en este trabajo.

La mPFC recibe entradas de numerosas estructuras cerebrales incluyendo corteza frontal, amígdala, tálamo, hipotálamo, áreas olfatorias, sistemas neuromodulatorios y la formación hipocampal (Euston et al. 2012). Dentro de esta última, el hipocampo ventral es de especial interés ya que, junto con el subículum, es el único que proyecta monosináptica y unidireccionalmente a la mPFC, además de ser el generador del ritmo theta registrado en la mPFC (ver "ritmos theta y gamma").

La vía hipocampo ventral - corteza prefrontal media (vHP-mPFC) está sujeta a podado sináptico a lo largo de la adolescencia y es susceptible de sufrir cambios plásticos. Si bien hay abundante literatura respecto a la inducción de potenciación de largo término en esta vía, que se sabe dependiente de NMDAR y glutamato (Jay et al. 1995) poco se sabe sobre la inducción de depotenciación de largo término en la misma, habiéndose usado en literatura diversos protocolos que no siempre lograron una depotenciación exitosa.

posterior aparición de la sintomatología propia de la enfermedad.

ETIOLOGIA.

Muchos genes han sido implicados en el desarrollo de la esquizofrenia a lo largo de la historia, la gran mayoría de ellos impactan sobre las bases moleculares de la sinapsis. Esto incluye efectos en receptores (genes GRM3, CHRNA7, G72), transducción de la señal (RGS4) y regulación de la plasticidad y sinaptogénesis (dysbindina, DISC1, calcineurina, (Harrison & Weinberger 2005)).

Las sinapsis glutamatérgicas parecen estar particularmente afectadas. Notablemente, la señalización mediante el receptor glutamatérgico de tipo NMDA (NMDAR) se encuentra influenciada de alguna manera por buena parte de los genes propuestos (Harrison & Weinberger 2005). Además del componente genético subyacente a la enfermedad, se han identificado varios componentes ambientales que actúan a lo largo del desarrollo como factores de riesgo para contraer la enfermedad. Entre los más destacados se encuentran complicaciones durante el embarazo (Cannon et al. 2002), la edad de los padres en el momento de la gestación (Zammit et al. 2003), infecciones perinatales (Weinberger 1987), enfermedades autoinmunes (Ganguli et al. 1994), uso de cannabis (Hall & Degenhardt 2000), residencia en zonas urbanas y el estrés (Sampson 2014), entre varios otros. Se cree que el estrés contribuye a la patogénesis de una variedad de enfermedades psiquiátricas (Belujon & Grace 2011; Roozendaal et al. 2009; Touma 2011). En particular, la evidencia sugiere que eventos de estrés en la vida temprana son un factor importante en el desarrollo de la esquizofrenia (Agid et al. 2000; Meyer-Lindenberg & Tost 2012). Los eventos estresantes pueden precipitar o exacerbar los síntomas psicóticos de la enfermedad y el estrés psicosocial aumenta el riesgo de desarrollarla (Lim et al. 2009). Otros trabajos han demostrado consistentemente asociaciones dosis-respuesta entre trauma durante el desarrollo y psicosis, a lo largo de un gran rango de diseños experimentales (Arseneault et al.

2011; Schreier et al. 2009; Morgan & Fisher 2007). En favor de estos resultados, se sabe que la Corteza Prefrontal (PFC, por sus siglas en inglés *Prefrontal Cortex*), un área particularmente afectada en los individuos con esquizofrenia (ver BOX1), es de las regiones más susceptible a los efectos detrimentales del estrés, el cual puede inducir disminuciones en las funciones cognitivas mediadas por la PFC y cambios estructurales en las dendritas de las neuronas de esta área (Arnsten 2009).

SINTOMATOLOGÍA.

La esquizofrenia se caracteriza por una multiplicidad de síntomas que involucran casi todos los dominios cerebrales (percepción, actividad motora, lenguaje, emoción, razonamiento, etc.). Estos varían entre pacientes, creando un perfil sintomatológico muy amplio.

La caracterización de la esquizofrenia se remonta a los comienzos del siglo XX; Emil Kraepelin, un psiquiatra Alemán, distinguió la psicosis manía-depresiva, de otras enfermedades psicóticas crónicas (Kraepelin 1919, tomado de (Zivanovic & Nedic 2012)). Inicialmente, Kraepelin utilizó el término demencia precoz para referirse a la mayoría de las enfermedades mentales crónicas. Observó que un patrón común en estos pacientes era la aparición de alucinaciones concomitantes o delirios, sin deterioro de la función sensorial, conciencia o de la memoria.

El término esquizofrenia fue utilizado por primera vez por Eugen Bleuler, un psiquiatra Suizo, que observó en los pacientes una disociación entre los componentes cognitivos y afectivos (Bleuler 1950, tomado de (Ashok et al. 2012)). Bleuler difería de Kraepelin, en la forma del desarrollo de la esquizofrenia, postulando que ésta no estaba típicamente caracterizada por un inicio con demencia precoz y culminando en demencia terminal. Bleuler desarrolló la noción de

que los pacientes con esquizofrenia poseían síntomas primarios y secundarios. Definió los síntomas primarios mediante la regla de las "4 A": profunda ambivalencia, pérdida de la asociación, pensamiento autista y perturbaciones afectivas (del inglés, *Ambivalence, Associative disturbance, Autistic thinking and Affective incongruity*) y describió a los pacientes como seres que vivían en un mundo interno e irreal, separados de la interacción social. Los síntomas secundarios incluían alucinaciones y delirios.

Posteriormente, los síntomas fueron divididos en dos categorías: los síntomas positivos reflejan un exceso o distorsión de las funciones normales, mientras que los síntomas negativos reflejan una disminución o pérdida de las funciones normales (Hirsch & Weinberger 2003). Además de estas dos categorías, existen también marcados síntomas cognitivos que inicialmente se pensaba aparecían solo en individuos ancianos, pero que posteriormente fueron descriptos en pacientes más jóvenes.

Actualmente el diagnóstico de la esquizofrenia según el manual de psiquiatría DSM-V (American Psychiatric Association 2013) se basa tanto en los síntomas negativos y positivos como en los cognitivos. Estos se describirán brevemente a continuación:

- **Síntomas positivos:**

Los pacientes con síntomas positivos suelen perder el contacto con algunos aspectos de la realidad. Estos síntomas pueden ser estables en el tiempo o aparecer esporádicamente y pueden tener distintos grados de severidad. Los síntomas positivos incluyen:

Alucinaciones: Son experiencias sensoriales que ocurren en ausencia de estímulo. Pueden ocurrir en cualquiera de los cinco sentidos, siendo más comunes las alucinaciones auditivas.

Muchos pacientes escuchan voces. Las voces pueden hablarle al paciente sobre su comportamiento, obligarle a hacer cosas o advertirle de peligros.

Delirios: Son falsas creencias que no son consistentes con la cultura del paciente. Estas persisten aún cuando hay evidencia de que no son verdaderas o lógicas. Los delirios pueden ser de referencia (por ejemplo, creer que la televisión les está mandando mensajes especiales) o pueden ser delirios persecutorios (como creer que alguien está tratando de dañarlos).

Desórdenes del movimiento: se trata de un aumento desmedido de la motricidad con movimientos, rápidos poco coordinados, sin un objetivo preciso en el marco de la llamada "agitación psicomotora". Un paciente puede repetir ciertos patrones motores una y otra vez. En el otro extremo, el paciente puede volverse catatónico, aunque esta condición es más común en pacientes que no reciben tratamiento.

- **Síntomas negativos:**

Son más difíciles de reconocer y pueden ser confundidos con ciertos síntomas del trastorno bipolar. Los pacientes con estos síntomas pueden necesitar ayuda en sus tareas diarias y pueden descuidar la higiene personal. Los síntomas incluyen:

Aplanamiento afectivo (*flat affect*): Expresión reducida de las emociones vía expresión facial o tono de voz.

Anhedonia: Búsqueda reducida de sensaciones de placer en la vida cotidiana.

Dificultad comenzando o sosteniendo actividades.

Disminución del habla.

Trastornos en la vida social.

- **Síntomas cognitivos:**

Afectan a alrededor del 75% de los pacientes con esquizofrenia. Las funciones principalmente afectadas incluyen la atención, memoria e inteligencia y están directamente asociados con déficits sociales y funcionales. Al igual que los síntomas negativos, al inicio la mayoría de los síntomas cognitivos son sutiles y usualmente solo son detectados cuando se realizan baterías de análisis cognitivo. Los síntomas cognitivos dificultan la obtención de un trabajo estable para ganar sustento. Además conllevan angustia emocional como resultado del bajo desempeño y/o la confusión. Incluyen:

Anosognosia: Pérdida de la conciencia propia de la persona. En el caso de la esquizofrenia, el afectado puede incluso no saber que presenta la enfermedad.

Desórdenes del pensamiento: Son maneras de pensar inusuales y disfuncionales. Una forma de este desorden es el llamado "pensamiento desordenado", que se define cuando una persona tiene problemas organizando sus pensamientos o conectándolos lógicamente. Otra forma es el "bloqueo de pensamiento", cuando la persona interrumpe abruptamente su discurso en el medio de un pensamiento. Además, el paciente también puede inventar palabras sin sentido o neologismos.

Déficits en el funcionamiento ejecutivo: Las personas con esquizofrenia tienen problemas entendiendo, procesando y utilizando información para tomar decisiones lógicas. El funcionamiento ejecutivo ayuda a conectar experiencias pasadas con situaciones presentes. Está involucrado en planeamiento, organización, pensamiento estratégico, atención y memoria. Un componente importante del funcionamiento ejecutivo que se encuentra alterado en esquizofrenia es la flexibilidad cognitiva. Los pacientes que aprendieron una determinada

contingencia presentan problemas para adaptarse a un cambio en las reglas que subyacen a dicha contingencia.

Problemas de atención: Problemas para concentrarse que dificultan la realización de tareas.

Déficits en memoria de trabajo: La memoria de trabajo es utilizada para almacenar información por un corto período de tiempo. Las personas con esquizofrenia tienen problemas utilizando información inmediatamente luego de adquirirla. Esto disminuye notablemente el desempeño en tareas diarias y en el ámbito laboral.

CURSO TEMPORAL.

La edad de comienzo de la enfermedad varía ligeramente entre hombres y mujeres, y los hombres tienden a desarrollarla a una edad más temprana (Munk-Jørgensen 1987). En el año 2010, la proporción de ingresos hospitalarios en Argentina por esquizofrenia, trastornos esquizotípicos y trastornos delirantes en hombres alcanzó un pico en el grupo de edad de 20 a 24 años (8,5%), mientras que en mujeres en el de 30 a 44 años (5,9%).

Sin embargo, el pico de incidencia para ambos sexos es durante la adolescencia, en el rango de 15 a 24 años (Figura I1). La adolescencia es un periodo crítico en el desarrollo del sistema nervioso central, ya que conlleva numerosos y dramáticos cambios a nivel de conectividad sináptica (ver "Cambios normales durante el desarrollo de la mPFC").

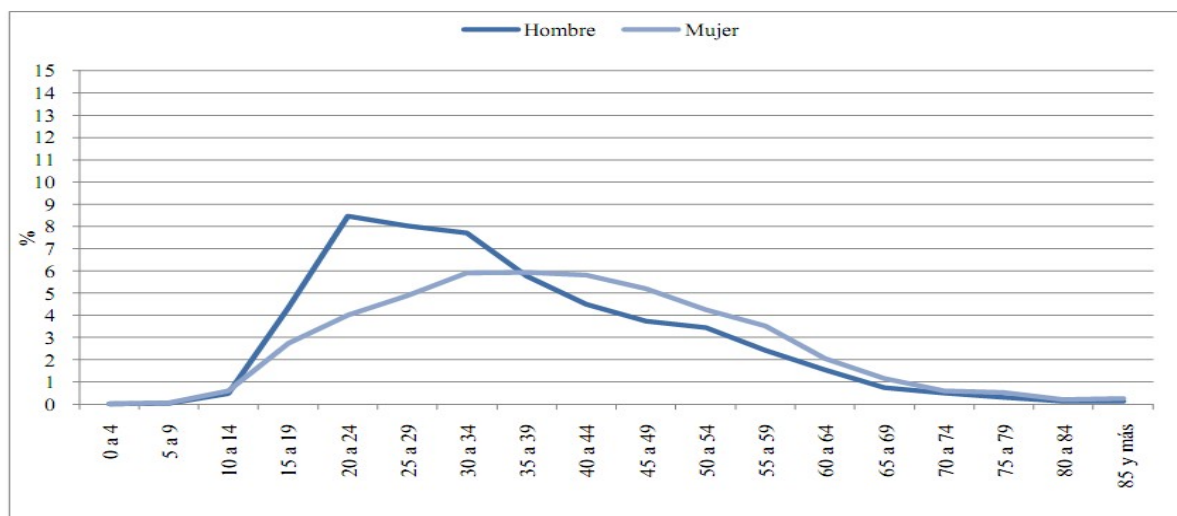


Figura II. Proporción de egresos hospitalarios por esquizofrenia en Argentina, trastornos esquizotípicos y trastornos delirantes según grupo de edad y sexo. Total país. Año 2010 (Dirección Nacional de Salud Mental y Adicciones, Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación). (N=9900)

La evidencia sugiere que los hombres tienen un riesgo un 30% a 40% mayor de desarrollar la enfermedad a lo largo de sus vidas (Selten 2014). Alrededor de un 50% de los pacientes tienen un comienzo agudo marcado por un brote psicótico, y el 50% restante posee un largo periodo prodrómico. En el segundo grupo, los síntomas negativos tienden a aparecer alrededor de 5 años antes del brote psicótico inicial, mientras que los síntomas positivos aparecen mucho más cercanos a la primera hospitalización.

La manifestación de la esquizofrenia durante un periodo particular de la vida, la adolescencia, así como también la marcada incidencia de agresiones ambientales a lo largo del desarrollo en individuos que posteriormente desarrollan la enfermedad llevaron a considerar a la esquizofrenia como una enfermedad del neurodesarrollo. Se han realizado numerosos estudios en búsqueda de marcadores que permitan identificar a las personas que son candidatos a desarrollar la enfermedad con el fin de prevenirla antes de que se manifieste. Los niños con alto riesgo de contraer esquizofrenia difieren de sus pares sanos, en la infancia temprana, en una

cantidad de marcadores que no parecen tener un nexo causal común (Jones & Tarrant 1999), como la edad a la que alcanzan determinadas capacidades, niveles de funcionamiento cognitivo, logros educacionales, desarrollo neurológico y motor y competencia social (Isohanni et al. 2001; Cannon et al. 2002).

Al indagar sobre la infancia de los individuos que desarrollaron esquizofrenia, se observa que estos presentaban ciertos comportamientos levemente atípicos (Larson et al. 2010). Sin embargo, debido a que no todos los individuos que presentan comportamientos atípicos durante la infancia terminan desarrollando esquizofrenia, éstos no pueden utilizarse como marcadores útiles para predecir la ocurrencia futura de la enfermedad. El descubrimiento de marcadores fisiológicos en lugar de comportamentales podría ser clave para predecir el desarrollo de la enfermedad.

Al igual que la etiología, la fisiopatología de la esquizofrenia continúa siendo tema de controversia. Sin embargo, existen alteraciones en determinadas estructuras cerebrales, en patrones de conectividad y en la neuroquímica cerebral que se observan característicamente.

FISIOPATOLOGÍA.

Alteraciones estructurales.

El ensanchamiento de los ventrículos cerebrales permanece como uno de los hallazgos más importantes en los estudios de resonancia magnética nuclear. Un meta-análisis realizado sobre 55 estudios examinando el tamaño de los ventrículos en pacientes con esquizofrenia, arrojó que el 80 por ciento de los trabajos presentaban un aumento del volumen ventricular en los

pacientes (Shenton et al. 2001). Sin embargo, también se encontraron alteraciones en diversas estructuras cerebrales:

PFC: 60% de 50 estudios publicados mostraron déficits en la cantidad de materia gris en esta estructura (Shenton et al. 2001). Se observó también un incremento en la densidad neuronal que responde únicamente a una disminución en el volumen de la PFC, ya que no se observaron diferencias en el número de neuronas (Pakkenberg 1993; Selemon et al. 1998; Thune et al. 2001). La reducción en el volumen cortical podría deberse en parte a una disminución en el tamaño de los somas de las neuronas piramidales de los individuos con esquizofrenia (Rajkowska et al. 1998; Pierri et al. 2001). Consecuentemente con la disminución en el tamaño de los somas, se encontraron disminuciones en el largo de las dendritas y el tamaño del neuropilo en pacientes (Bertolino et al. 2000; Deicken et al. 2000).

Tálamo: El tálamo (particularmente en núcleo mediodorsal) también muestra reducciones en su volumen en individuos con esquizofrenia (Konick & Friedman 2001). El número de neuronas también se encuentra reducido en esta área (Pakkenberg 1990; Pakkenberg 1992; Byne et al. 2002). Sin embargo, los estudios que evaluaron el tamaño de los somas en estas áreas no han arrojado resultados concluyentes.

Complejo amígdala-hipocampal: Se encontraron disminuciones del 4% en el volumen hipocampal (Nelson et al. 2015) y del 6% para el volumen de la amígdala (Woodruff et al. 2000). La mayoría de los estudios no muestran cambios en la densidad neuronal en estas áreas. El tamaño neuronal en hipocampo se encuentra disminuido en la mayor parte de los estudios (Weinberger 1999). También se observaron descensos en el tamaño del neuropilo en estas estructuras (Rosoklija et al. 2000).

A pesar de que las alteraciones anatómicas fueron muy estudiadas en primera instancia y se han realizado caracterizaciones detalladas de las mismas, éstas no se han encontrado consistentemente en todos los estudios realizados con tejido post-mortem. De hecho, muchos de los estudios han mostrado resultados contradictorios. Además, estas alteraciones no se encuentran en todos los pacientes que desarrollaron la enfermedad. Finalmente, las bases que subyacen las alteraciones no han sido dilucidadas por lo que podrían ser consecuencia del padecimiento de la enfermedad a lo largo del tiempo y no la causa de la misma. Esto hace que las alteraciones anatómicas en los cerebros de los pacientes no puedan ser utilizadas como criterio para diagnosticar la enfermedad y han propulsado la búsqueda de otros marcadores que hagan posible el diagnóstico.

Alteraciones en la conectividad.

El análisis mediante neuroimágenes de la actividad neuronal ha sido utilizado para identificar anomalías en los patrones de activación dependientes de tareas en diferentes áreas del cerebro (McGuire et al. 2008). Mientras que estudios iniciales mostraron hipoactividad en la PFC de pacientes con esquizofrenia (Weinberger et al. 1988; Ingvar & Franzén 1974), los cambios de actividad observados han sido variables en los estudios subsiguientes, con algunos de ellos reportando hiperactivación de la PFC en los pacientes esquizofrénicos comparados con sujetos control sanos (Manoach 2003). Las discrepancias podrían deberse a que los estudios en humanos son realizados durante la ejecución de una determinada tarea que involucra la PFC y los resultados se expresan en forma de diferencial entre el estado de activación previo y el estado de activación durante la tarea. Un estado hiperactivo basal de la PFC podría imponer un

techo a la capacidad de reclutar neuronas durante la realización de la tarea, generando que el diferencial medido sea menor, y dado como falso resultado la hipoactividad de la PFC medida en algunos trabajos.

La conectividad funcional se mide en humanos como la sincronización de la actividad neuronal regional entre dos áreas del cerebro. Refleja la magnitud de los cambios compartidos en la actividad entre las regiones. Numerosos estudios en humanos han provisto evidencia de conectividad anormal entre distintas áreas en pacientes con esquizofrenia, entre ellas podemos mencionar desconexión en el circuito tálamo-cortical (Welsh et al. 2010), en el circuito cortico-tálamo-cerebelar (Schlösser et al. 2003) y en el circuito córtico-cortical (Crossley et al. 2009). El estado de conectividad de la vía hipocampo-PFC en pacientes con esquizofrenia es de especial interés para este trabajo. Zhou y colaboradores utilizaron dos técnicas distintas para medir la conectividad hipocampal en estado de reposo y encontraron conectividad funcional disminuida con la corteza cingulada y la PFC, entre otras áreas (Zhou et al. 2008). Otros grupos observaron la misma disminución en pacientes realizando una tarea dependiente de memoria de trabajo (Wolf et al. 2009). Sin embargo aún existen algunas controversias al respecto (Sigurdsson & Duvarci 2015).

Alteraciones neurobioquímicas.

Otra alteración observada consistentemente por diferentes laboratorios mediante estudios neurobioquímicos post-mortem de cerebros de pacientes esquizofrénicos es la reducción en los niveles, tanto del mRNA como de la proteína, de la enzima limitante para la síntesis de GABA (glutamato descarboxilasa 67, GAD67) en corteza e hipocampo (Akbarian & Huang 2006; Benes

& Berretta 2001; Lewis et al. 2012). Además, se observaron reducciones en los niveles de parvalbúmina (PV) en interneuronas parvalbúmina positivas (PV+) en la corteza de pacientes con esquizofrenia. Ambas observaciones vinculan directamente a las interneuronas PV+ con la enfermedad. Diversos estudios en modelos animales han contribuido a fortalecer y profundizar la idea de que alteraciones puntuales en la neurotransmisión o maduración postnatal de las PV+ puede resultar en cuadros compatibles con la esquizofrenia (revisado en Nakazawa et al., 2012). Sin embargo, queda aún mucho por entender respecto al rol de estas interneuronas en relación a las enfermedades psiquiátricas. Por ejemplo, la disminución en los niveles de GAD67 en las interneuronas PV+ no es exclusiva de la esquizofrenia ya que también ha sido reportada en el trastorno bipolar (Todtenkopf et al. 2005), patología con la que comparte sintomatología. El esclarecimiento de cuáles de las funciones de las interneuronas corticales se encuentran alteradas en la esquizofrenia se ha visto enlentecido por la extrema dificultad en establecer parámetros inequívocos que permitan clasificar los diferentes subtipos de interneuronas para su estudio.

Clasificación de las interneuronas.

El problema de la clasificación de las neuronas ha sido tópico de debate desde los tiempos en que Ramón y Cajal las describiera por primera vez. A pesar de los numerosos estudios realizados posteriormente, aún carecemos de un catálogo de clasificación de interneuronas que sea aceptado por toda la comunidad.

En el caso de las interneuronas GABAérgicas corticales, nombres comúnmente utilizados, como las células doble bouquet, Martinotti o células neurogliaformes carecen de una definición

consensuada. En estos casos, el mismo nombre suele ser asignado a neuronas de morfología variable por diferentes autores, y varios términos son adoptados inconsistentemente en diferentes laboratorios para clasificar al mismo tipo celular. Esto dificulta notablemente el intercambio de información entre los laboratorios.

La clasificación de los diferentes subtipos de interneuronas se realizó inicialmente desde el punto de vista histoquímico basándose en marcadores celulares como neuromoduladores (neuropéptido Y -NPY-, péptido intestinal vasoactivo -VIP-, somatostatina -SOM-, colecistoquinina -CCK-, etc.) y proteínas reguladoras del calcio intracelular (PV, calbindina -CB-, calretinina -CR-). Estos estudios mostraron que la mayoría de las neuronas SOM+, CR+ y PV+ son GABAérgicas, siendo estas últimas exclusivamente GABAérgicas. Además las interneuronas PV+, que abarcan entre el 30% y el 50% del total de interneuronas GABAérgicas de la corteza, constituyen un grupo aislado que no muestra solapamiento con los otros tipos (Gonchar & Burkhalter 1997; Kubota et al. 1994).

Esto llevó a una primera subdivisión de las interneuronas en tres grandes grupos: aquellas que expresaban SOM, CR o PV. Por otro lado, también se utilizaron parámetros medidos electrofisiológicamente como criterio para clasificar interneuronas, dando origen a los grupos de disparo rápido (en inglés *fast spiking*, FS), de disparo lento (en inglés *low spiking*, LS) y de disparo en salvas (en inglés *burst spiking*, BS) (Kawaguchi & Kubota 1997). Estudios más recientes, han llegado a definir 10 subtipos electrofisiológicos, demostrando que existen superposiciones en la clasificación histoquímica anterior, especialmente entre interneuronas CR y SOM positivas (Butt et al. 2005), y han destacado la importancia del componente temporal del desarrollo de las interneuronas como marcador de sus características fisiológicas (Miyoshi et al.

2007). Además, marcadores inmunohistológicos adicionales han desencadenado nuevos subgrupos y la combinación de dos o más de ellos ha llevado a la aparición de numerosas subpoblaciones nuevas (Gonchar 2008).

Diferentes grupos han intentado establecer una clasificación definitiva combinando varios criterios, incluyendo origen embriológico, morfológicos, inmunohistoquímicos y electrofisiológicos (Gelman & Marín 2010; Gupta 2000). Recientemente se ha alcanzado algún grado de consenso respecto a los subtipos existentes. La propuesta surgió de una reunión en la ciudad natal de Ramon y Cajal, Petilla de Aragón, y está basada en el trabajo colectivo de varios laboratorios.

La terminología Petilla (Ascoli et al. 2008), evaluó los criterios más eficientes para describir las interneuronas GABAérgicas corticales y los organizó en propiedades morfológicas, fisiológicas y moleculares. A pesar de que la identidad de una interneurona está caracterizada por todas estas propiedades, una típica identificación experimental está limitada a un subgrupo de estas propiedades. Consecuentemente, en base a la información disponible, las neuronas serían clasificadas usando uno o más de los grupos de criterios que serán resumidos a continuación:

CLASIFICACIÓN ANATÓMICA.

Las interneuronas se dividieron de acuerdo al lugar en el que sinaptan con otras neuronas. Estos lugares incluyen interneuronas que tienen como blanco el segmento inicial del axón (axo-axónicas o células en candelabro), la región perisomática (células en canasto) y las dendritas (axo-dendríticas). A su vez, estas categorías fueron subdivididas de acuerdo a la orientación y morfología de su axón.

CLASIFICACIÓN MOLECULAR.

Divide a las interneuronas en función de la expresión de marcadores moleculares específicos: las que expresan PV, incluyendo las células en candelabro y en canasto; las que expresan SOM, como las células de Martinotti; las que expresan NPY y no SOM; las que expresan VIP; y las que expresan CCK, pero no SOM ni VIP.

La clasificación de acuerdo al desarrollo se incluye dentro de la molecular y separa las interneuronas con origen en la eminencia ganglionar media, eminencia caudal ganglionar y área preóptica.

CLASIFICACIÓN FISIOLÓGICA.

Esta clasificación identifica seis tipos de interneuronas. Las FS muestran un disparo que no adapta en su estado estable, espigas (*spikes*, potenciales de acción registrados extracelularmente) cortas y grandes y rápidas hiperpolarizaciones post potencial. Las *non-adapting non-FS* no muestran un incremento en el intervalo interespiga en el estado estable. Las *adapting* muestran un incremento en el intervalo interespiga en el estado estable. Las *accelerating* muestran un decremento en el intervalo interespiga en el estado estable. Las *irregular spiking* muestran un intervalo interespiga irregular. Por último, las *intrinsic bursting* producen una salva estereotípica de dos o más espigas montadas sobre una depolarización en la línea de base.

La terminología Petilla no está exenta de limitaciones. Para muchos tipos celulares, la aproximación anatómica requiere la identificación del blanco postsináptico subcelular. La aproximación molecular no provee un enfoque funcional, ya que los roles funcionales de los

marcadores más comúnmente usados son desconocidos. La aproximación fisiológica depende enormemente de las condiciones experimentales y requiere una gran estandarización de dichas condiciones para ser aceptable. Por lo tanto, cada una de estas clasificaciones complementarias provee conocimiento parcial cuando es tomada individualmente. Un abordaje que involucre muchos de estos criterios resultaría óptimo, pero conlleva múltiples limitaciones

BOX 2. Interneuronas PV+.

El subgrupo de las interneuronas PV+ constituye el más numeroso (entre el 30-50% de las interneuronas corticales según la región cortical y la especie animal) y son las que se manipulan preferencialmente en nuestro modelo animal. Como hemos visto, las interneuronas han sido sujetas a numerosos criterios de clasificación que han llevado al fraccionamiento de los subgrupos primeramente establecidos. Sin embargo, el grupo de las interneuronas PV+ se ha mantenido constante ante este fraccionamiento debido a la baja o nula co-expresión de esta proteína con otros marcadores (Gonchar 2008). Además, registros electrofisiológicos intracelulares permitieron correlacionar el patrón de actividad electrofisiológico con la morfología y presencia de marcadores inmunohistológicos. De esta manera surgió el consenso de que las interneuronas PV+ corresponderían de manera mayoritaria a las FS (Kawaguchi & Kubota 1997; Toledo-Rodriguez 2004; Zaitsev 2004), neuronas de alta frecuencia de disparo, baja acomodación y que morfológicamente poseen terminales axonales que contactan el soma (interneuronas en cesto) y la región del cono axonal de neuronas piramidales (tipo candelabro, (Gabbott et al. 1997; Gonzalez-Burgos & Lewis 2008)). Las interneuronas PV+ poseen características adicionales, como una maduración postnatal tardía, que las han llevado a recibir gran atención tanto desde el enfoque de enfermedades del neurodesarrollo como en el estudio de su rol fisiológico normal en distintas etapas de la vida.

prácticas. Recientemente, nuevos intentos de clasificación han visto la luz basados en patrones de arborización axonal y prometen ser una herramienta poderosa para la subclasificación de interneuronas (DeFelipe et al. 2013).

Funciones de las interneuronas.

Dada la diversidad de subtipos de neuronas GABAérgicas mencionada anteriormente es de esperar que cumplan variadas y complejas funciones, regulando la fisiología del microcircuito

cortical de manera específica en cada región cortical. Sin embargo podemos agrupar dichas funciones en un número acotado de roles generales:

1) Debido a su rol predominantemente inhibitorio sobre las neuronas piramidales, las interneuronas corticales **regulan la frecuencia de disparo** de las mismas. La dinámica apropiada de las redes neuronales sólo puede ser mantenida si las entradas excitatorias son compensadas por entradas inhibitorias. Si sólo existiesen neuronas excitatorias, no podría mantenerse un orden o asegurarse una autonomía para los grupos de células que se activan transientemente (los llamados "ensambles neuronales"), debido a que en las redes altamente interconectadas, como en el caso de la corteza cerebral, la excitación engendra más excitación. Las interneuronas, mediante la acción inhibitoria del GABA sobre sus receptores postsinápticos, proveen la independencia necesaria a las células piramidales vecinas.

2) Existen numerosos circuitos de control que involucran interneuronas (Figura I2). Uno de los más conocidos, el llamado "*feedforward inhibition*", involucra una entrada excitatoria externa que genera un incremento paralelo en la actividad de una célula piramidal y una interneurona. La actividad inhibitoria de la interneurona activada produce una posterior inhibición en la célula piramidal (Figura I2d). Las distintas configuraciones que se observan en la microestructura del circuito cortical, definen una función general de las interneuronas como reguladoras de las ventanas temporales en los que las neuronas piramidales están disponibles para disparar, cumpliendo un rol en **la regulación de la temporalidad o "*timing*".**

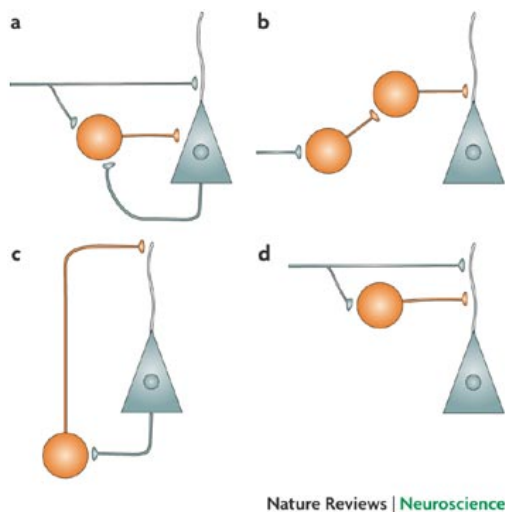


Figura I2. Ejemplos de distintos tipos de inhibición mediadas por las interneuronas (mostradas en naranja) sobre las células piramidales (en gris). Una misma interneurona puede recibir entradas sinápticas de células excitatorias locales y de estructuras más remotas (A). Algunas pueden inhibir otras interneuronas (B). Algunas median la llamada *feedback inhibition*, ya que reciben la mayor parte de la excitación de la misma población de células piramidales que inervan (C). Algunas son excitadas por entradas extrínsecas e inhiben células piramidales locales, por lo que median el fenómeno de *feedforward inhibition* (D). Extraído de (Kullmann & Lamsa 2007).

3) Participan en **la generación y regulación algunos de los ritmos oscilatorios** corticales. Se ha propuesto que la inhibición perisomática mediada por las células en canasto es crítica para la generación de oscilaciones gamma (entendida como una oscilación en el potencial de campo local o LFP, por sus siglas en inglés, *Local Field Potential*, en el rango de los 30 a 100-200 Hz). Esta propuesta se basa en que las interneuronas FS y células PV+ verificadas histológicamente muestran un pico en sus autocorrelogramas y espectrogramas en la frecuencia gamma, y la ocurrencia de sus espigas sigue a aquellas de las neuronas piramidales adyacentes por unos pocos milisegundos (Mann et al. 2005; Hájos & Paulsen 2009). Por lo tanto, el gamma registrado extracelularmente correspondería a los potenciales inhibitorios postsinápticos sincrónicos en células piramidales producidos por las interneuronas FS en canasto (Bragin et al. 1995; Hasenstaub et al. 2005; Freund & Katona 2007; Hájos & Paulsen 2009). Además, estas ondas

BOX 3. Oscilaciones.

Los primeros registros electroencefalográficos en humanos hicieron posible la identificación de patrones de oscilación muy evidentes de baja frecuencia y alta amplitud (denominadas ondas delta) durante el sueño profundo. El estado en el que predomina este tipo de patrones acuñó el nombre de estado "sincronizado". Además, durante la vigilia y el sueño REM, el electroencefalograma muestra oscilaciones de baja amplitud y alta frecuencia (ondas beta y gamma principalmente) que corresponde al denominado estado "desincronizado". Posteriormente, los avances en el conocimiento permitieron crear estos ritmos oscilatorios bajo situaciones controladas (Whittington & Traub 2003; Somers & Kopell 1993; Hasselmo 2002; Buzsáki & Wang 2012).

Las neuronas individuales tienen la capacidad de resonar y oscilar a múltiples frecuencias (Llinas 1988; Hutcheon & Yarom 2000), lo que sugiere que la sincronización de su actividad con los ritmos oscilatorios puede codificar información. La actividad sincrónica de las redes oscilatorias es vista hoy en día como un campo crítico para vincular la actividad de neuronas individuales con el comportamiento del animal (Engel et al. 2001; Whittington & Traub 2003; Somers & Kopell 1993; Hasselmo 2002).

Características generales:

Las oscilaciones se observan al realizar registros del potencial de campo local (LFP, *local field potential*) generado por una población importante de neuronas. Las redes neuronales en mamíferos muestran distintas bandas de oscilación que cubren frecuencias desde 0.05Hz a 300Hz aproximadamente. Las frecuencias medias de cada banda medida experimentalmente siguen la escala logarítmica (Penttonen 2003). Se ha propuesto que cada banda está asociada con un estado cerebral distinto y compiten entre ellas (Klimesch 1999; Csicsvari et al. 2003). Sin embargo, varios ritmos pueden coexistir en la misma o diferentes estructuras e interactuar entre sí (Csicsvari et al. 2003), como sucede en el caso del estado sincronizado, durante el cual predominan las ondas lentas delta, pero estas a su vez presentan oscilaciones gamma de alta frecuencia durante los "up-states". Las oscilaciones de alta frecuencia están confinadas a un espacio neuronal pequeño, es decir, son locales, mientras que grandes redes neuronales son reclutadas durante las oscilaciones lentas (Csicsvari et al. 2003; Steriade 2001).

Funciones de las oscilaciones:

La función específica de cada oscilación no ha sido todavía clarificada y depende del área cerebral en estudio, sin embargo, se pueden destacar algunas generalidades:

Selección de entradas: Ciertas neuronas pueden responder con oscilaciones transientes (salvas de espigas) ante un entrada de frecuencia dada. Esta propiedad intrínseca le permite a la neurona seleccionar entradas de acuerdo a su frecuencia característica. Las interneuronas corticales tienen un amplio rango de frecuencias preferidas (Gupta 2000; Thomson & West 2003) que son importantes para las propiedades dinámicas de la red (Whittington & Traub 2003). Además, la responsividad a una entrada externa depende de cuán comprometida se encuentra una neurona con un determinado ritmo, ya que las oscilaciones sub-umbrales del potencial de membrana de las neuronas producto de la sincronización con dicho ritmo afectan predeciblemente la probabilidad de apertura de muchos canales dependientes de voltaje (Llinas 1988) generando ventanas discretas de oportunidad para que la neurona responda.

Coordinación de ensambles neuronales: La capacidad de sincronización de ensambles neuronales depende de la fuerza sináptica y de la distribución de frecuencias (si la frecuencia de los osciladores es similar, la sincronización se mantiene aún con sinapsis muy débiles (Steven 1990)).

Codificación de información por fase: Las neuronas con entradas dendríticas más importantes dispararán antes en un ciclo oscilatorio que las neuronas con una entrada sináptica pequeña, ya que el umbral se alcanzará antes (Steven 1990; Tsodyks et al. 1996). Por lo tanto, el adelanto de fase dependiente de la magnitud de la entrada, podría ser utilizado para almacenamiento de información a corto término (Lisman & Idiart 1995).

pueden ser inducidas por la activación de interneuronas PV interconectadas mediante diferentes técnicas (Buzsáki & Wang 2012).

4) Debido a que los fenómenos de plasticidad dependen de la actividad de las interneuronas durante determinados periodos, estas **regulan el desarrollo de estructuras cerebrales**. El neurotransmisor GABA modula el desarrollo de las estructuras corticales desde la gestación hasta bien entrada la adolescencia. Los efectos tróficos de GABA en la migración neuronal y en el crecimiento de las neuritas durante el periodo embrionario y perinatal se acompañan de una acción despolarizante del mismo sobre las neuronas inmaduras (Cherubini et al. 1991; Leinekugel et al. 1995). Durante el periodo posnatal, GABA asume su clásico rol como neurotransmisor inhibitorio (Ben-ari et al. 2007), sin embargo, sigue ejerciendo un rol en el desarrollo cortical controlando la redistribución de actividad dependiente de los recursos sinápticos, induciendo la remoción de los sitios débiles transientes que no sinaptan los objetivos apropiados y el fortalecimiento de los sitios más fuertes y apropiados para promover su maduración como ocurre durante la maduración de la vía visual durante el periodo crítico (ver BOX 4).

BOX 4. Experimentos de privación monocular

La privación monocular es una técnica experimental utilizada para estudiar plasticidad en el sistema nervioso. Consiste en suturar uno de los párpados de un animal durante un periodo de tiempo, manteniendo el ojo cerrado. La ausencia de entrada visual produce alteraciones en el conexionado de la corteza visual solo cuando se produce en un periodo de alta plasticidad, denominado periodo crítico. Si la sutura se produce antes o después del llamado periodo crítico el conexionado no se modifica aun en ausencia de entrada visual. En sus trabajos históricos, Takao Hensch muestra que la privación monocular durante un periodo crítico induce una disminución en las conexiones sinápticas excitatorias en la corteza visual. Este descenso depende de los niveles de enzimas involucradas en la síntesis de GABA (Mataga et al. 2004). Este y otros trabajos demuestran que la maduración de la inervación inhibitoria en corteza está regulada por la experiencia sensorial (Morales et al. 2002; Chattopadhyaya 2004).

Dada la amplia cantidad de evidencia que vincula déficits en el funcionamiento de las interneuronas con el desarrollo de la esquizofrenia, una o varias de las cuatro funciones de las interneuronas antes mencionadas podrían contribuir a la aparición de los síntomas de la enfermedad.

Debido al rol de las interneuronas en la generación de algunos ritmos oscilatorios y en el control del momento de disparo de las neuronas, su malfuncionamiento podría afectar parámetros electrofisiológicos relacionados con estos ritmos. A continuación se describen dos ritmos característicos que son de especial importancia en este trabajo.

Ritmos theta y gamma.

RITMO THETA.

Se denomina ritmo theta a las oscilaciones en el LFP de una frecuencia que va de 4 a 12 Hz dependiendo de la estructura, la edad, la especie, la conducta desarrollada y el estado de vigilia (en roedores anestesiados típicamente se considera el rango de 4 a 8 Hz (Derdikman & Knierim 2014)). Las ondas theta en corteza e hipocampo están más consistentemente presentes durante el sueño REM, periodos desincronizados bajo efecto de anestesia y durante varios tipos de actividad exploratoria, no registrándose en general en animales despiertos pero inmóviles. La oscilación theta es más regular en frecuencia y de mayor amplitud en la región CA1 del hipocampo. También se encuentra presente en el giro dentado y en la región CA3. Además de en el hipocampo, las oscilaciones theta y la sincronización de neuronas en este ritmo se ha observado en varias estructuras, incluyendo corteza entorrinal, perirronal, prefrontal y amígdala (Mitchell & Ranck 1980; Alonso & García-Austt 1987; Leung & Borst 1987; Paré & Collins 2000).

Si bien puede registrarse este ritmo en el potencia de campo local de estas estructuras ninguna de ellas es capaz de generar actividad theta de manera intrínseca. En experimentos *in vitro*, la condición mínima necesaria para la generación del ritmo theta es la conexión intacta entre el hipocampo y el septo medial - banda diagonal de Brocca (Petsche et al. 1962), sin embargo, los mecanismos fisiológicos completos para esta generación no han sido descubiertos aún. Ha sido demostrado que las células piramidales e interneuronas de la corteza prefrontal media (mPFC) se encuentran sincronizadas en fase con el ritmo theta originado en el hipocampo (Sirota et al. 2008).

Significado funcional del ritmo theta.

Se ha propuesto que ciclo de theta podría ser considerado equivalente un cuanto de información, permitiendo el intercambio de información entre neuronas en una manera dependiente de la fase, permitiendo la segregación temporal de ensambles neuronales (Buzsáki 2002). Muchos factores pueden afectar la temporalidad precisa de las espigas. Las neuronas sincronizadas con el ritmo disparan en promedio en una determinada fase de la onda. Sin embargo existe una considerable variabilidad en el momento de ocurrencia de las espigas. Más aún, la fluctuación de fase correlaciona con variables comportamentales en animales despiertos (J.O'Keefe & Recce 1993). Este fenómeno indica que las neuronas podrían codificar información con el tiempo de ocurrencia de sus espigas además de con su frecuencia de disparo (Lisman & Idiart 1995; Buzsaki & Chrobak 1995).

RITMO GAMMA.

Se denomina ritmo gamma a las oscilaciones en el LFP de una frecuencia característica que va de 30 a 100-200Hz, dependiendo de los autores. Las oscilaciones gamma se encuentran presentes en los periodos "desincronizados" y en momentos particulares durante las sincronizaciones. Éstas han sido descritas en varias áreas del neocortex, la corteza entorrinal, amígdala, hipocampo, estriado, bulbo olfatorio y tálamo entre otros (Sirota et al. 2008; Chrobak & Buzsáki 1998; Mann et al. 2005; Tort et al. 2008; Pinault & Deschênes 1992).

Las oscilaciones gamma ocurren normalmente en pedazos de corteza aislados *in vitro*, es decir, son generadas localmente (Cunningham et al. 2003; Buhl et al. 1998; Bartos et al. 2007). Por último cabe destacar que, a pesar de que las oscilaciones gamma típicamente surgen localmente, la magnitud de las oscilaciones gamma está modulada por ritmos de menor frecuencia provenientes de otras áreas cerebrales. Este acoplamiento entre frecuencias puede servir para acoplar parches activos de diferentes circuitos corticales (Buzsáki & Wang 2012).

Significado funcional del ritmo gamma.

La habilidad de varios tipos neuronales para sincronizar sus espigas con precisión en el orden de los milisegundos depende de la presencia de fluctuaciones de membrana de rápida frecuencia (Mainen & Sejnowski 1995; Haider & McCormick 2009). La coordinación exacta de las espigas puede estar relacionada a estímulos ambientales, al comportamiento, al LFP o a la actividad de otras neuronas. La mejor predicción es obtenida cuando la información sobre el momento del disparo de dos neuronas vecinas está disponible en una ventana de 10 a 30ms (Jensen & Lisman 1996; Börgers & Kopell 2003; Harris et al. 2003; Lisman 2005), la ventana de tiempo correspondiente a aproximadamente un ciclo gamma. Se han asignado numerosos roles al ritmo

gamma en operaciones cognitivas (Singer & Gray 1995; Engel et al. 2001; Varela et al. 2001). En particular, se ha encontrado una estrecha correlación entre la magnitud de la oscilación gamma en mPFC y el reclutamiento de la misma durante tareas cognitivas que requieren memoria de trabajo y toma de decisiones. Por otra parte la magnitud de la oscilación evocada durante este tipo de tareas varia a lo largo del desarrollo postnatal pudiendo acompañar los importantes cambios madurativos que ocurren en la PFC durante la adolescencia. Además, varios trabajos realizados en humanos muestran una disminución en el ritmo gamma en los pacientes con esquizofrenia (Uhlhaas & Singer 2010).

Cambios normales durante el desarrollo de la PFC.

Durante la adolescencia, la PFC está sujeta a cambios madurativos que contribuyen al refinamiento de sus funciones. Tomando como ejemplo el desempeño en la memoria de trabajo, una de las funciones clásicas de la PFC, estudios en monos demuestran un aumento progresivo en el desempeño conductual que es dependiente de la edad y que aumenta a través de la adolescencia hasta alcanzar los niveles estables en la adultez (Goldman-Rakic 1987). Este desempeño parece ser dependiente de un aumento en el reclutamiento de la PFC en esta tarea a lo largo del desarrollo (Alexander & Goldman 1978).

DESARROLLO DEL CIRCUITO GLUTAMATÉRGICO DE LA PFC.

Las espinas dendríticas son el sitio principal de entrada sináptica excitatoria en las neuronas piramidales. Se ha demostrado que todas las espinas maduras contienen al menos una sinapsis excitatoria (Arellano et al. 2007). La adolescencia es un periodo importante durante el cual

densidad de espinas dendríticas de la capa 3 de neuronas piramidales de la PFC declina hasta alcanzar niveles estables en la adultez en monos (Anderson et al. 1995). Consistentemente, la densidad de sinapsis excitatorias también declina durante esta etapa en la PFC de humanos (Bourgeois et al. 1994; Huttenlocher & Dabholkar 1997). Otras especies han sido menos estudiadas pero exhiben un patrón comparable: la mayor densidad de sinapsis se observa antes de la adolescencia en gatos (Cragg 1975) y en ratas (Gourley et al. 2012), descendiendo a partir de ese momento hasta la adultez temprana. Este podado sináptico podría contribuir al descenso en el grosor de la materia gris cortical que ocurre durante la adolescencia (Giedd & Rapoport 2010). Además, el refinamiento ocurre más pronunciadamente en la capa 3 que en las capas 5-6 (Bourgeois et al. 1994), consistente con la localización de las células piramidales que se encuentran alteradas en la esquizofrenia. A pesar de los avances realizados, aun no hay evidencia clara acerca del mecanismo mediante el cual el podado sináptico afecta el desempeño en la memoria de trabajo.

DESARROLLO DEL CIRCUITO GABAÉRGICO EN LA PFC.

Cruz y colaboradores realizaron inmunomarcaciones, durante diferentes momentos del desarrollo postnatal, para varios marcadores de interneuronas en monos, pudiendo identificar las interneuronas PV+ en forma de candelabro a partir de la morfología particular de las sinapsis que establecen con las neuronas piramidales (en forma de "cartucho"). Los resultados mostraron que la densidad de marca de PV (que parece estar asociada con el nivel de actividad de estas neuronas (Neurons 1985; Heizmann 1984)) y de GAT1 (transportador de GABA) en las sinapsis es baja en los recién nacidos, aumenta hasta llegar a su pico antes de la adolescencia y

decrece marcadamente durante la adolescencia hasta alcanzar los niveles adultos en la PFC de monos (Cruz et al. 2003). Para el caso de la subunidad $\alpha 2$ del receptor de GABA, que se expresa principalmente en las neuronas piramidales, la inmunoreactividad es alta en el periodo posnatal y disminuye de manera estable durante el desarrollo hasta la adultez (Figura I3, Cruz et al., 2003).

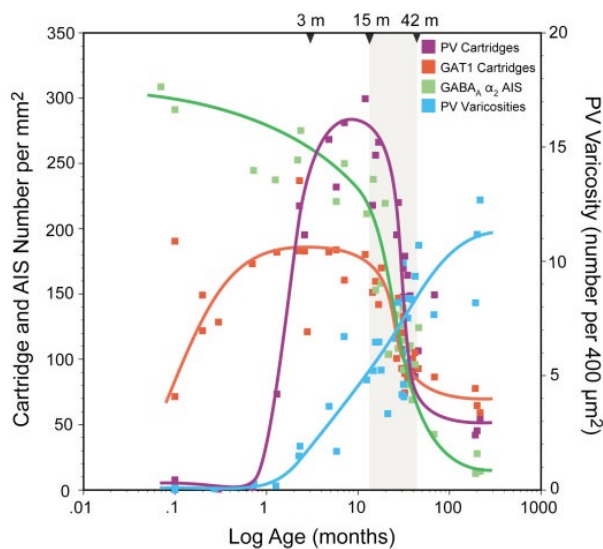


Figura I3. Curso temporal de la densidad de cartuchos de interneuronas PV+ en candelabro marcadas y de segmentos iniciales de axón (AIS, por sus siglas en inglés *axon initial segment*) a lo largo del desarrollo posnatal en la mPFC de monos. También se muestran las densidades de varicosidades de las interneuronas PV+ que no corresponden a cartuchos reportadas por (Erickson & Lewis 2002). Extraído de (Cruz et al. 2003).

Estos hallazgos sugieren que la liberación de GABA de los cartuchos y su permanencia en el espacio extracelular es muy grande durante el desarrollo posnatal temprano, de manera que la entrada GABAérgica hacia las neuronas piramidales es muy alta durante este período y luego disminuye durante la adolescencia.

Teniendo en cuenta lo observado en sinapsis excitatorias, Cruz sugiere un cambio coordinado a lo largo del desarrollo, que consta de un podado de las entradas excitatorias e inhibitorias para mantener el balance excitación/inhibición sin afectar el rango dinámico de trabajo de la red ni su punto de equilibrio.

Se observaron además variaciones en las capas de la corteza que sugieren un cambio gradual en el desarrollo desde una inhibición intracolumnar hacia una inhibición intercolumnar (Erickson & Lewis 2002), y que podrían contribuir a la maduración de tareas que atañen a la PFC (como la memoria de trabajo) junto con los cambios en el grado de inhibición y excitación.

BOX 5. GAD67

El GABA es sintetizado por dos enzimas, GAD67 y GAD65. GAD67 es responsable de más del 90% de la síntesis del GABA y es la enzima limitante para la síntesis del mismo (Asada et al. 1997; Kash et al. 1997). GAD67 está ampliamente distribuida en sinapsis, axones y dendritas, mientras que GAD65 está altamente concentrada en terminales nerviosas (Dupuy & Houser 1996).

La síntesis de neurotransmisor es dependiente de actividad neuronal en las interneuronas GABAérgicas, y la transcripción de *Gad1*, el gen que codifica GAD67, está dinámicamente regulada durante el desarrollo (Kiser et al. 1998), por la actividad neuronal (Patz et al. 2003; Kinney 2006) y por factores ambientales, (Benson et al. 1989; Benevento et al. 1995; Liang et al. 1996; Gierdalski et al. 2001). Por lo tanto, la actividad de GAD67 y el reservorio intracelular de GABA para liberación se encuentran regulados por el nivel de actividad de la célula.

Rol de GABA en el desarrollo.

Huang y colaboradores bloquearon selectivamente la liberación de GABA de las neuronas PV+ en la corteza de ratones juveniles y observaron el patrón de innervación de estas interneuronas. El bloqueo de la liberación de GABA resultó en una mayor densidad de botones sinápticos GABAérgicos sobre las neuronas piramidales que eran innervadas, con una disminución en el número de células contactada por cada interneurona. Además, el tamaño de los botones fue menor y más homogéneo (Wu et al. 2012). Estos resultados indican que la maduración sináptica inducida por GABA consiste en una redistribución, actividad dependiente, de los recursos sinápticos, induciendo la remoción de los sitios débiles transientes que no sinaptan los objetivos apropiados y el fortalecimiento de los sitios más fuertes y apropiados.

para promover su maduración. En otras palabras, la entrada GABAérgica estaría induciendo un refinamiento del circuito. El knock-out condicional de GAD67 en las interneuronas PV+ en cesto en la adolescencia también presentó déficits en la maduración de la inhibición perisomática. Además, la sobreexpresión de GAD67 en estas interneuronas promovió la maduración de sinapsis perisomáticas (Chattopadhyaya et al. 2007). Ya que, como se mencionó anteriormente, los niveles intracelulares de GABA son modulados por la actividad neuronal (Huang 2009), la inhibición perisomática estaría regulada por GAD67 de una manera actividad dependiente.

Estos resultados demuestran que GABA cumple otro rol además de la transmisión sináptica inhibitoria en el cerebro juvenil y adolescente, regulando la maduración de las sinapsis inhibitorias y de los patrones de inhibición, revelando una nueva faceta de la función de GABA que es distinta de su acción trófica temprana en el cerebro neonato.

En el giro dentado del hipocampo, los axones de las interneuronas en cesto maduran marcadamente entre la primera y cuarta semana, y la conectividad incrementada entre neuronas en cesto contribuye a un aumento en la coherencia de la oscilación gamma en redes locales (Doischer et al. 2008).

Resultados electrofisiológicos de nuestro laboratorio muestran que la sincronización con el ritmo gamma también se refina diferencialmente entre interneuronas y neuronas piramidales durante la adolescencia (de Almeida et al. 2013), demostrando que ambas poblaciones siguen trayectorias madurativas diferentes.

Teorías sobre la fisiopatología de la esquizofrenia.

Desde la primera descripción que mostró que la administración de anfetamina (agonista indirecto de los receptores dopaminérgicos, (Angrist et al. 1975) induce síntomas esquizoides (*schizophrenia-like*) en humanos sanos y la observación de que los antagonistas de los receptores dopaminérgicos tipo D2 son un tratamiento parcialmente efectivo para la esquizofrenia (Carlsson 1974), surge la teoría dopaminérgica de la esquizofrenia. Esta teoría propone que una disfunción del sistema dopaminérgico sería causante del desarrollo de la enfermedad (Seeman 1987). Inicialmente la teoría cobró impulso con el desarrollo técnico adecuado que permitió realizar estudios in vivo cuantificando la densidad absoluta de los receptores dopaminérgicos de tipo D2, por medio de estudios de tomografía por emisión de positrones (en inglés PET), en voluntarios sanos y en pacientes (Wong et al. 1984). Los análisis de las imágenes, informaban que la densidad de receptores dopaminérgicos de tipo D2, estaba aumentada en los pacientes con esquizofrenia (Seeman et al. 1984). Por otro lado, estudios realizados bajo la técnica de tomografía computarizada de emisión de fotón único, (en inglés SPECT), permitió analizar la liberación de dopamina, bajo la competencia con el ligando radioactivo. Los estudios que utilizan este enfoque han encontrado evidencia de desplazamiento del radiotrazador de aproximadamente el doble en pacientes con esquizofrenia en comparación con los controles (Laruelle et al. 1999). Sin embargo, la búsqueda de bases biológicas para el estado hiperdopaminérgico estriatal basada en alteraciones en los receptores dopaminérgicos tipo D2 no produjo resultados consistentes. El análisis de tejido post-mortem y los estudios de neuroimágenes que inicialmente mostraron un aumento en la densidad de los receptores dopaminérgicos D2 en esquizofrenia fueron controversiales. Más aún, muchos

estudios no encontraron diferencia alguna en las mismas mediciones (Farde et al. 1987; Nordstrom et al. 1995). Por otro lado, dado que uno de los déficits que presentan los pacientes afecta las disfunciones cognitivas asociadas con la actividad de la PFC (Weinberger et al. n.d.), los estudios se han focalizado en alteraciones en los receptores D1 en la PFC de los pacientes con esquizofrenia. Se encontraron tanto incrementos (Okubo et al. 1997) como decrementos (Abi-Dargham et al. 2002) en la densidad de estos receptores en pacientes. Por lo tanto, la teoría dopaminérgica de la esquizofrenia no ha sido útil para explicar las bases biológicas de muchos de los déficits característicos de la enfermedad. El mecanismo mediante el cual los antagonistas del receptor D2 logran eficacia terapéutica en esquizofrenia no está claro aún.

La llamada “teoría de la hipofunción glutamatérgica” cobró vida tras el seminal descubrimiento por parte de Lodge y Anis en 1982 de que la fenciclidina (PCP), un agente psicomimético capaz de desencadenar un cuadro conductual similar a la esquizofrenia en voluntarios sanos, era un antagonista no competitivo del NMDAR. Esta teoría postula que una hipofunción de los NMDAR es clave en la etiología y fisiopatología de la enfermedad. La teoría fue apoyada por evidencia que mostraba que varios otros antagonistas no competitivos de los NMDAR, incluidos MK-801 y ketamina, inducen una reacción psicótica en sujetos humanos que se asemeja a los síntomas de la esquizofrenia. Estos agentes también evocan síntomas pre existentes en pacientes de esquizofrenia estables (Lahti et al. 1995), sugiriendo que utilizan los mismos mecanismos que se encuentran comprometidos en la enfermedad. Por otro lado, el hallazgo de disminuciones en los niveles de GAD67 en corteza e hipocampo de los pacientes (ver "alteraciones neurobioquímicas"), implicó a las interneuronas del sistema cortico límbico en la fisiopatología de la enfermedad. Ambas líneas de evidencia desembocaron en una propuesta integrada, en la

cual una hipofunción de los NMDAR en interneuronas córtico-límbicas sería responsable de la fisiopatología de la enfermedad (Olney 1989). Esta teoría cobró impulso y fue revitalizada por otros autores (Coyle, 1996; Deutsch Morisha 1989) debido a una serie de descubrimientos clave: las interneuronas son más sensibles que las neuronas piramidales a los antagonistas del NMDAR (Lewis et al. 2005; Grunze et al. 1996); la administración sistémica de dosis bajas de los mismos incrementa la actividad de las neuronas piramidales *in vivo* (Li et al. 2002; Moghaddam et al. 1997), lo que se complementa con estudios de neuroimaging en humanos mostrando excitación cortical neta después de tratamiento con antagonistas del NMDAR (Breier et al. 1997; Vollenweider et al. 1997); por último, dosis bajas y repetidas de estos antagonistas disminuyen la expresión de GAD67 y PV (Morrow et al. 2007; Behrens et al. 2007; Cochran et al. 2003; Keilhoff et al. 2004), un marcador de interneuronas también disminuido en esquizofrenia (ver "alteraciones neurobioquímicas").

En el marco de esta teoría, el desarrollo de terapias farmacológicas para el tratamiento de la esquizofrenia ha experimentado un sustancial cambio de rumbo por primera vez en años. La farmacéutica Eli Lilly ha producido el primer antipsicótico efectivo que no actúa sobre el sistema dopaminérgico (Patil et al. 2007). La droga, un agonista del receptor metabotrópico glutamatérgico de grupo II mGluR2/3, ha demostrado eficacia clínica en un estudio de fase 2 tanto para síntomas positivos como negativos de la patología.

Se ha propuesto que la activación de los mGluR2/3 presinápticos en terminales glutamatérgicas actuaría incrementando la liberación de glutamato específicamente sobre interneuronas PV+, restableciendo los niveles de activación de las mismas. Si bien todavía en etapa de validación clínica (Kinon & Gómez 2013) este hallazgo demuestra cómo una mejor comprensión del rol de

las interneuronas GABAérgicas en enfermedades como la esquizofrenia podrían contribuir al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Sin embargo queda aún mucho por dilucidar, especialmente por la complejidad del sistema GABAérgico inhibitorio cortical y sus múltiples componentes funcionales.

Terapéutica y modelos animales.

Como se mencionó anteriormente las primeras drogas utilizadas para tratar los síntomas psicóticos de la esquizofrenia fueron los neurolépticos clásicos: haloperidol y clorpromazina. Estos fueron descubiertos inesperadamente en los años cincuenta y son también conocidos como antipsicóticos de primera generación o típicos. Los antipsicóticos de segunda generación o atípicos: clozapina, olanzapina, riperidona, aripiprazol y muchos otros fueron desarrollados a partir de los años setenta y tienen menos tendencia a producir efectos extrapiramidales no deseados (desordenes del movimiento inducidos por drogas, Remington, 2003). Mientras que los síntomas positivos son tratados en un grado variable tanto por antipsicóticos típicos como atípicos, los síntomas negativos y cognitivos permanecen resistentes al tratamiento con los antipsicóticos de primera generación (Nuechterlein et al. 2004; Keefe et al. 2007; Mintz & Kopelowicz 2007). Consecuentemente, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos compuestos que sean eficientes para tratar estos síntomas.

Los modelos animales de enfermedades psiquiátricas son herramientas pre-clínicas muy valiosas para investigar las bases neurobiológicas de estos desordenes. Ellos ofrecen una plataforma rápida para monitorear la progresión de la enfermedad, la oportunidad de realizar

análisis invasivos de factores moleculares, estructurales y electrofisiológicos que subyacen a la enfermedad y de evaluar nuevas terapéuticas no evaluables en humanos.

Nuestro modelo.

Para testear directamente la hipótesis de que la hipofunción en del NMDAR en las interneuronas GABAérgicas produce fenotipos compatibles con esquizofrenia se desarrolló una línea de ratones knock-out condicional (llamados en este trabajo KO) de la subunidad NR1 del NMDAR (Belforte et al. 2010), que es indispensable para su funcionamiento. Se utilizaron ratones transgénicos de la línea Ppp1r2-Cre 4127 que expresan la proteína Cre bajo el control del promotor del gen Ppp1r2, que se expresa en neuronas GABAérgicas de corteza e hipocampo. Esta línea fue cruzada con ratones Flox-A que presentan el gen que codifica para la subunidad NR1 del NMDAR flanqueada por sitios lox-P (ver Figura I4).

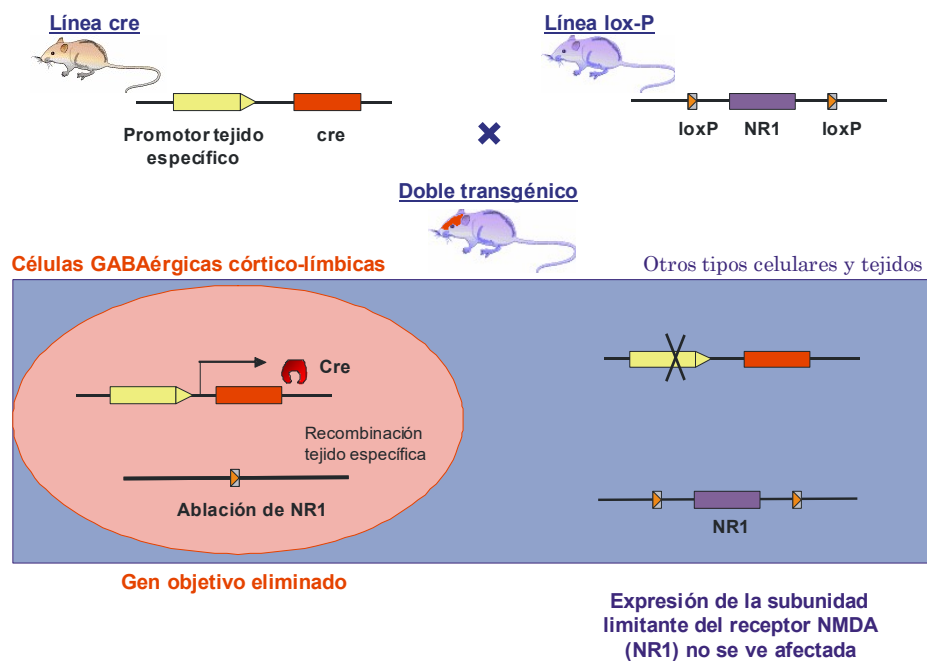


Figura I4. Ablación genética del NMDAR en células GABAérgicas del cerebro anterior usando el sistema cre/lox-P.

El marcado por inmunofluorescencia reveló que más del 85% de las neuronas que recombinaron contiene PV y la población restante contiene Reelina. La recombinación comenzó a ser detectada en el día posnatal 7, llegando a una ablación estable del NMDAR a partir del día posnatal 21. La expresión de Cre recombinansa se mantiene restringida a neuronas GABAérgicas hasta las 18 semanas de edad. Por lo tanto, esta construcción genética permitió la ablación selectiva de la subunidad fundamental del NMDAR en interneuronas del sistema córtico-límbico, las cuales son principalmente PV+, en los primeros días posnatales.

Llamativamente, el ratón preadolescente (de 28 a 32 días de edad) no presenta fenotipo conductual a pesar de carecer de NMDAR funcionales en las interneuronas del sistema córtico-límbico. Luego del transcurso de la adolescencia (luego del día posnatal 60), y consecuentemente con lo observado en humanos, el ratón desarrolla un perfil conductual que es compatible con la esquizofrenia (Figura 15). Los fenotipos observados en el ratón adulto engloban los síntomas positivos: agitación psicomotora y *gating* sensoriomotor alterado, negativos: baja tasa de éxito en la reproducción por déficits sociales, problemas de construcción de nido y carencia de conductas destinadas a la búsqueda de placer (anhedonia), y cognitivos: fallas en la memoria de trabajo y en la memoria social a corto término. También, en consonancia con lo observado en humanos, algunos de los fenotipos KOs son exacerbados por el estrés, GAD67 y PV se encuentra disminuido en las interneuronas y los antipsicóticos atípicos revirtieron los mismos síntomas que en los pacientes.

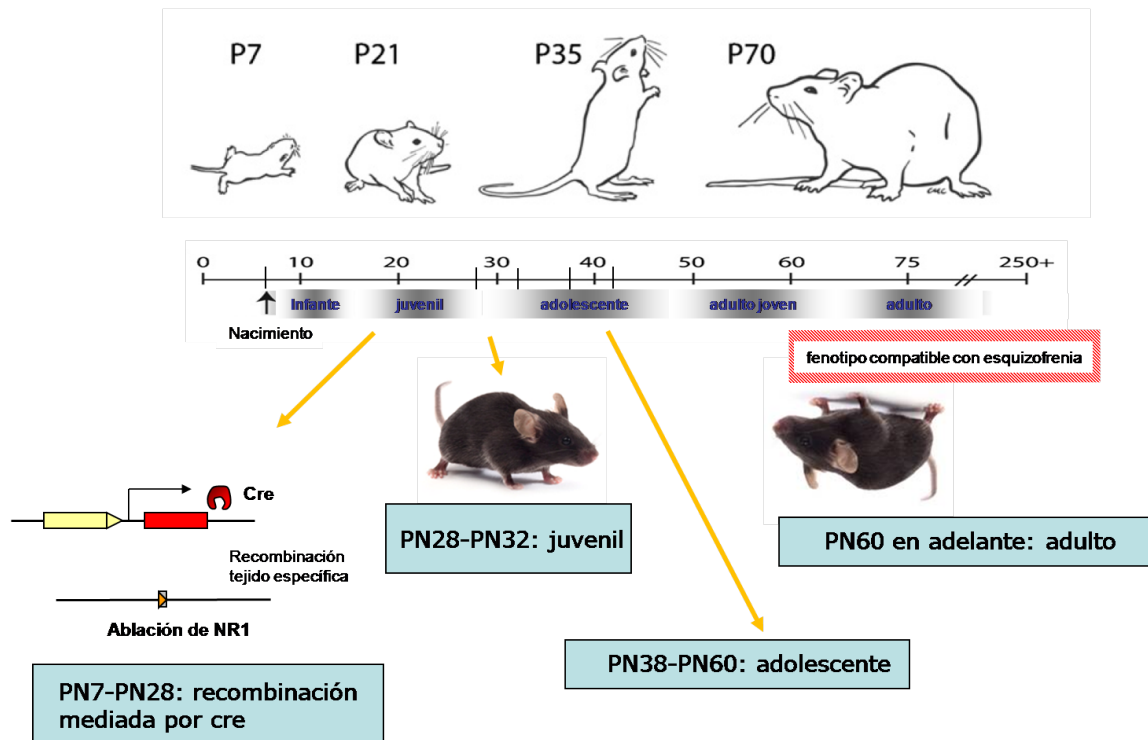


Figura I5. Nuestro modelo a lo largo del neurodesarrollo.

En ese estudio, se generó además un knock-out condicional de NR1 en el cual la ablación del NMDAR ocurre después de la adolescencia en las mismas áreas y en los mismos tipos neuronales que el anterior (Belforte et al. 2010). Estos animales KO adultos no presentaron ningún fenotipo conductual ni neuroquímico. Este resultado sugiere que existe una interacción entre la falta de NMDAR funcionales y el desarrollo postnatal durante la adolescencia que explicaría el desarrollo de los fenotipos compatibles con esquizofrenia antes descriptos.

El **OBJETIVO** general de este trabajo es identificar las bases funcionales por las cuales una alteración temprana en las interneuronas cortico-límbicas puede desembocar en un cuadro conductual similar a la esquizofrenia luego de completar el desarrollo durante la adolescencia.

Dados los antecedentes presentados en relación a nuestro modelo, esperamos encontrar una interacción entre el efecto de la alteración génica y el desarrollo durante la adolescencia sobre alguno de los componentes fisiológicos a estudiar.

Nos concentraremos en el estudio de la mPFC debido a que: 1) esta estructura completa su desarrollo durante adolescencia, 2) existe evidencia de pacientes que muestra alteraciones en el funcionamiento de la misma, 3) varias funciones cognitivas alteradas en la esquizofrenia dependen de la misma.

Objetivos específicos:

1) Establecer el impacto de la ablación temprana del NMDAR en interneuronas cortico-límbicas sobre la actividad de las neuronas piramidales e interneuronas de la mPFC antes y después de completar su desarrollo durante la adolescencia. Para ello realizaremos registros electrofisiológicos in vivo utilizando un abordaje que permita obtener información fehaciente sobre la actividad unitaria de neuronas aisladas (*single unit*) y al mismo tiempo discrimine piramidales de interneuronas. Esperamos encontrar que el balance excitación/inhibición poblacional se vea alterado en los KO adultos pero no en los juveniles, con un descenso en la frecuencia media de disparo de las interneuronas debido a la falta del NMDAR y un aumento consecuente en la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de adultos debido a una desinhibición del circuito.

2) Determinar las consecuencias de la eliminación del NMDAR en interneuronas PV+ sobre la temporalidad de descarga de las neuronas de la mPFC. Para ello analizaremos en nuestro modelo animal de esquizofrenia el grado de sincronización de las neuronas de la mPFC con un

ritmo generado localmente (gamma) y uno distal proveniente del hipocampo (theta) evaluando el enganche de fase de neuronas individualizadas electrofisiológicamente.

Dado que las interneuronas PV ejercerían un rol en la regulación de la temporalidad de las espigas y determinarían la capacidad de las neuronas piramidales de sincronizarse correctamente a ritmos locales y distales, especulamos que una alteración de las mismas durante la etapa adulta podría impedir la correcta sincronización con los ritmos theta y gamma.

3) Dilucidar si la manipulación de los NMDAR que resulta en un cuadro conductual compatible con la esquizofrenia se correlaciona con cambios en la conectividad funcional de la vía hipocampo-prefrontal a lo largo del desarrollo. Para ello analizaremos ratones control y mutantes, antes y después de completar el desarrollo postnatal en la adolescencia midiendo la respuesta evocada en la mPFC frente a la estimulación eléctrica del hipocampo ventral (vHP). Hipotetizamos que el modelo animal tendrá en su etapa adulta un correlato con lo observado en humanos para la etapa y presentará una conectividad funcional disminuida.

4) Esclarecer el estado de la plasticidad de la vía hipocampo-prefrontal en los ratones carentes de NMDAR en interneuronas cortico-límbicas. Existe evidencia que sugiere que el mecanismo de depresión a largo término (LTD, por sus siglas en inglés *Long Term Depression*) se encuentra aumentado en la mPFC durante la adolescencia y que este podría subyacer la maduración de dicha estructura mediante el podado de entradas sinápticas durante esta etapa (Selemon 2013). Un mecanismo de LTD alterado durante el periodo adolescente en los animales KO podría explicar posibles cambios en la conectividad funcional entre estas estructuras en la adultez. Utilizaremos protocolos para inducir cambios plásticos en la vía evaluando la susceptibilidad de la misma a sufrir modificaciones en la conectividad funcional .

MATERIALES Y MÉTODOS

Declaración ética: todos los procedimientos experimentales fueron realizados acorde con la regulación de instituciones (Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires) y del gobierno (SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, RS617/2002, Argentina). Este estudio fue específicamente aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (RS2964/2010). Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento. Todas las cirugías se realizaron bajo anestesia. Todos los animales fueron mantenidos en un ciclo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad, a temperatura constante (21-24°C) con acceso libre a comida y agua en el bioterio del IFIBIO bajo cuidado de personal capacitado.

Modelo experimental y genotipado.

La adolescencia en los ratones se extiende desde aproximadamente el día posnatal 35 al 55, y generalmente se considera adultos jóvenes a los ratones de alrededor de dos meses de edad (Spear 2000). Para los experimentos, se utilizaron ratones macho juveniles (28 a 31 días de edad) y adultos (3 a 4 meses). Se utilizó una línea transgénica en la que la expresión de la proteína Cre recombinasa está regulada por el promotor de Ppp1r2, que se expresa fundamentalmente en neuronas GABAérgicas de corteza e hipocampo (<https://www.jax.org/strain/012686>, (Belforte et al. 2010). La recombinación en esta línea Ppp1r2-Cre ocurre durante el desarrollo posnatal temprano (se detecta en corteza e hipocampo

alrededor del día postnatal 7) en el 45%-50% de las células GABAérgicas, la mayoría de las cuales son PV+ (85-95% según la región) (Belforte et al. 2010). La recombinación alcanza su máximo para la tercer semana de vida postnatal y permanece estable hasta la semana 18-20. Para restringir la ablación del NMDAR a las neuronas GABAérgicas que expresan Cre recombinasa, los ratones Ppp1r2-Cre fueron cruzados con la línea FYL1 NR1^{loxP/loxP} (**NR1 flox**), que presenta la subunidad NR1 del receptor glutamatérgico de tipo NMDA, , flanqueada por sitios loxP (Dang et al. 2006). Esta subunidad es indispensable para el funcionamiento del receptor, por lo cual la ablación de este gen resulta en la pérdida de función de dicho receptor. La ablación del gen se logra de manera Cre dependiente exclusivamente en aquellas neuronas que expresen la enzima Cre recombinasa (Figura I4). Los animales experimentales se generaron mediante la cruce de ratones NR1^{loxP/loxP} Ppp1r2-Cre^{+/-} y NR1^{loxP/loxP} Ppp1r2-Cre^{-/-} (**NR1 flox**), para las que se utilizaron sólo los ratones provenientes de las primeras dos camadas de progenie, ya que la tasa de apareo de los parentales disminuye en los KOs debido al desarrollo del fenotipo conductual (Belforte et al. 2010). De la descendencia obtenida, los animales NR1^{loxP/loxP} Ppp1r2-Cre^{+/-} son los llamados **KO**, que presentan la ablación de la subunidad NR1 del NMDAR, mientras que sus hermanos NR1^{loxP/loxP} Ppp1r2-Cre^{-/-} (**NR1 flox**) fueron utilizados como control (ver Figura I4). Las crías fueron sexadas y se las utilizó tanto para realizar experimentos (sólo machos) como para perpetuar la línea (machos y hembras). Los animales experimentales fueron destetados en el día postnatal 21-22 para evitar variabilidades inducidas por el tiempo de vida fuera del cuidado parental. Luego del destete, se tomó para cada uno de ellos una muestra de tejido de aproximadamente 3-5mm de la punta de la cola (con excepción de los animales sometidos a experimentos electrofisiológicos en etapa juvenil, en cuyo caso la muestra

fue tomada luego de los experimentos con el fin de minimizar el efecto estresor causado por la obtención de la biopsia) utilizando un cauterizador para minimizar el sangrado luego del corte. Estas muestras fueron sometidas a un protocolo de purificación del ADN por digestión del tejido con Proteinasa K y precipitación con isopropanol como se describe en el anexo (Protocolo 1). El ADN purificado de esta manera fue sometido a Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando primers específicos para Cre y NR1 floxeado (Protocolo 1 del Anexo). Los productos de la PCR fueron separados en geles de agarosa siguiendo procedimientos estándar (Protocolo 2 del Anexo) y el genotipo de las crías fue identificado a partir del patrón de expresión de bandas de las muestras. Un ejemplo representativo de dichos geles se presenta en la Figura MyM1.

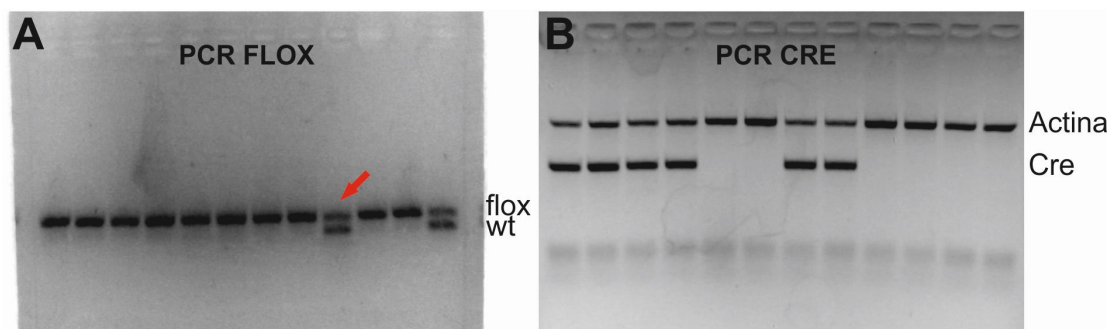


Figura MyM1. Ejemplos representativos de geles de agarosa mostrando el patrón de bandas de las PCRs realizadas en este trabajo. Cada calle corresponde a un animal genotipado. **A.** PCR de flox. La flecha roja indica un animal heterocigota para flox NR1^{loxP/wt}. **B.** PCR de Cre. Las calles con dos bandas corresponden a animales Cre^{+/-}, y aquellas con una única banda corresponden a animales control Cre^{-/-}.

Experimentos electrofisiológicos.

ANESTESIA Y CIRUGÍA.

Tanto los animales juveniles como los adultos fueron anestesiados con una solución de uretano (SIGMA U2500) a una concentración de 75mg/ml en solución fisiológica mediante

inyección intraperitoneal. La dosis inicial aplicada fue de 1,35g/kg de ratón. Los animales fueron montados en un marco estereotáxico y su temperatura corporal fue mantenida entre 36 y 37°C mediante una manta térmica servo-controlada (Fine Science Tools, Vancouver, Canadá). Se utilizó clorhidrato de bupivacaína al 5% pv, s.c. como anestésico local en los sitios de presión. Durante el transcurso del experimento se monitoreó el nivel de anestesia mediante la actividad del electrocorticograma (ECoG) y evaluando la respuesta refleja a un estímulo aplicado sobre la almohadilla plantar. El plano de anestesia fue regulado de manera de promover los períodos de desincronización espontánea que fueron utilizados en el análisis. Cuando el plano de anestesia no era el apropiado, se administraron dosis de refuerzo de uretano (0.1 - 0.2 g/kg intraperitoneal cada 1 hora aproximadamente). Los animales anestesiados fueron sometidos a una craneotomía y los electrodos fueron implantados utilizando las siguientes coordenadas:

mPFC: anteroposterior: +1.9 mm; lateral: 0.5 mm; vertical: 3.3 mm midiendo desde la altura del cráneo en el caso de los experimentos de conectividad funcional y plasticidad. En los experimentos con tetrodos, la posición inicial fue de 1 mm medido desde la superficie cortical, y se fue descendiendo en el electrodo como se explica en el protocolo. Se utilizó un ángulo de 10° en el plano coronal.

vHP: anteroposterior: -3 mm; lateral: 2.8 mm; vertical: 3.7 mm midiendo desde la altura del cráneo, con un ángulo de 10° en el plano coronal.

Corteza Motora (CxM): anteroposterior: +1.9 mm; lateral: 1.4 mm contralateral al electrodo ubicado en mPFC; con un ángulo de -10° en el plano coronal.

EXPERIMENTOS UTILIZANDO TETRODOS.

Este tipo de registros no habían sido llevados a cabo en nuestro laboratorio y parte de mi tarea consistió en la puesta a punto de los mismos, tanto en lo concerniente a la fabricación como al análisis de los resultados obtenidos con los mismos.

Electrodos y protocolos de registro.

Se utilizó un arreglo conteniendo 3 tetrodos, este arreglo fue fabricado en nuestro laboratorio como se describe en el anexo (Protocolo 3). Luego de la fabricación, las puntas de los tetrodos fueron recubiertas mediante microelectroplateado con una película de oro para disminuir su impedancia hasta alcanzar los niveles óptimos para el registro (entre 200 y 500 K Ω) como se explica en el anexo. Se implantó el arreglo en la mPFC para medir la actividad espontánea de neuronas individuales. Para medir la oscilación del LFP cortical, requerida para la determinación del estado de anestesia y los análisis de enganche de fase, se implantaron electrodos bipolares en la CxM y en el vHP (SNE-100, Better Hospital Equipment, EEUU; diámetro del contacto externo 0,25 mm, diámetro del contacto interno 0,1 mm, separación entre contactos 0,75 mm, exposición de cada contacto 0,25 mm). Las señales provenientes de los electrodos implantados en el vHP y en la CxM fueron utilizadas para controlar el plano de anestesia y para clasificar los periodos de desincronizaciones, como se explicará más adelante.

La señal de los electrodos bipolares en estos experimentos junto con la de los tetrodos fue amplificada, filtrada (filtro pasa altos en 0.5Hz) y digitalizada (25kHz) utilizando un amplificador diferencial de alta impedancia de entrada (RHA2000-EVAL board Intan Technologies). Se utilizó

el programa de INTAN (Intan Technologies interface software) para la visualización online del registro.

Protocolo: una vez implantados los electrodos, se dejó estabilizar el tejido por 30 minutos. Luego de este periodo se registró la actividad espontánea en mPFC, vHP y CxM durante 30 minutos. Se descendió el arreglo de 300 a 500 μm utilizando un micromanipulador hidráulico procurando maximizar la amplitud de las espigas de las neuronas presentes en la zona a registrar y se dejó estabilizar el tejido por 20 minutos, luego de los cuales se registró nuevamente la actividad espontánea durante 30 minutos. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar los 3 mm de profundidad desde la superficie cortical o hasta que dejaron de observarse espigas en el tetrodo, registrando de esta manera de 5 a 6 posiciones a lo largo de toda la mPFC. Luego de terminado el registro, se realizó un test de impedancia para todos los electrodos para cerciorarse de que la misma fue la adecuada durante el experimento. Al finalizar los registros los animales fueron sacrificados y su cerebro procesado como se indica más adelante.

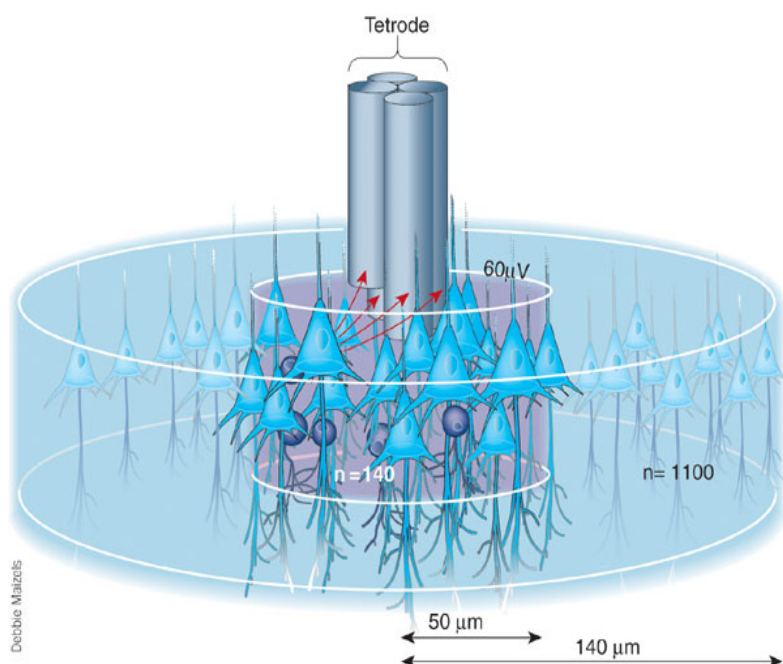


Figura MyM2. Área de registro de un tetrodo. Un tetrodo implantado en la corteza registra la actividad de neuronas en un radio de 140 μm (radio celeste). Debido a que la calidad de aislamiento de unidades varía en función de la distancia desde el electrodo, las unidades singulares (provenientes de una única neurona) pueden obtenerse en un rango menor de aproximadamente 50 μm (radio gris). La distancia entre las puntas de cada alambre y una neurona piramidal (triángulo) está indicada con flechas rojas. Extraído de (Buzsaki, 2004).

Análisis de los registros.

Los tetrodos presentan baja impedancia, por lo que son utilizados para detectar espigas de las neuronas circundantes a una distancia óptima de aproximadamente 100 μ m (Figura MyM2). Los tetrodos utilizan cuatro alambres enrollados sobre sí mismos, de manera que sus puntas se encuentran muy próximas entre sí, por lo que reciben señales ligeramente distintas de una misma neurona aledaña (Figura MyM2).

Esta variabilidad en la señal registrada por cada alambre de un tetrodo permite distinguir con alto grado de diferenciación cuáles de todas las espigas registradas por cada uno de los alambres corresponde a una neurona única (Figura MyM3). Debido a que la amplitud de la señal registrada depende de la distancia entre la neurona y la punta del alambre, las señales empiezan a ser menos diferenciables entre sí cuando provienen de neuronas que se encuentran en el campo lejano.

Para identificación de las espigas provenientes de cada neurona utilizamos el paquete de análisis Klusters, NeuroScope, NDManager desarrollado en el laboratorio Buzsáki (Hazan et al. 2006).

A modo de resumen de la metodología utilizada: los archivos fueron convertidos a un formato compatible con los programas a utilizar, luego fueron concatenados y filtrados. Para extraer las espigas provenientes del registro realizado con los tetrodos se utilizó un filtro digital (filtro de la mediana con un ancho medio de la ventana de 2,4ms). Para los registros de LFP se submuestreó a 1250 Hz y se filtró offline (Hanning, 0,5 a 100Hz).

Cable del tetrodo

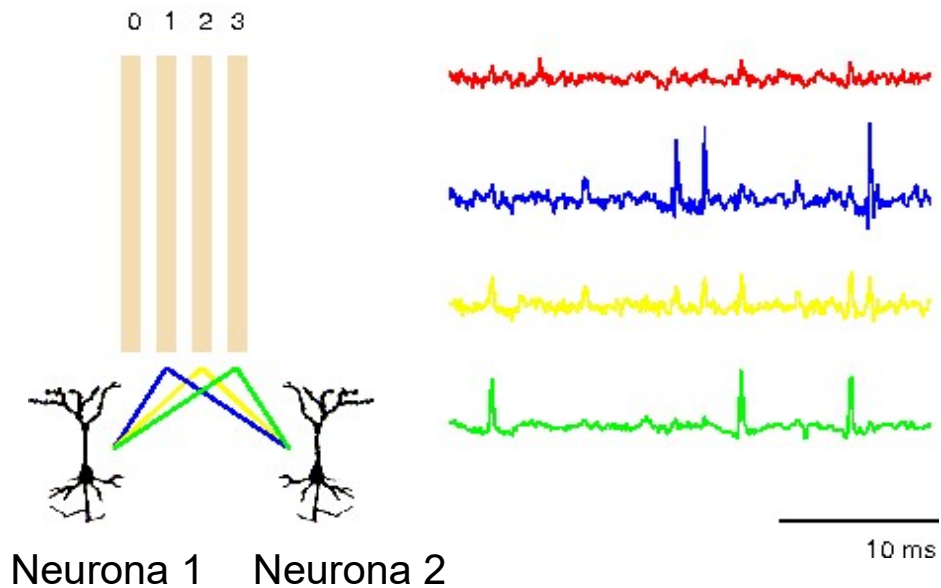


Figura MyM3 La tecnología del tetrodo permite identificación de espigas de neuronas individuales mediante comparación de la señal registrada por cada alambre. Las puntas de los tetrodos se encuentran próximas entre sí, permitiendo el solapamiento de las áreas de registro de cada una de ellas. Las asimetrías en las señales registradas permiten la clasificación. La punta 2 se encuentra equidistante de las neuronas 1 y 2, y las señales de ambas células parecen idénticas (trazo amarillo). Con el análisis de las puntas 1 y 3, cada una de las cuales se encuentra asimétricamente colocada con respecto a las dos células, los disparos de ambas pueden ser diferenciados. El trazo azul muestra las espigas de una neurona, el trazo verde los de la otra. Sin el análisis de al menos uno de los otros trazos, las espigas registradas en el trazo amarillo hubieran sido erróneamente atribuidas a una única neurona. Extraído de (Pezaris, J. S., Sahani, M., and Andersen 1996).

Clasificación de las espigas.

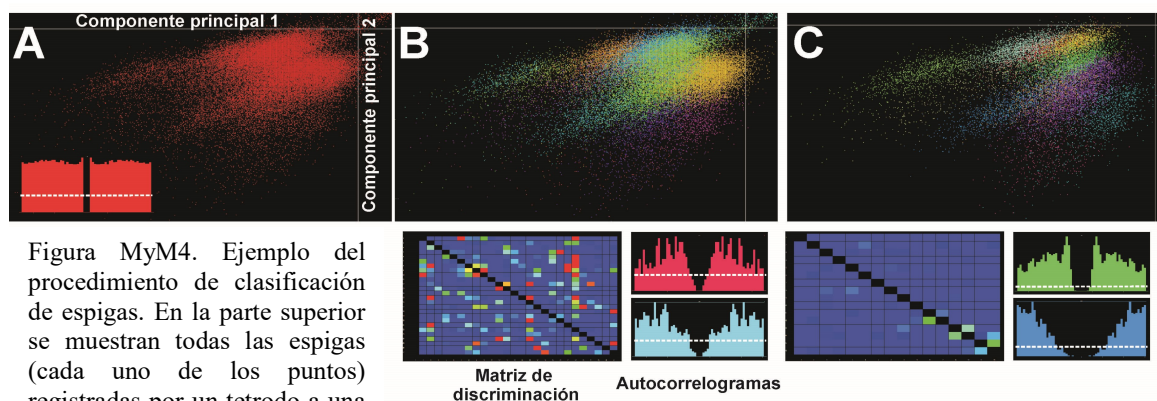
Sobre los registros provenientes de los tetrodos, los canales fueron agrupados en 3 grupos de 4 (los 4 alambres provenientes de cada uno de los 3 tetrodos utilizados). Se estableció un umbral de voltaje de $40\mu\text{V}$ que fue el mismo para todos los experimentos realizados. Se adquirió una ventana de tiempo circundante (1.6 ms) a cada uno de los puntos en los que la señal cruzó el umbral siguiendo un método ya publicado (Hazan et al. 2006). Las señales dentro de cada una de estas ventanas fueron consideradas espigas putativas. Sobre ellas se realizó el análisis de los componentes principales, que consta de un algoritmo que clasifica a cada una de las espigas putativas de acuerdo a 12 parámetros (3 para cada uno de los 4 alambres del tetrodo),

escogidos por el programa, que mejor definen las curvas. Valiéndose de estos componentes se definieron agrupaciones multidimensionales de conjuntos de espigas con un patrón de distribución definido que llamaremos clusters y que contienen todas las espigas asignadas a una única neurona. Esta clasificación fue realizada por un algoritmo del programa bajo supervisión humana (Figura MyM4). Basándonos en la forma de las autocorrelaciones de cada uno de los clusters se pudo determinar, utilizando el periodo refractario, que todas las espigas fueran provenientes de una única neurona. Además, se utilizó la matriz de error, una representación gráfica de la medida estadística de similitud entre clusters como guía para evitar la sobrepartición de los mismos. Sólo fueron utilizados en el análisis posterior los clusters correspondientes a neuronas únicas, y aquellos contaminados con dos o más neuronas fueron descartados.

Clasificación en interneuronas o células piramidales.

La forma de la espiga puede utilizarse para clasificar las unidades aisladas en posible neuronas piramidales e interneuronas basándose en diferencias relativas en la duración y cinética de sus fases. Se utilizaron parámetros previamente descritos ya utilizados en el laboratorio (de Almeida et al. 2013) concernientes a la forma de la espiga para la clasificación, como se detalla en Resultados (Figura R3). Si bien la clasificación es eficiente, el termino correcto para los subgrupos sería interneuronas electrofisiológicamente definidas y células piramidales electrofisiológicamente definidas, por simplicidad nos referiremos de ahora en adelante a las mismas como interneuronas y células piramidales. No existen estudios con tetrodos que permitan conocer con exactitud qué subtipos de interneuronas son las que pueden identificarse

por este método, si bien se acepta que se trataría mayoritariamente de interneuronas *fast spiking* dada la cinética de su potencial de acción observada en registros intracelulares *in vivo*.



Clasificación de los periodos de registro en periodos de sincronización y periodos de desincronización.

Bajo anestesia con uretano la actividad cortical transiciona entre dos estados, uno con ondas delta sincronizadas de gran amplitud similar al sueño de onda lenta y otro electrofisiológicamente asociado al estado de vigila y al REM (estado desincronizado, ver Introducción). Para aislar los segmentos de actividad desincronizada se utilizó un programa escrito en Labview 8.5 desarrollado ad hoc en el laboratorio. Se utilizó el análisis por transformada de Fourier (en inglés, FFT) y se graficó la potencia del ritmo theta en el LFP

hipocampal (3-6Hz) y la potencia del ritmo delta en el ECoG (0,5-2Hz) a lo largo del tiempo durante todo el registro. Se realizó un cociente punto a punto de las dos potencias y se graficó dicho cociente. Se aplicó un umbral establecido a partir de la inspección preliminar de segmentos ya caracterizados y se empleó dicho umbral para todas las sesiones de análisis sobre el gráfico de cociente obtenido. Los periodos durante los cuales el cociente sobrepasó dicho umbral fueron clasificados como periodos de desincronización, lo cual fue confirmado mediante inspección de los FFTs.

Una vez clasificadas las espigas y obtenidos los tiempos de ocurrencia de las mismas, estos datos fueron cargados en el programa Neuroexplorer (Nex Technologies, USA) junto con los periodos clasificados como de desincronización. La frecuencia media de disparo durante los periodos de desincronización y la frecuencia de disparo en función de la fase de las ondas theta y gamma fue obtenida utilizando este programa.

Análisis de enganche de fase con ondas (*phase locking*).

Todo el análisis se realizó con las espigas ocurridas en los periodos desincronizados utilizando el programa Oriana (Oriana version 4, Kovach Computing Services) para la estadística circular y la confección de las rosetas de fase. Sólo se utilizaron para este análisis las neuronas que presentaron más de 50 espigas en los periodos desincronizados, ya que las neuronas con pocas espigas pueden arrojar falsos positivos en estos análisis estadísticos. Se realizó el test de circularidad de Rayleigh sobre cada neurona y se clasificó como neuronas "sincronizadas" o "enganchadas" aquellas que presentaron una probabilidad de Rayleigh menor a 0,05; es decir, aquellas cuya distribución de frecuencias no sigue una distribución circular uniforme. Para medir

el grado de sincronización de las neuronas piramidales y las interneuronas con los ritmos theta hipocampal y gamma cortical se realizaron rosetas de todas las neuronas previamente clasificadas como "sincronizadas" comprándolas con cada uno de estos ritmos (ver Figura R6). Se cuantificó el módulo resultante de la sumatoria vectorial de las frecuencias de disparo para cada fase de la onda y se promediaron dichos módulos para todos los grupos experimentales. Para ello se utilizó una rutina en Matlab escrita en el laboratorio por la investigadora Camila Zold.

EXPERIMENTOS MIDIENDO CONECTIVIDAD FUNCIONAL Y PLASTICIDAD DE LA VÍA vHP-mPFC.

Electrodos y protocolos de registro.

Se implantó un electrodo en configuración monopolar (SNE-100, Better Hospital Equipment, EEUU) en la mPFC para registrar la respuesta de LFP evocada por la estimulación hipocampal, otro de iguales características pero con conexión bipolar en el vHP para estimularlo y un tercero de iguales características en CxM para controlar el plano de anestesia. La señal de los electrodos bipolares en los experimentos de conectividad funcional y plasticidad fue adquirida mediante un amplificador diferencial Akonic LAB1 (Akonic, Argentina) y amplificada, filtrada (1Hz-3kHz) y digitalizada (20kHz).

Protocolo: Una vez posicionados los electrodos, se dejó estabilizar el tejido 30 minutos. Para construir la curva intensidad-respuesta se realizó un protocolo de pulsos simples de estimulación de 100 μ s de duración en el vHP cada 20s en un rango creciente de estimulación de 50 μ A a 800 μ A, aplicando 10 pulsos para cada una de las intensidades y se

midíó la amplitud de la respuesta evocada en la mPFC luego de cada estimulación. El análisis de los datos se explica más adelante. Posteriormente se realizaron en algunos casos protocolos de estimulación a baja frecuencia (LFS, por sus siglas en inglés, *Low Frequency Stimulation*) para inducir plasticidad utilizando la intensidad de corriente que evocó el 80% de la respuesta máxima obtenida en esa posición durante la construcción de la curva intensidad-respuesta. Se aplicaron pulsos test cada 20 s durante 30 min para establecer la línea de base. A continuación se aplicaron 1500 trenes de LFS (5 pulsos de 100 μ s a 250Hz) a 1Hz para inducir LTD, según el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (ver Figura R12). Posteriormente se midió la respuesta evocada por pulsos test de manera idéntica a lo realizado para la línea de base por 30 min.

Este protocolo para inducir LTD fue repetido 4 veces a manera de protocolo de saturación a lo largo del experimento para evaluar el piso y la dinámica de depotenciación de la respuesta. La magnitud de la respuesta fue evaluada mediante pulsos test antes y después de cada protocolo (Figura MyM5). Al finalizar los registros los animales fueron sacrificados y su cerebro procesado como se indica más adelante.

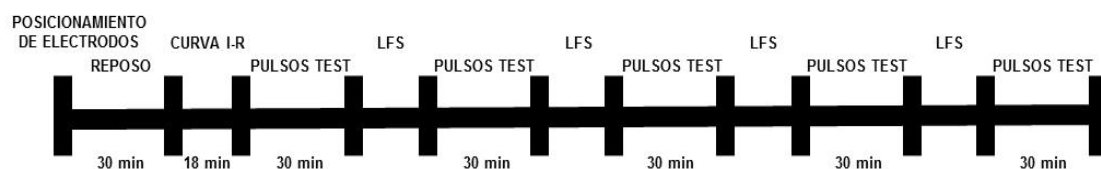


Figura MyM5. Esquema del protocolo utilizado para los experimentos midiendo conectividad funcional y plasticidad de la vía vHP-mPFC.

Análisis de los registros.

La amplitud de la respuesta evocada en la mPFC fue medida utilizando el pCamp (The Clampfit 10 Data Analysis Module Axon TM). Se aplicó un filtro offline digital pasa-alto en 5Hz y otro pasa-bajo a 600Hz (ambos Bessel de 8 polos). Luego se midió la amplitud pico a pico de la respuesta como se indica en resultados. Los análisis posteriores y los gráficos fueron realizados en Excell (Microsoft Office 2010).

En los experimentos de conectividad funcional se promediaron para cada animal las 10 respuestas registradas para cada intensidad. La respuesta media para cada intensidad fue obtenida como el promedio de todos los animales de cada grupo experimental.

En los experimentos de plasticidad los valores individuales fueron normalizados al valor medio de la línea de base. Luego, cada respuesta evocada fue promediada cada 6 minutos (18 muestras). Los datos fueron expresados como porcentaje de la línea de base por experimento. Los valores individuales de cada animal fueron promediados en cada uno de los grupos experimentales.

Estadística.

Se utilizaron los programas Statistica (StatSoft Ltd.) y/o Prism 6 (GraphPad Software). En todos los casos, los datos son expresados como la media $\pm$ SEM. Se utilizaron Análisis de la Varianza (ANOVA) de dos vías y se realizó el test post hoc Newman Keuls cuando fue necesario. Para evaluar el porcentaje de neuronas enganchadas con ritmos se utilizaron tests de χ^2 . Para comparación de las curvas IR se utilizó el ajuste por cuadrados mínimos a la Sigmoidal de Boltzmann, seguida de un ANOVA de medidas repetidas para medir significancia.

Histología *post-mórtem* para comprobar la posición de los electrodos.

Una vez finalizado cada experimento se extrajo el cerebro de los animales y se lo colocó en una solución de paraformaldehído 4% en buffer PBS pH7.4 a 4°C durante más de un día. Transcurrido ese tiempo los cerebros fueron lavados en PBS, criopreservados en 30% sacarosa en PBS y seccionados en rodajas de 50µm de espesor con un micrótomos Leica SM2010R con platina refrigerada y montados en portaobjetos. Los cortes montados fueron sometidos posteriormente a un protocolo de tinción de Nissl con Safranina “O” como se explica en el anexo (Protocolo 4) para mejor visualización de los trazos y las estructuras cerebrales. La posición de los electrodos en los cortes fue reconstruida (Figura MyM6) siguiendo el atlas de cerebro de ratón C57BL/6J (K. Franklin 2012).

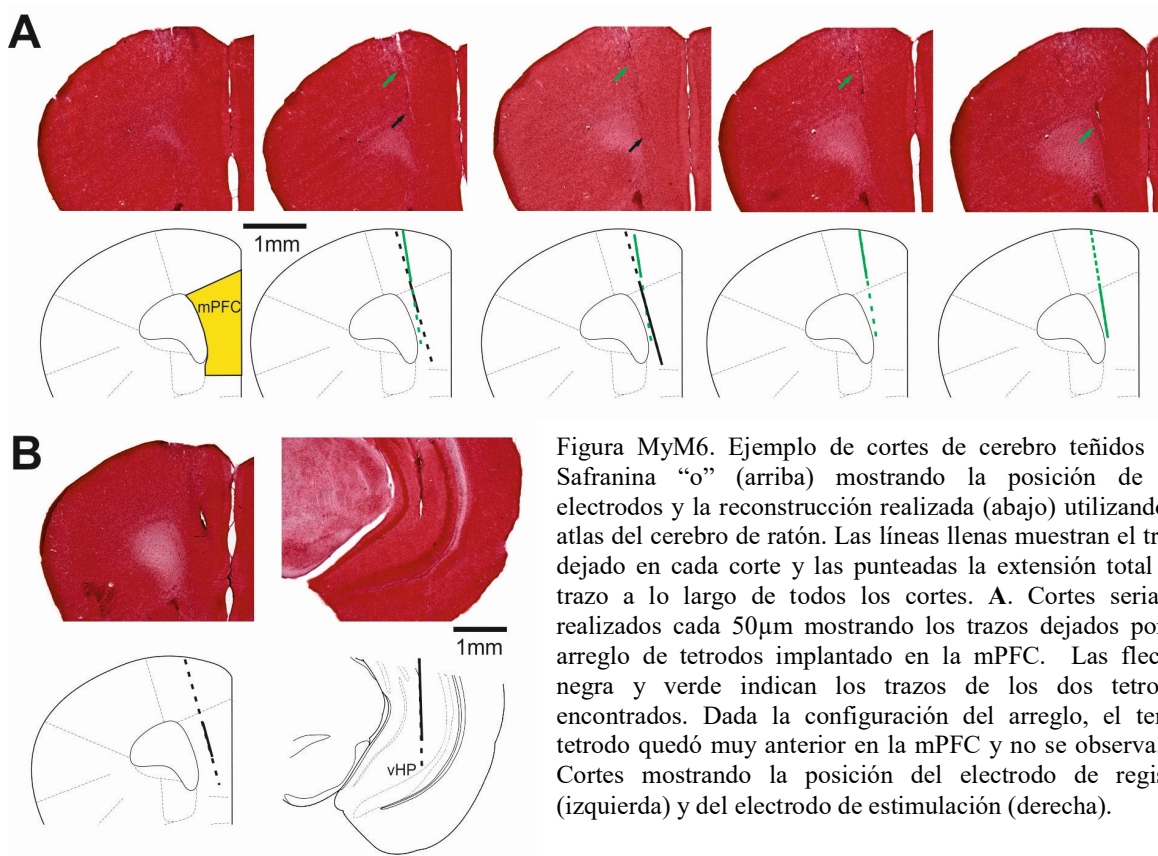


Figura MyM6. Ejemplo de cortes de cerebro teñidos con Safranina “o” (arriba) mostrando la posición de los electrodos y la reconstrucción realizada (abajo) utilizando el atlas del cerebro de ratón. Las líneas llenas muestran el trazo dejado en cada corte y las punteadas la extensión total del trazo a lo largo de todos los cortes. **A.** Cortes seriados realizados cada 50µm mostrando los trazos dejados por el arreglo de tetrodos implantado en la mPFC. Las flechas negra y verde indican los trazos de los dos tetrodos encontrados. Dada la configuración del arreglo, el tercer tetrodo quedó muy anterior en la mPFC y no se observa. **B.** Cortes mostrando la posición del electrodo de registro (izquierda) y del electrodo de estimulación (derecha).

RESULTADOS

El modelo de esquizofrenia utilizado en nuestro laboratorio requiere de la interacción de la mutación con algún componente del desarrollo durante la adolescencia para la aparición de los fenotipos conductuales. Si bien tanto los animales juveniles como los adultos carecen de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA funcionales en la mayoría de las interneuronas PV+ del sistema córtico-límbico, sólo estos últimos presentan fenotipos compatibles con esquizofrenia. Para dilucidar por qué los fenotipos aparecen únicamente luego del transcurso de la adolescencia, se dividió a los ratones en juveniles (28 a 31 días de edad) y adultos (3 a 4 meses de edad), se los anestesió con uretano y se los colocó en el marco estereotáxico para evaluar distintos parámetros electrofisiológicos *in vivo* bajo la hipótesis de que la interacción entre el genotipo y el transcurso de la adolescencia produce cambios en el sistema que pueden explicar la aparición de los fenotipos conductuales. Para los objetivos 1 y 2, que involucran registros de la actividad de neuronas individuales, se realizaron registros de actividad unitaria *in vivo* mediante tetrodos. La ablación del NMDAR se lleva a cabo únicamente en las interneuronas, por lo que se evaluó por un lado cómo se encuentran los parámetros electrofisiológicos medidos en las mismas en los animales KO y, por el otro, cómo impacta la alteración en el otro tipo principal de neurona cortical, las células piramidales. La verificación histológica realizada luego de cada experimento permitió seleccionar para el análisis exclusivamente aquellos casos en que la ubicación de los tetrodos y los electrodos bipolares utilizados para registrar el LFP correspondía con los lugares esperados (Figura R1).

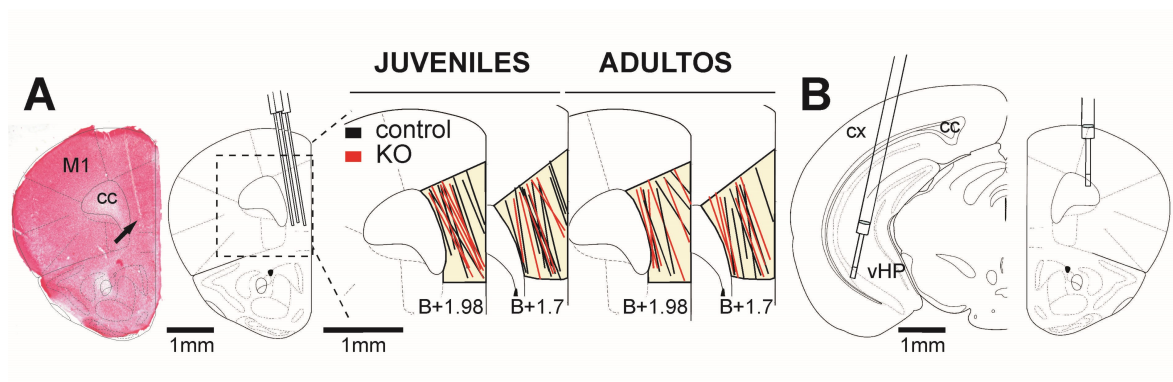


Figura R1. Posición de los electrodos en los experimentos con tetrodos. **A.** Izquierda. Tinción de Nissl de un corte coronal de cerebro de ratón mostrando el trazo dejado por un tetrodo colocado en la mPFC. Derecha. Esquema del corte mostrando la posición en la que se implantaron los tetrodos y los trazos dejados por los tetrodos en todos los experimentos realizados. Sombreado amarillo: mPFC, las líneas corresponden al trayecto de los tetrodos desde la posición aproximada de inicio de registro hasta la posición en la que se dejó de registrar. **B:** Posición del electrodo con respecto a Bregma. **B.** Esquema mostrando la posición del electrodo bipolar implantado en el vHP y el electrodo bipolar implantado en corteza motora.

Aquellos experimentos en los que la posición de los electrodos no fue la correcta fueron excluidos del análisis que se presenta a continuación. Para el caso particular de los tetrodos, con los que se realizó un muestreo en distintas posiciones dentro de la mPFC, si una o más alturas de registro no correspondía a la mPFC estas fueron descartadas para el análisis, manteniendo únicamente los sitios en las que se registró la actividad neuronal dentro de la mPFC.

El análisis utilizando el software desarrollado por el laboratorio de Buzsaki (Hazan et al. 2006) nos permitió clasificar las espigas registradas por los tetrodos y asignarlas a cada una de las unidades aisladas (*single unit*, Figura R2a). Para ello debían satisfacer el criterio de presentar un período refractario (frecuencia menor a la esperada por el azar por al menos 2 ms luego de la espiga) como se observa en los autocorrelogramas representativos en la Figura R2b.

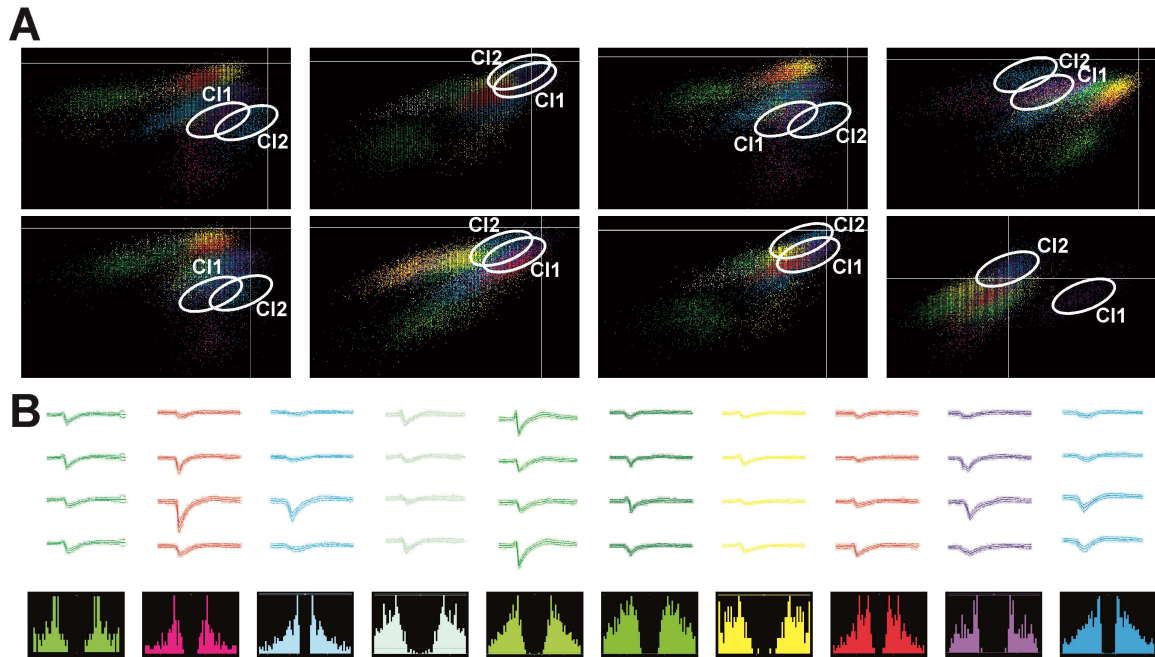


Figura R2. Clasificación de espigas registradas por un tetrodo a una altura determinada en un experimento ejemplo. **A.** Clusters (nubes de puntos de un mismo color) correspondientes a todos los disparos de una misma neurona a lo largo del registro. Cada cuadro muestra el mismo conjunto de neuronas graficadas en función de los distintos parámetros que mejor definen la forma de la espiga. Los círculos blancos destacan dos clusters (celeste y magenta) que aparecen juntos en los primeros siete gráficos pero que se separan al utilizar los parámetros que corresponden al último gráfico, permitiendo de esta manera definirlos como dos unidades diferentes. **B.** Arriba. Forma promedio de las espigas de cada una de las neuronas separadas en el punto A. Abajo. Autocorrelogramas de cada una de las neuronas separadas en el punto A mostrando un claro período refractario.

Por otro lado, la utilización de los parámetros A y B (Figura R3a), concernientes a la forma de la espiga, resultó eficiente a la hora de permitir diferenciar los clusters provenientes de las células piramidales de aquellas provenientes de las interneuronas, como ya se había sido descrito previamente (Bartho et al. 2004). La Figura R3b muestra la aparición de dos grupos bien definidos al graficar los valores de estos dos parámetros para cada una de las unidades individualizadas en el análisis de clusters. Esto permitió clasificar las unidades en posibles interneuronas y piramidales como hiciéramos anteriormente (de Almeida et al. 2013). Los casos intermedios entre estos dos grupos fueron verificados caso a caso valiéndonos de otros

parámetros electrofisiológicos relativos a la forma de las espigas de cada uno de los tipos neuronales (Belforte et al. 2010). Consecuentemente, la forma de la espiga de promedio de las interneuronas es de menor duración que la de las piramidales y presenta una repolarización con pendiente decreciente (Figura R3a)

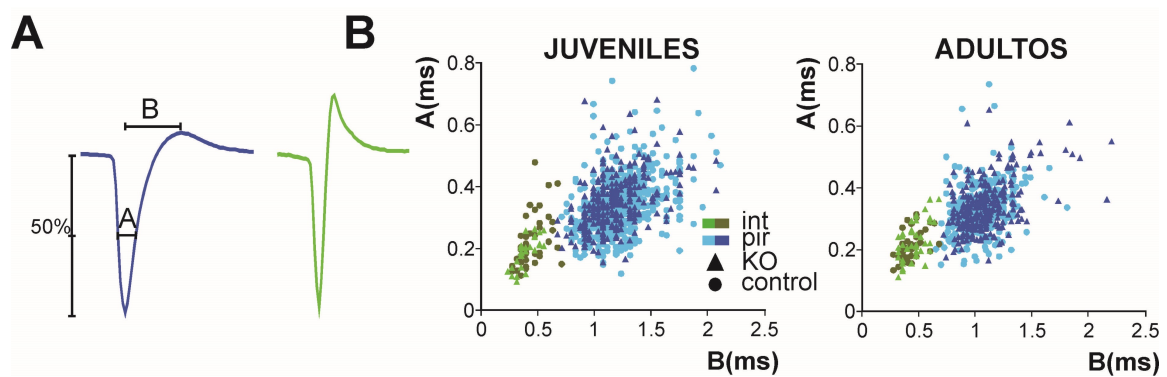


Figura R3. Clasificación en interneuronas y piramidales de las unidades registradas. **A.** Ejemplo de la forma promedio de las espigas de una neurona piramidal (azul) y una interneurona (verde) representativas, indicando los parámetros A y B que fueron utilizados para la clasificación de las mismas. **B.** Gráficos representando la parametrización de la forma promedio de cada una de las neuronas registradas en todos los experimentos utilizando los parámetros A y B. Tanto en juveniles como en adultos se observan dos poblaciones distintas que corresponden a los dos tipos neuronales. No se observaron diferencias ostensibles entre los grupos obtenidos de los animales controles y KO (círculos vs triángulos). N de neuronas piramidales de animales juveniles = 283 -605 neuronas de 7-11 animales, N de interneuronas de animales juveniles = 26 -44 neuronas de 7-11 animales, N de neuronas piramidales de animales adultos = 259 -319 neuronas de 6 animales, N de interneuronas de animales adultos = 37 - 41 neuronas de 6 animales.

Para cada altura en la mPFC de cada uno de los animales utilizados para estos experimentos se registraron al menos 30 minutos de actividad espontánea. La utilización de uretano como anestésico predispone, como ya se mencionó, la aparición de al menos dos estados de sincronización cortical diferentes. Como se esperaba, el patrón de actividad del ECoG presentó, durante buena parte del registro, ondas lentas de 0.5-2Hz, de gran amplitud con actividad unitaria sincrónica correspondientes al ritmo delta con baja presencia de ritmo theta

hipocampal. Este patrón se veía interrumpido por segmentos de actividad cortical desincronizada con presencia de un ritmo theta en el vHP (Figura R4) y predominio de oscilaciones de alta frecuencia. Las señales de LFP del vHP y de la corteza motora fueron utilizadas para clasificar dichos segmentos de actividad sincronizada y desincronizada como se explica en Materiales y Métodos. Se obtuvieron ventanas temporales con actividad desincronizada espontánea en el 91,3% de los casos, registrándose actividad neuronal en todos estos segmentos. La duración promedio de los segmentos desincronizados en animales juveniles fue de 160,5 s en controles y 396,9 s en KO, mientras que en animales adultos fue de 284,3 s en controles y 499,2 en KO, tiempos en todos los casos suficientes para realizar una correcta estimación de la frecuencia media y el enganche de fase.

Se observó que el patrón de actividad de las neuronas fluctuaba dependiendo del estado de actividad cortical en el que se encuentra el animal. Mientras que las neuronas presentan un patrón de espigas estereotipado durante el estadio sincronizado, con espigas concentradas en la fase superior de la onda delta, durante los estadios desincronizados las espigas se enganchan temporariamente con el ritmo local gamma y forman ensambles transitorios entre pares de unidades (Figura R4). Todo nuestro análisis sobre la actividad neuronal registrada mediante tetrodos se realizó durante las ventanas temporales de actividad desincronizada, ya que este estadio se asemeja más al estado funcional de la corteza durante la vigilia. Además, las ondas theta y gamma, que son de relevancia en el trabajo, se encuentran presentes de manera más marcada en este estadio.

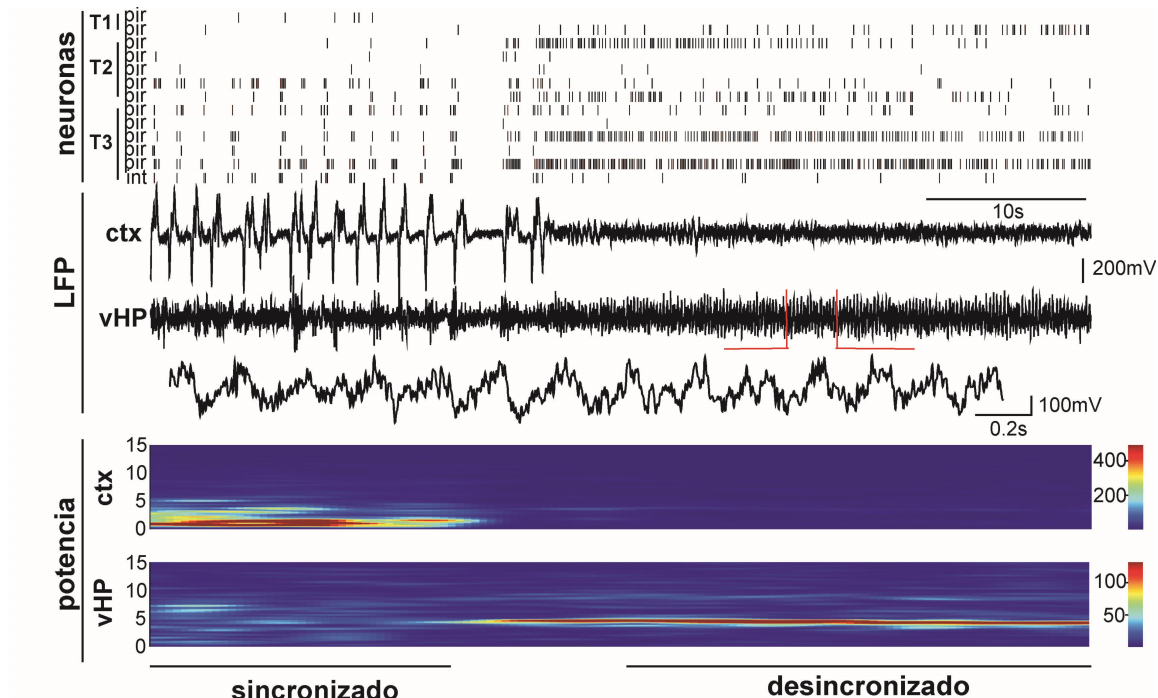


Figura R4. Ejemplo representativo del registro electrofisiológico junto con parte del análisis realizado. Se muestran los trazos electrofisiológicos crudos para 60 segundos de registro. En esta ventana temporal puede observarse una transición espontánea de estado, en la cual el animal pasó de un estado sincronizado inicial a un estado desincronizado. Arriba. Momentos de ocurrencia de las espigas de 13 neuronas extraídas de los 3 tetrodos implantados en la mPFC, 12 de ellas piramidales y una interneurona. Cada fila muestra la actividad de una de estas neuronas a lo largo del tiempo, cada barra vertical representa la ocurrencia de una espiga (*raster plot*). Centro. Registros de LFP realizados con los electros bipolares en la corteza motora contralateral y en el hipocampo ventral, respectivamente. En la ampliación pueden verse en detalle las ondas theta, de 4Hz de frecuencia que predominan durante la desincronización. Abajo. Espectros de potencia de cada una de las bandas del registro cortical e hipocampal a lo largo del tiempo para este ejemplo, en las cuales se observa el claro dominio de la banda frecuencial delta en la corteza durante el estadio sincronizado (con ausencia casi completa de oscilación theta hipocampal) y el desarrollo de la oscilación theta en el hipocampo durante la desincronización.

La frecuencia media de disparo de las neuronas de la mPFC se encuentra aumentada en los animales KO tanto juveniles como adultos.

Como hemos visto, la regulación de la actividad de las neuronas piramidales es una de las funciones principales de las interneuronas corticales. En relación al objetivo específico número 1 evaluamos la actividad espontánea de unidades electrofisiológicamente aisladas registradas

extracelularmente en la mPFC en animales KO y controles, tomando como parámetro de actividad la frecuencia media de disparo. Se registró la actividad de un total de 1458 neuronas, de las cuales un 9,4% fueron interneuronas y el resto células piramidales. Se obtuvieron en promedio 5,23 neuronas por tetrodo que cumplieron con los criterios de clasificación en animales juveniles y 5,98 neuronas en animales adultos. En animales juveniles se registraron un total de 785 células piramidales (539 en controles y 246 en KOs de 7-11 animales por genotipo) y 536 en adultos (294 en controles y 242 en KOs a partir de 6 animales por genotipo). Para el caso de las interneuronas, se registraron un total de 62 células en juveniles (40 en controles y 22 en KOs 7-11 de animales por grupo) y 75 en adultos (36 en controles y 39 en KOs de 6 animales). En el análisis global de la distribución de frecuencias se observó un corrimiento en las frecuencias de disparo hacia valores más altos en los animales KO, tanto juveniles como adultos (Figura R5a). Además, el análisis mostró un aumento, para ambos tipos neuronales, en la frecuencia media de disparo en los animales KO en relación a los controles (Figura R5b), sin que el análisis estadístico indique una interacción significativa entre el desarrollo y la manipulación génica.

Estos resultados muestran que el aumento en la frecuencia de disparo viene dado por la ablación del NMDAR en las interneuronas independientemente de los cambios del neurodesarrollo que ocurren durante la adolescencia. Por lo tanto, esta alteración no puede ser por si solo la base fisiopatológica subyacente a la aparición del fenotipo conductual que se manifiesta luego de transcurrida la adolescencia en nuestro modelo.

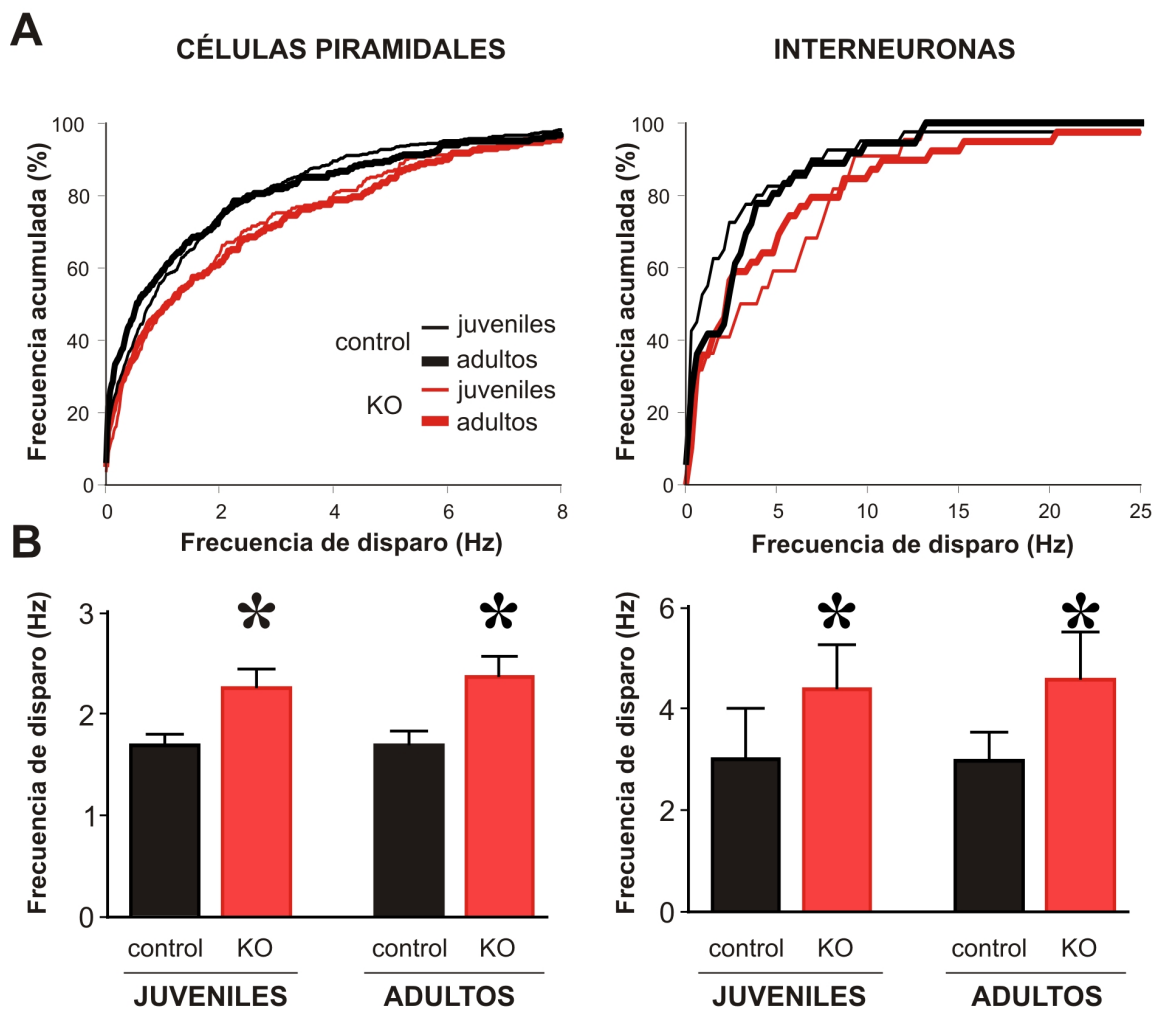


Figura R5. Frecuencia de disparo de las interneuronas y las neuronas piramidales de la mPFC. **A.** Gráfico de frecuencia acumulada de las interneuronas y células piramidales calculada durante los periodos de desincronización. Las frecuencias de disparo altas se encuentran más representadas en los animales KO comparados con los controles. **B.** Frecuencia de disparo promedio de las interneuronas y células piramidales durante los periodos de desincronización. La frecuencia de disparo se encuentra aumentada en animales KO para ambos tipos neuronales independientemente de la edad de los animales. Cada barra representa la media $\pm$ SEM de la frecuencia de disparo para todas las neuronas registradas en cada grupo experimental. Para células piramidales, ANOVA de medias repetidas, interacción genotipo X edad NS, factor genotipo $F_{1,1317} = 16,0$ $p < 0,0001$. Para interneuronas, ANOVA de medias repetidas, interacción genotipo X edad NS, factor genotipo $F_{1,132} = 6,73$ $p < 0,01$. N de neuronas piramidales de animales juveniles = 246 -539 neuronas de 7-11 animales (control y KO respectivamente), N de interneuronas de animales juveniles = 22 -40 neuronas de 7-11 animales (control y KO respectivamente), N de neuronas piramidales de animales adultos = 242 -294 neuronas (control y KO) de 6 animales por grupo, N de interneuronas de animales adultos = 36 - 39 neuronas (control y KO) de 6 animales.

Otro parámetro que podría verse alterado en los KOs es el balance excitación/inhibición. Este balance mantiene a las neuronas en un estado de depolarización dinámica que puede conferir ventajas en la capacidad de computar información tanto a través de la probabilidad de disparo como de la temporalidad de las espigas (Hô & Destexhe 2000; Shu et al. 2003; Hasenstaub et al. 2005). A nivel celular, tanto para las células piramidales como para las interneuronas, el balance excitación/inhibición viene dado por la contribución de los potenciales post-sinápticos excitatorios e inhibitorios (PEPs y PIPs), los cuales determinan la frecuencia de disparo de la neurona. A nivel del sistema, la razón entre la frecuencia de disparo de las células piramidales excitatorias y la frecuencia de disparo de las interneuronas inhibitorias es un indicativo del balance excitación/inhibición en una determinada estructura. El balance excitación/inhibición juega un rol en la capacidad de procesamiento de estas estructuras, y alteraciones en el mismo son el sustrato de algunos déficits sociales que son el núcleo de enfermedades psiquiátricas como el autismo o la esquizofrenia (Chao et al. 2010; Oblak et al. 2011; Takahashi et al. 2013). El hecho de que tanto el componente excitatorio (frecuencia de disparo de las neuronas piramidales) como el inhibitorio (frecuencia de disparo de las interneuronas) se encuentran similarmente aumentados en los animales KO, podría sugerir que el balance entre excitación/inhibición a nivel del sistema es similar al de los animales control. Sin embargo experimentos en curso realizando *patch in vivo* proveerán una respuesta más clara al respecto.

Las neuronas piramidales se encuentran menos sincronizadas con ritmos generados local y distalmente en los animales KO independientemente de la edad.

Otra de las funciones de las interneuronas es regular la temporalidad o momento de ocurrencia de las espigas de la red neuronal en relación a la actividad de otras neuronas locales y aferencias distales. Las neuronas corticales se encuentran normalmente sincronizadas con varios ritmos y se ha propuesto que dicho enganche de fase (*phase locking* en inglés) es relevante en cuanto al contenido de información del sistema. Por ejemplo, déficits en el enganche de fase neuronal han sido vinculados con desordenes en el control cognitivo y la percepción en esquizofrenia (Spencer et al. 2004; Cho et al. 2006). La ablación del NMDAR en las interneuronas podría desregular el tiempo de ocurrencia de las espigas de las neuronas, afectando el grado de sincronización con diferentes ritmos e impactando en la capacidad del sistema cortical para codificar información. En relación con el objetivo específico número 2, evaluamos el grado de enganche de fase de las neuronas de la mPFC con un ritmo que se genera distalmente en el hipocampo y es conducido a la mPFC mediante las conexiones sinápticas existentes entre estas dos estructuras y otro generado localmente en la mPFC. Estos ritmos son el ritmo theta hipocampal y el ritmo gamma cortical, respectivamente.

Debido a que ambos ritmos son preponderantes durante el estado desincronizado en la actividad cortical, utilizamos únicamente estos segmentos de actividad desincronizada espontánea para el análisis. El test de Rayleigh se utiliza para medir uniformidad en una distribución circular. El estadístico p de Rayleigh significativo indica que la distribución de las frecuencias de disparo no es uniformemente circular, es decir, que la neurona dispara en una

fase preferencial de la onda. Se consideraron sincronizadas (o enganchadas) a las neuronas con un p de Rayleigh < 0.05 que presentaron más de 50 espigas a lo largo de las fases desincronizadas del registro, como se explica en Materiales y Métodos.

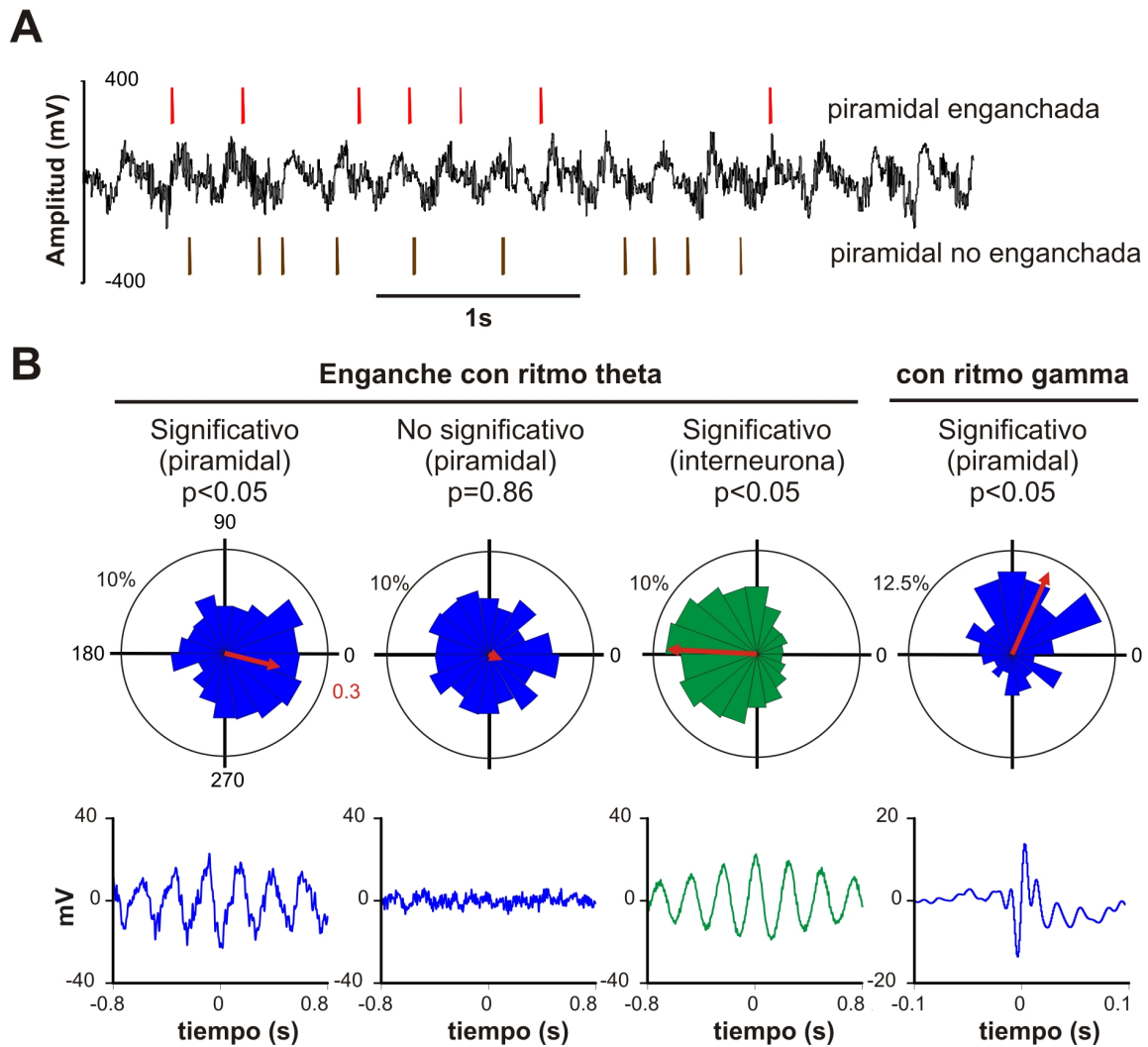


Figura R6. Ejemplos de neuronas sincronizadas y no sincronizadas con diferentes oscilaciones del potencial de campo local (LFP). **A.** Registro de LFP en vHP en el que se observa el ritmo theta superpuesto con espigas de una neurona piramidal enganchada (arriba) y una no enganchada (abajo). **B.** Arriba. Ejemplos representativos de rosetas mostrando el porcentaje de espigas de una neurona en función de la fase de la onda. La flecha roja corresponde a la suma vectorial de las barras. La dirección de la flecha marca la fase preferencial de la neurona y el módulo es una medida del grado de enganche. Las rosetas azules de la izquierda corresponden a las dos células piramidales mostradas en A, la verde a una interneurona enganchada con theta registrado en vHP y la azul de la derecha a una célula piramidal enganchada con gamma registrado en la mPFC. Abajo. Resultados de la promediación del LFP sincronizada por espigas (*spike triggered average*) para cada una de estas cuatro neuronas. Puede observarse que las neuronas que se encuentran enganchadas en una determinada fase reproducen la forma de la onda circundante mientras ésta no se manifiesta en la neurona no enganchada. Azul: células piramidales, verde: interneuronas.

Todas las neuronas clasificadas de esta manera como "sincronizadas" mostraron actividad preferencial en una determinada fase de la onda con la cual se compararon (Figura R6a). Para estas neuronas, las rosetas de distribución de frecuencias de disparo (Figura R6b) mostraron una distribución asimétrica y, consecuentemente, un módulo de enganche alto (flecha roja), lo que indica una preferencia de disparo en una fase determinada de la onda. La promediación del LFP sincronizada a la espiga (*spike triggered average*) muestra el promedio de todos los registros de LFP circundantes a cada una de las espigas de una neurona en particular. Este análisis permitió reconstruir la onda con la que se encuentra sincronizada cada neurona, demostrando que la sincronización ocurre con una onda real y no artefactual, ya que la misma puede ser rescatada de la señal cruda de LFP al realizar el *spike triggered average*. Debido a que aquellas neuronas que no están sincronizadas disparan en fases azarosas, la señal circundante se diluye al realizarse el promedio (Figura R6b).

Los módulos del enganche de fase individual de cada neurona fueron utilizados para obtener valores poblacionales de todas las neuronas que fueron clasificadas como sincronizadas. Estos mostraron una disminución en los promedios para los animales KO para ambos tipos neuronales respecto al ritmo theta, tanto para juveniles como para adultos (Figura R7). En otras palabras, las neuronas se encuentran menos sincronizadas con este ritmo en los animales KO independientemente de la edad, ya que el factor interacción en el ANOVA de dos vías no fue significativo (Figura R7 arriba). En el caso del ritmo gamma, se observa el mismo resultado únicamente en neuronas piramidales y no en interneuronas (Figura R7 abajo).

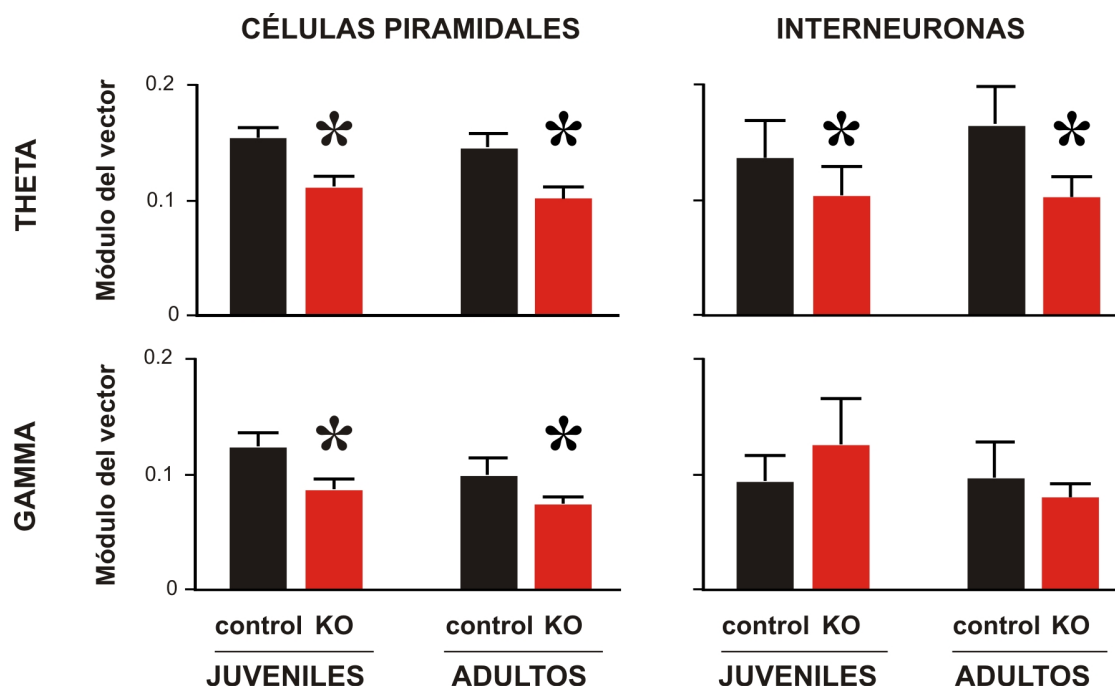


Figura R7. Enganche de fase de las neuronas piramidales y las interneuronas de la mPFC con ritmos generados local y distalmente. Cada barra representa la media $\pm$ SEM del módulo de enganche de todas las neuronas que cumplieron el criterio para considerarse sincronizadas (número de espigas > 50 , p Rayleigh $< 0,05$) para cada grupo experimental. El módulo es menor en los animales KO en ambos tipos celulares para el ritmo theta y en células piramidales para el ritmo gamma independientemente de la edad de los animales. En cada caso se computó un ANOVA de dos vías (con factores edad y genotipo). En los cuatro casos la interacción genotipo X edad resultó no significativa. Para células piramidales: theta, factor genotipo $F_{1,389} = 31,7^* p < 0,0001$; gamma, factor genotipo $F_{1,240} = 16,3^* p < 0,0001$. Para interneuronas: theta, factor genotipo $F_{1,40} = 31,7^* p < 0,02$; gamma, factor genotipo $F_{1,44} = 0,18 p = 0,66$. N de neuronas piramidales en animales juveniles = 68 -136 neuronas de 7-11 animales, N de interneuronas en animales juveniles = 10-12 neuronas de 7-11 animales, N de neuronas piramidales en animales adultos = 47-90 neuronas de 6 animales, N de interneuronas en animales adultos = 12-22 neuronas de 6 animales.

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de neuronas con enganche de fase significativo, según su p de Rayleigh, para cada tratamiento. A pesar de que el grado de sincronización es menor, el número de células piramidales que se encuentran sincronizadas con ambos ritmos es levemente mayor en los animales KO juveniles, lo cual puede deberse a la ocurrencia de algún fenómeno compensatorio que busca contrarrestar la pérdida de sincronización.

Edad	Genotipo	Nº de neuronas sincronizadas con theta	p (Chi²)	Nº de neuronas sincronizadas con gamma	p (Chi²)
CÉLULAS PIRAMIDALES					
JUVENILES	control	136 / 365 (37%)	0.017	71 / 365 (19%)	0.0001
	KO	92 / 193 (48%)		68 / 193 (35%)	
ADULTOS	control	75 / 174 (43%)	0.315	47 / 174 (27%)	0.926
	KO	90 / 186 (48%)		58 / 186 (31%)	
INTERNEURONAS					
JUVENILES	control	11 / 20 (55%)	0.394	10 / 20 (50%)	0.377
	KO	12 / 29 (41%)		10 / 29 (34%)	
ADULTOS	control	22 / 37 (59%)	0.606	16 / 37 (43%)	0.797
	KO	19 / 28 (68%)		12 / 28 (43%)	

Tabla 1. Porcentaje de neuronas enganchadas con los ritmos theta y gamma

De acuerdo a los resultados obtenidos, la ablación del NMDAR en interneuronas genera una disminución en el enganche de fase de la red neuronal de la mPFC con respecto al ritmo theta proveniente del hipocampo y al ritmo gamma generado localmente. Sin embargo, la alteración se observa no solo en los animales adultos sino también en los juveniles, por lo que tampoco explica por qué el fenotipo conductual emerge luego del transcurso de la adolescencia.

Ya que las interneuronas juegan un rol en la generación y en la regulación de los ritmos corticales, nos cercioramos que la potencia de los ritmos theta y gamma no se encuentre alterada en los animales KO debido a la falta de NMDAR funcionales en interneuronas. No se encontraron diferencias significativas en el perfil de potencias de los LFP registrados en el hipocampo y en la corteza entre ratones KO y control durante los periodos desincronizados, tanto para animales juveniles como adultos (Figura R8). Por lo tanto, las diferencias observadas en la sincronización con ondas se deben a déficits en el rol de las interneuronas como

reguladoras del tiempo de ocurrencia de las espigas y no a una disminución en la potencia de estos ritmos.

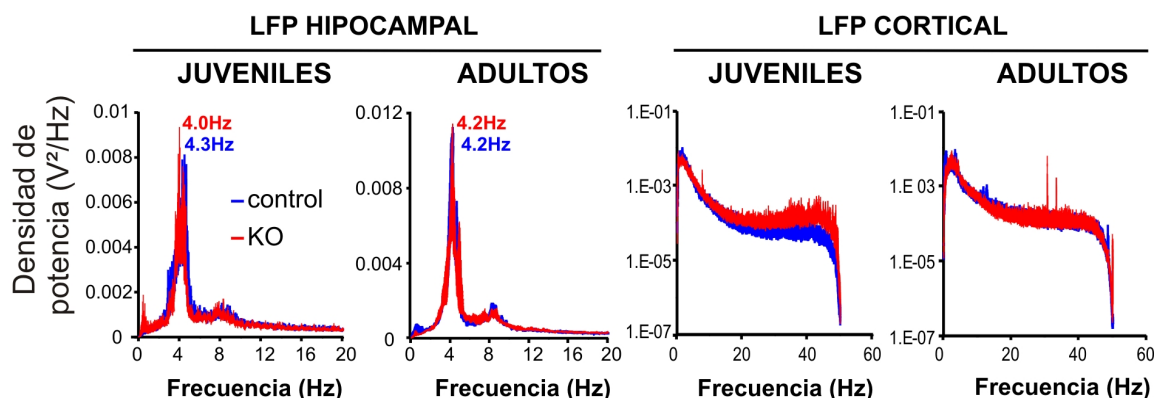


Figura R8. Espectros de potencia de los LFP hipocámpales y corticales en donde se observan los ritmos theta y gamma en los periodos utilizados para el análisis. En cada gráfico se presenta la densidad de potencia (*power density*) como porcentaje de la potencia total para cada espectro calculado para los LFPs registrados en el vHP o la corteza durante los estadios desincronizados. Cada espectro corresponde al promedio de los espectros individuales obtenidos para cada uno de los sitios de registro utilizados en la figura anterior. No se encontraron diferencias significativas entre genotipos para la potencia de la banda theta hipocámpal y el gamma cortical. ANOVA de dos vías.

Sólo los ratones KO adultos muestran una disminución en la conectividad funcional de la vía vHP-mPFC.

Otra de las funciones de las interneuronas es regular el desarrollo de diversas estructuras cerebrales. Como se describe en la Introducción, la correcta actividad de diversas áreas corticales depende de cambios plásticos que ocurren durante determinadas etapas del desarrollo, entre ellas la adolescencia, y que, en parte, son mediados por la actividad de las interneuronas. De esta manera, la conectividad local y distal puede sufrir alteraciones funcionales durante el desarrollo postnatal de manera dependiente de la inhibición GABAérgica. Acorde al objetivo número 3, buscamos analizar la respuesta de la mPFC ante estímulos

provenientes de otra estructura cerebral, como una medida de la conectividad funcional entre ambas. Escogimos estudiar la conectividad funcional de la vía Hipocampo ventral-Corteza Prefrontal media (vHP-mPFC) por diversas razones. En primer lugar, la conectividad entre estas dos estructuras se encuentra disminuida en los pacientes con esquizofrenia (Zhou et al. 2008; Wolf et al. 2009). La inhibición optogenética de la vía produce déficits en la memoria de trabajo, uno de los síntomas de esquizofrenia (Spellman et al. 2015). El PCP, que desencadena un cuadro conductual compatible con esquizofrenia, produce un aumento en la frecuencia de disparo de la mPFC que podría subyacer las anormalidades conductuales, actuando mediante la vía vHP-mPFC (Jodo 2004). El ritmo theta, cuyo impacto sobre la actividad neuronal de la mPFC fue estudiado en el punto anterior, es generado en esta estructura. Además esta vía completa su refinamiento madurativo final durante la adolescencia. La elección de esta vía ofrece también ventajas prácticas a la hora de realizar los experimentos: se trata de una conexión monosináptica, que genera una respuesta estereotipada de corta latencia y unidireccional, lo que nos asegura que las espigas evocadas en la mPFC son ortodrómicas (Jay & Witter 1991; Hoover & Vertes 2007).

Para medir la respuesta evocada en la mPFC ante la estimulación del vHP se implantó un electrodo de estimulación en el vHP de ratones control y KO, juveniles y adultos, y un electrodo de registro en la mPFC. La reconstrucción post-mortem de los trazos dejados por esos electrodos se muestran en la figura R9 confirmando la correcta localización de los mismos en las estructuras blanco.

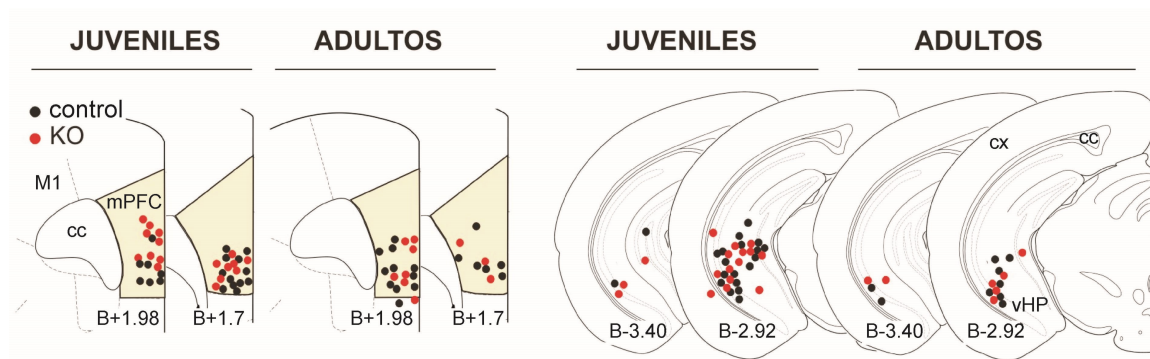


Figura R9. Posición de los electrodos en los experimentos de respuesta evocada. Izquierda. Esquema del cerebro mostrando las posiciones de las puntas de los electrodos de registro implantados en la mPFC obtenidas a partir de las reconstrucciones histológicas. Amarillo: mPFC. Derecha. Esquema mostrando la s posiciones de las puntas de los electrodos de estimulación implantados en el vHP. B: bregma, indica la posición del electrodo con respecto a Bregma.

La estimulación en el vHP generó una respuesta estereotipada con una latencia de aproximadamente 15ms cuya amplitud depende de la intensidad de estimulación (Figura R10a).

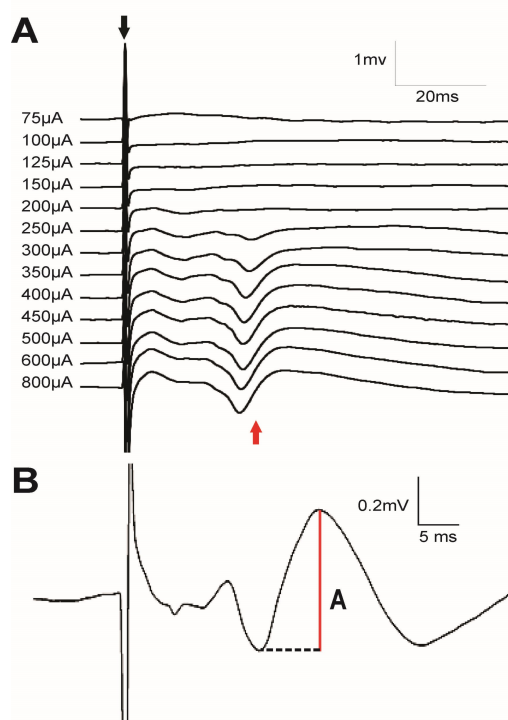


Figura R10. Respuesta evocada en la mPFC ante intensidades crecientes de estimulación en el vHP. **A.** Ejemplo representativo de un experimento mostrando las respuestas evocadas en la mPFC ante intensidades de estimulación crecientes en el vHP. Cada trazo corresponde al promedio de 8 curvas evocadas a una misma intensidad. Flecha negra: artefacto generado por la estimulación del vHP. Flecha roja: respuesta evocada en la mPFC **B.** Respuesta evocada de latencia corta (~15ms) medida en la mPFC. La amplitud pico a pico de la respuesta evocada (A) fue cuantificada ensayo a ensayo.

Esta respuesta es compatible con la respuesta monosináptica esperada de acuerdo a la literatura (Takita et al. 1999; Cass et al. 2014). Se estimuló el vHP a intensidades crecientes (de 50 μ A a 800 μ A) y se midió la amplitud promedio de la respuesta evocada en la mPFC para cada intensidad de estimulación. Se cuantificó la amplitud de la respuesta evocada (parámetro “A”, Figura R10b) a distintas intensidades de estimulación como una medida de la conectividad funcional de la vía.

Se observó que la respuesta evocada a se encuentra disminuida en los animales KO adultos con respecto a los controles. Sin embargo, no se observaron diferencias entre las curvas de respuesta de los ratones control y KO juveniles (Figura R11a). Por lo tanto, la conectividad funcional de la vía vHP-mPFC se encuentra disminuida en los animales KO exclusivamente en la etapa adulta. Esta alteración, que ocurre únicamente en adultos, puede explicar la aparición del fenotipo conductual que presenta nuestro modelo luego del traspaso por la adolescencia. La cuantificación de la amplitud de la respuesta para cada experimento mostró, además de las diferencias ya señaladas, una disminución significativa al comparar los animales control juveniles con los adultos. Esto podría deberse al fenómeno de podado sináptico que ocurre normalmente durante la adolescencia y que involucra una disminución en el conexionado de la mPFC, como se comentó en la Introducción (Figura R11b).

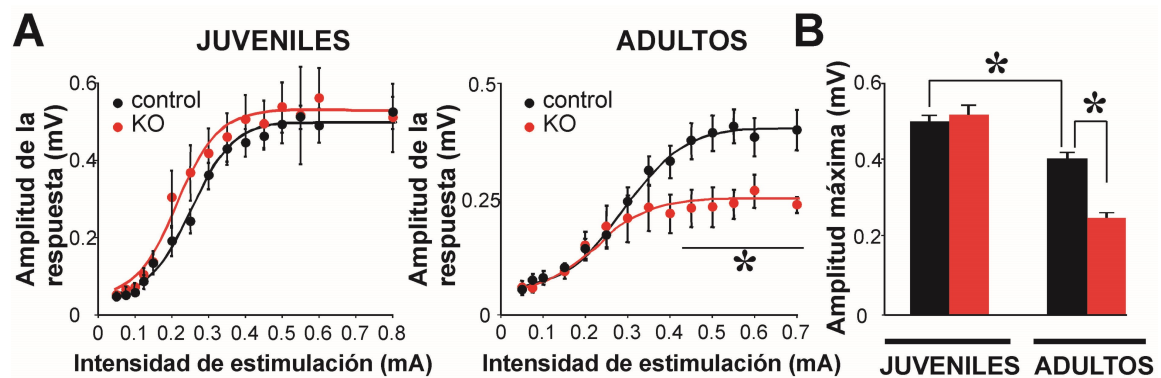


Figura R11. Conectividad funcional de la vía vHP-mPFC. **A.** Amplitud de la respuesta evocada en mPFC ante diferentes intensidades de estimulación en el vHP. Cada punto representa la media $\pm$ SEM de N animales. Trazo continuo: ajuste a una sigmoide de Boltzmann. La respuesta evocada a altas intensidades de estimulación se encuentra disminuida en animales KO adultos. Ajustes por cuadrados mínimos a la sigmoide de Boltzmann $p < 0,0001$ en todos los casos. Para juveniles ANOVA de medias repetidas, interacción NS. Para adultos ANOVA de medias repetidas, interacción genotipo X intensidad $F_{12,312} = 3.12$ $p < 0.0005$; * $p < 0.05$ Newman Keuls post hoc test vs control de intensidad correspondiente. N de animales juveniles control = 20, N de animales juveniles KO = 17, N de animales adultos control = 17, N de animales adultos KO = 10. **B.** Comparación entre la amplitud máxima de la respuesta evocada para las curvas ajustadas en el punto A. Cada barra representa la media $\pm$ SEM de N animales mostrados en A. ANOVA de dos vías, interacción genotipo X edad $F_{1,60} = 5,44$ $p < 0.05$; * $p < 0,05$ Newman Keuls post hoc test.

El LTD se encuentra exacerbado en ratones KO adultos pero no en los juveniles.

Debido a que ciertos fenómenos de plasticidad dependen de la actividad de las interneuronas durante determinados periodos (ver Introducción), y buscando un posible mecanismo que explique la disminución en la conectividad funcional de la vía vHP-mPFC, evaluamos la susceptibilidad de la vía a sufrir LTD. Para hacerlo, utilizamos el electrodo implantado en el vHP para aplicar protocolos de LFS y registramos la amplitud de la respuesta evocada en la mPFC antes y después de la inducción de la depotenciación de la vía. Al buscar en bibliografía, encontramos pocos trabajos en los que el LTD fuera inducido con éxito en la vía de interés *in vivo*. De hecho, protocolos con los que se obtuvo una depotenciación en algunos trabajos (Lopes-Aguiar et al. 2013), no lograron inducir LTD en otros (Doyle et al. 1997), no siendo reproducibles en nuestro laboratorio. Basados en estos trabajos calibramos la cantidad de

pulsos estímulos y logramos establecer un protocolo que induce depotenciación de largo plazo de manera reproducible. El protocolo de LTD seleccionado indujo una depotenciación de la respuesta hasta alrededor del 50% de la amplitud original. Esta respuesta continúa disminuida al menos por 1 hora y se considera una depotenciación de largo término (Figura R12a).

Para evaluar la dinámica de la depotenciación y la amplitud mínima hasta la que es posible depotenciar la respuesta se aplicaron protocolos sucesivos de LFS y se midió la amplitud de la respuesta mediante pulsos test aplicados durante 30 min en los periodos entre protocolos en animales control y KO, juveniles y adultos. La respuesta promedio se encontró totalmente depotenciada luego de la aplicación de cuatro protocolos de LFS para todos los genotipos y edades (Figura R12b). Dado que el protocolo indujo en algunos casos, además del LTD, una depotenciación de corto término (STD, por sus siglas en inglés) la cuantificación de los efectos a largo plazo se realizó sobre los últimos dos puntos (es decir, los dos puntos previos a una nueva aplicación del protocolo de LFS), en los que el fenómeno de STD ya no se encuentra presente (Figura R12b). En animales juveniles, se observó que la vía es igualmente susceptible de ser depotenciada para ambos genotipos, y que la dinámica de depotenciación es la misma. Para el caso de los adultos, la vía resultó ser más susceptible de ser depotenciada en los animales KO (Figura R12b y c). Esta mayor susceptibilidad a sufrir LTD en etapas tardías del desarrollo podría ser el mecanismo que explique por qué se observa una menor conectividad funcional de la vía vHP-mPFC en los animales adultos KO.

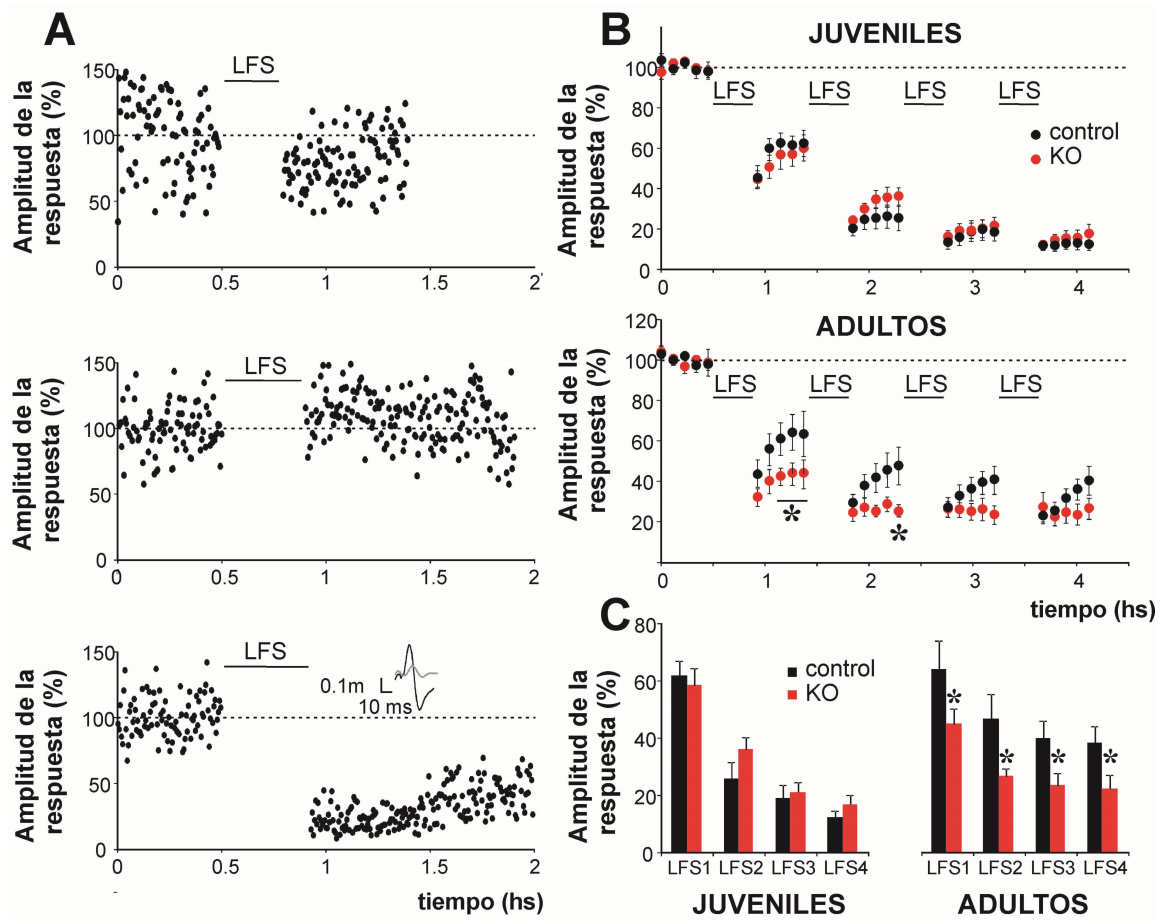


Figura R12. Susceptibilidad de la vía vHP-mPFC a experimentar cambios plásticos. **A.** Calibración del protocolo utilizado para inducir LTD. Amplitud de la respuesta evocada por pulsos de testeo antes y después de la aplicación de 900 (arriba), 1200 (centro) y 1500 (abajo) trenes de estimulación de baja frecuencia (LFS). Sólo la aplicación del protocolo de 1500 trenes logró inducir una depotenciación de largo término (LTD) de la respuesta. Los trazos muestran la amplitud promedio de la respuesta evocada antes (negro) y después (gris) de la inducción de la plasticidad en el protocolo de 1500 trenes. **B.** Amplitud de la respuesta cuantificada en ratones sujetos a protocolos sucesivos de LFS. Los datos fueron promediados cada 20 respuestas para cada animal, cada punto representa la media $\pm$ SEM de n animales. El protocolo de LFS produce una disminución mayor en la amplitud de la respuesta en los animales adultos. Para juveniles ANOVA de medias repetidas, interacción genotipo X tiempo NS. Para adultos ANOVA de medias repetidas, interacción genotipo X tiempo $F_{24,216} = 1.94$ $p < 0.01$ para adultos. * $p < 0.05$ Newman Keuls post hoc test vs control al mismo tiempo. N de animales juveniles control = 10, N de animales juveniles KO = 8, N de animales adultos control = 6, N de animales adultos KO = 6. **C.** Cada barra representa la media $\pm$ SEM de la amplitud de la respuesta del quinto bin luego de cada LFS. La amplitud de la respuesta es menor en los animales adultos KO luego de cada una de las LFS para este punto. ANOVA de 2 vías con medidas repetidas, interacción genotipo X edad $F_{1,78} = 4.93$ $p < 0.05$, interacción genotipo X tiempo y genotipo X edad X tiempo NS. * $p < 0.05$ Newman Keuls post hoc test vs control adulto.

CONCLUSIÓN

El análisis electrofisiológico de nuestro modelo animal para esquizofrenia mostró un aumento en la frecuencia media de disparo y una disminución en el enganche de fase con una oscilación distal y otra local para las neuronas de la mPFC de los animales KO, los que carecen del NMDAR funcional en las interneuronas del sistema córtico-límbico. Estas alteraciones se observan tanto en animales juveniles como en adultos, por lo que no serían responsables de manera directa de la aparición del fenotipo conductual compatible con esquizofrenia, ya que dicho fenotipo emerge luego de transcurrida la adolescencia en nuestro modelo. Sin embargo, este circuito descoordinado y sobreexcitado presente en los animales juveniles, interactúa con los cambios en el desarrollo normal del circuito cortical que ocurren durante la adolescencia dando origen al fenotipo conductual observado en los adultos. Por otro lado, al evaluar el estado de conectividad funcional de la vía vHP-mPFC encontramos que ésta se encuentra disminuida únicamente en los animales KO adultos, lo que nos llevó a proponer que la pérdida en la conectividad funcional de esta vía podría estar involucrada en la fisiopatología de la enfermedad, constituyendo parte del sustrato circuital subyacente a los fenotipos conductuales observados. Un circuito sobreexcitado y descoordinado como el que se observa en los animales juveniles implica un número mayor de espigas con una menor precisión de las mismas, en otras palabras, el circuito se encuentra en un estado más "ruidoso". Proponemos que un circuito de estas características atravesando una etapa que involucra notables cambios de conexión cortical como es la adolescencia promueve la ocurrencia de fenómenos plásticos que generan

una pérdida en la conectividad funcional. Esto se refleja en nuestro trabajo como un favorecimiento de la inducción de LTD ante la aplicación de los sucesivos trenes de LFS.

La utilización de modelos animales de enfermedades psiquiátricas de humanos como herramienta de investigación ha demostrado ser de gran importancia para dilucidar las causas y la fisiopatología de las mismas (Nestler & Hyman 2010). El modelo animal utilizado en nuestro laboratorio resulta de particular interés ya que modela no solo diferentes síntomas, en todo el rango funcional afectado en la esquizofrenia (síntomas positivos, negativos y cognitivos), sino que también presenta alteraciones neurobioquímicas (disminución de GAD67) que se observan en la enfermedad, además de un curso temporal de desarrollo de los síntomas compatible con lo que se observa en los pacientes (Belforte & Nakazawa 2011). Asimismo, la aparición de los fenotipos se debe a la ablación de un receptor específico, en un único tipo neuronal de una región particular del cerebro, lo que le confiere especificidad y lo aventaja por sobre otros modelos animales más generales. En este contexto, la búsqueda de las alteraciones circuitales que subyacen a la aparición de los fenotipos resulta de gran interés para dilucidar qué circuitos pueden encontrarse alterados, y de qué manera, en los pacientes con esquizofrenia, así como también cual es la dinámica circuital del desarrollo de la enfermedad en humanos. Finalmente, el esclarecimiento de la fisiopatología de la enfermedad sirve como guía para el desarrollo de nuevos medicamentos que impacten específicamente en el circuito alterado y permitan una terapéutica más eficiente y con menos efectos indeseados para los pacientes.

La frecuencia media de disparo de las neuronas de la mPFC se encuentra aumentada en los animales KO tanto juveniles como adultos.

La administración sistémica de antagonistas NMDAR en dosis sub-anestésicas produce un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales corticales (Li et al. 2002; Moghaddam et al. 1997). El mecanismo mediante el cual la administración de un antagonista de un receptor excitatorio produce un aumento, en lugar de un descenso, en la frecuencia de disparo de este tipo celular fue motivo de debate en la literatura (Homayoun & Moghaddam 2007). El mecanismo de desinhibición cortical propuesto por Bita Moghaddam postula que, dado que las interneuronas PV+ son más susceptibles a la acción de los antagonistas del NMDAR (Cochran et al. 2003; Keilhoff et al. 2004; Behrens et al. 2007; Morrow et al. 2007), la administración de dosis bajas de los mismos produciría un descenso temporario en la frecuencia de disparo de las interneuronas, que desencadenaría el aumento en la frecuencia de disparo observado en las células piramidales (Homayoun & Moghaddam 2007). Consecuentemente con estos resultados, la ablación del NMDAR exclusivamente en las interneuronas produjo un aumento en la frecuencia de disparo de células piramidales. Sin embargo, encontramos que la frecuencia de disparo de las interneuronas se encuentra también aumentada en nuestro modelo. Entonces, ¿por qué la pérdida de un receptor glutamatérgico produce un aumento en la frecuencia de disparo de las interneuronas en nuestro modelo en lugar de un descenso? La homeostasis es una forma especializada de regulación que mantiene los parámetros de un sistema alrededor de un punto de equilibrio con gran precisión (Davis 2006). En el caso de la actividad neuronal, el balance excitación/inhibición resulta determinante para regular la actividad global del sistema dentro de un rango dinámico de trabajo alrededor de un punto de

equilibrio (o *set point*). Dicho punto de equilibrio se establece en algún momento del desarrollo y permite la regulación de la actividad a lo largo de toda la vida del individuo. Se ha mostrado que alteraciones importantes en la actividad del circuito cortical, de manera sostenida en el tiempo, activan sistemas de compensación que tienden a restablecer la actividad global alrededor del punto de equilibrio mediante el fenómeno conocido como plasticidad homeostática (Turrigiano & Nelson 2004). Ante un incremento a largo plazo del nivel de actividad del circuito, se promoverán mecanismos plásticos que fomenten la inhibición y disminuyan la excitación neuronal de manera de que el balance excitación/inhibición se normalice, permitiendo al sistema trabajar en su rango dinámico de respuesta alrededor del punto de equilibrio (Turrigiano & Nelson 2004). Lo inverso ocurre cuando la actividad disminuye a largo plazo, por ejemplo durante la privación de aferencias sensoriales en cortezas sensitivas primarias (Orczyk et al. 2015). Una posible explicación en referencia al aumento en la frecuencia de disparo de las interneuronas observado en los animales KO en nuestro trabajo podría deberse a un punto de equilibrio alterado con respecto a los controles. La entrada de calcio vía NMDAR en las interneuronas podría ser necesaria para el establecimiento de este punto de equilibrio a lo largo del desarrollo postnatal temprano. La pérdida de receptores funcionales podría interferir en este proceso, resultando en un circuito en el cual las actividades excitatoria e inhibitoria se encuentran balanceadas, pero alrededor de un punto de equilibrio distinto del normal. De hecho, en nuestros resultados observamos que los KO, tanto juveniles como adultos, presentan un aumento en la frecuencia de disparo para ambos tipos neuronales. Sin embargo, el balance excitación/inhibición, medido a nivel del circuito a través de la frecuencia media de disparo de piramidales e interneuronas, se mantiene tanto en juveniles

como en adultos. Proponemos que esta compensación en el balance excitación/inhibición podría prevenir la aparición de la sintomatología compatible con esquizofrenia en los animales juveniles KO. Otra posible explicación para el aumento en la frecuencia de disparo de las células piramidales y las interneuronas en nuestro modelo podría involucrar compensaciones relacionadas con la ya mencionada plasticidad homeostática. Este mecanismo propone una serie de mecanismos de plasticidad, algunos de los cuales podrían depender del NMDAR en las interneuronas PV+, tendientes a promover la estabilidad en la actividad del circuito alrededor del punto de equilibrio de la actividad neuronal (Turrigiano & Nelson 2004). La entrada de calcio mediante el NMDAR podría cumplir un rol en la plasticidad homeostática, actuando como sensor celular del nivel de actividad para las entradas excitatorias en las interneuronas. Hipotetizamos que las interneuronas que carecen del NMDAR funcional sensorían una baja en la actividad en sus aferencias excitatorias provenientes de neuronas locales y distales lo cual desencadenaría mecanismos de plasticidad homeostática tendientes a restablecer la actividad global alrededor del punto de equilibrio. Para ello podría reclutarse diferentes mecanismos, incluyendo una disminución en los niveles de GAD67, enzima limitante en la síntesis de GABA, en las interneuronas de los mutantes, como ya fue descrito en nuestro mutante para la corteza somatosensorial (Belforte et al. 2010). Consecuentemente, la disminución de GABA produciría el aumento en la frecuencia de disparo de las células piramidales por un mecanismo de desinhibición. Por otro lado, la frecuencia de disparo de las interneuronas podría depender exclusivamente de la actividad de los receptores AMPA, por lo que el incremento en la actividad de las células piramidales produciría a su vez un aumento en la frecuencia de disparo de las interneuronas aunque los niveles de GABA en estas últimas continuaran disminuidos.

Independientemente del mecanismo mediante el cual las neuronas de la mPFC aumentan su frecuencia de disparo, las diferencias entre nuestro modelo, en el que la ablación del NMDAR se produce en los primeros días postnatales y los resultados de Moghaddam, en los que la inhibición del NMDAR es aguda en la adultez, acentúan la importancia del componente del desarrollo en la aparición del fenotipo observado.

Las neuronas piramidales se encuentran menos sincronizadas con ritmos generados local y distalmente en los animales KO independientemente de la edad.

Varios trabajos realizados en humanos muestran una disminución en el ritmo gamma en los pacientes con esquizofrenia (Uhlhaas & Singer 2010). Nuestros resultados muestran que la potencia de gamma no se encuentra alterada en nuestro modelo. Estas diferencias pueden deberse a que la anestesia, induce un predominio de las ondas lentas, por lo que la potencia de gamma disminuye notablemente en animales anestesiados, aún en estadios desincronizados como los estudiados en la presente tesis. Esta disminución podría llevar la potencia gamma cerca de un piso de actividad, impidiendo una reducción en los animales KO comparados con los controles. Por otro lado, las diferencias en la potencia de gamma medidas en humanos mediante registros de ECoG ocurren al registrar las oscilaciones gamma evocadas por alguna tarea o estímulo, mientras que en nuestros experimentos el gamma medido es el espontáneo. Para observar una disminución en gamma en nuestro modelo, podrían realizarse experimentos con ratones implantados crónicamente registrando la actividad de gamma evocada por alguna tarea conductual.

Independientemente de que el ritmo gamma no se encuentra alterado en los animales KO, el grado de sincronización de las neuronas de la mPFC con este ritmo se vio disminuido en juveniles y adultos. Debido a que las mediciones en humanos son menos invasivas y no permiten el registro de neuronas individuales, no existen datos sobre la sincronización de neuronas con ritmos en pacientes con esquizofrenia. Por esta razón, la disminución observada en nuestro modelo resulta de interés para esclarecer la fisiopatología de la enfermedad. No hemos tenido registro de trabajos que reporten la potencia ni el grado de sincronización de las neuronas con el ritmo theta en pacientes o en modelos animales de esquizofrenia. Nuestros resultados muestran una disminución de la sincronización con este ritmo proveniente del hipocampo en las neuronas de los animales KO. Este hallazgo se condice también con la disminución en la conectividad hipocampo-PFC observada en los pacientes, ya que el ritmo theta proviene del hipocampo y es esperable que la sincronización sea menor ante una conectividad disminuida.

Trabajos de otros grupos de investigación muestran que la fase de sincronización de las neuronas con el ritmo theta varía en un gradiente dorso-ventral dentro de la mPFC (Sirota et al. 2008). Nuestros resultados arrojaron una tendencia acorde con estos trabajos. Sin embargo, debido a limitaciones intrínsecas a nuestro diseño experimental que incluyen la variabilidad en las posiciones de los tetrodos en el plano vertical de la mPFC, no nos fue posible comparar fehacientemente este parámetro entre los animales KO y control.

La sincronización se encuentra disminuida tanto en animales juveniles como adultos, sin embargo, los animales juveniles no presentan fenotipo conductual. Como se muestra en los resultados (Tabla 1), el porcentaje de neuronas sincronizadas con theta y gamma se encuentra

aumentado en animales juveniles. Este aumento en el porcentaje de neuronas sincronizadas, si bien menor aunque significativo, podría suponer un mecanismo compensatorio que previene la aparición del fenotipo conductual en los KO juveniles.

Sólo los ratones KO adultos muestran una disminución en la conectividad funcional de la vía vHP-mPFC.

Consecuentemente con lo observado en humanos, la conectividad funcional de la vía vHP-mPFC se encuentra disminuida en los animales KO adultos, alteración que, según proponemos, subyace a la aparición de fenotipo conductual. Trabajos recientes vinculan déficits en la conectividad de esta vía con fallas en la memoria de trabajo en modelos genéticos de esquizofrenia (Tamura et al. 2016). Una deficiencia en la memoria de trabajo aparece como uno de los síntomas cognitivos característicos de la enfermedad y se encuentra presente en nuestro modelo animal (Belforte et al. 2010). También, alteraciones en la vía vHP-mPFC y en la inducción del ritmo theta por el hipocampo se relacionan con la expresión de comportamientos de ansiedad en ratones (Padilla-coreano et al. 2016). Interesantemente, nuestro modelo presenta fenotipos de ansiedad únicamente cuando estos son inducidos por novedad (Belforte et al. 2010), por lo que estudiar si la vía vHP-mPFC se activa, y de qué manera, durante la exposición a novedad espacial, podría arrojar más pistas sobre el rol de la vía en el fenotipo conductual observado.

Como se muestra en resultados (Figura R11), la respuesta evocada en la mPFC ante la estimulación hipocampal se encuentra disminuida en los adultos KO, lo que sugiere una disminución en la conectividad funcional de la vía vHP-mPFC. Debido a que, como vimos en la

Introducción (ver "Desarrollo del circuito glutamatérgico de la PFC"), la densidad de espinas dendríticas y de sinapsis excitatorias declina durante la adolescencia producto del podado sináptico que ocurre normalmente durante esta etapa, la disminución observada en la conectividad podría deberse a un podado sináptico exacerbado de la vía.

Experimentos en animales realizando conductas libres de anestesia serán necesarios para establecer el impacto de la manipulación en condiciones fisiológicas.

El LTD se encuentra exacerbado en ratones KO adultos pero no en los juveniles.

Durante la adolescencia los mecanismos de plasticidad sináptica, tanto de potenciación como de depotenciación, se activan diferencialmente y regulan la eficiencia final de la vía vHP-mPFC. Por otra parte solo el mutante adulto presenta una disminución en la conectividad funcional de la vía junto con una predisposición a la depresión sináptica. Especulamos que, durante el refinamiento de la vía en la adolescencia, actuarían en el mutante procesos depotenciación exacerbados llevando a la desconexión funcional observada. Los fenómenos de plasticidad se encuentran estrechamente relacionados con los cambios en la conectividad. Particularmente, el mecanismo de LTD en la mPFC ha sido propuesto como un mecanismo clave en la maduración durante la adolescencia y en el refinamiento de las funciones ejecutivas que sucede durante esta etapa del desarrollo (Selemon 2013). Es de esperar que alteraciones en la susceptibilidad a sufrir LTD produzcan un desarrollo anormal y repercutan en un circuito adulto menos conectado.

La estimulación eléctrica de baja frecuencia en el vHP utilizada para la inducción del LTD, así como también la estimulación simple utilizada en los pulsos test, podrían reclutar vías indirectas

hacia la mPFC, sin embargo, la corta latencia de la respuesta evocada registrada en la mPFC se corresponde con la activación monosináptica de la vía vHP-mPFC. De todas maneras, no podemos descartar que la estimulación reclute vías adicionales hacia la mPFC, principalmente en los protocolos de plasticidad. Por otro lado, también podría suceder que la estimulación eléctrica afecte fibras de pasaje próximas al vHP y que, consecuentemente, estimule otras áreas cerebrales de manera no controlada. Experimentos futuros utilizando la tecnología de la optogenética con estimulación lumínica directamente en la mPFC servirían para cerciorarnos de que es la estimulación directa de la vía en cuestión la que subyace las alteraciones descritas. Nuestro modelo presenta ablación del NMDAR en las interneuronas del sistema córtico-límbico y este sistema incluye al vHP (Belforte et al. 2010). Por lo tanto, cabe preguntarse si las alteraciones en la conectividad funcional de la vía vHP-mPFC y en la sincronización con las ondas theta provenientes del hipocampo no se deben a la falta de NMDAR hipocámpales funcionales. Como vimos en nuestros resultados, la ablación del NMDAR produce un aumento de la frecuencia de disparo en las neuronas piramidales registradas en la mPFC. Se podría especular que las células piramidales hipocámpales que proyectan desde el vHP hasta la mPFC y que carecen del NMDAR funcional también presenten una frecuencia de disparo aumentada. En ese caso, ese supuesto aumento de la frecuencia de disparo generaría un aumento en la conectividad funcional de la vía, y no una disminución como la que se observa en nuestro trabajo. Asimismo, esperaríamos en principio un aumento en el grado de sincronización con el ritmo theta de darse un aumento en la frecuencia de disparo, aunque también podría suceder que la temporalidad de disparo de las neuronas del vHP se encuentre alterada, en cuyo caso sí se puede esperar una pérdida en la sincronización de las neuronas de la mPFC consecuencia de

esta alteración. De todas maneras, la potencia del ritmo theta proveniente del vHP no se encuentra alterada en nuestro modelo, por lo que la interpretación más parsimoniosa es que la disminución en la sincronización con el ritmo theta se debe a las alteraciones ocurridas en las neuronas de la mPFC y no a las del vHP.

En nuestro trabajo se evaluó únicamente la vía vHP-mPFC. La elección de esta vía se debe a que, como ya se mencionó, la mPFC se encuentra fuertemente implicada en la esquizofrenia y que la conexión vHP-mPFC es directa y monosináptica e involucra la estructura de origen del ritmo theta, que fue sujeto de este estudio. De todas maneras, podría resultar que otras vías que proyectan a la mPFC e incluso vías que proyecten a otras áreas corticales se encuentren alteradas en nuestro modelo y no descartamos esa posibilidad.

El transcurso por la adolescencia es clave para la aparición del fenotipo en nuestro modelo. Análisis electrofisiológicos en animales durante distintos estadios de la adolescencia ayudaría a comprender mejor la dinámica de las diferencias observadas entre fenotipos. Sin embargo, dado que se trata de una etapa difícil de definir temporalmente y a las variabilidades en el desarrollo entre individuos, existe riesgo de obtener resultados intermedios entre juveniles y adultos que muestren una gran dispersión. A pesar de esto, pensamos que la realización de experimentos en este estadio intermedio merece ser tomada en cuenta en trabajos futuros.

La ablación del NMDAR en interneuronas PV+ de todo el cerebro en ratones adultos llevada a cabo en el laboratorio de Hannah Monyer (Korotkova et. al, 2010) mostró alteraciones en la potencia de los ritmos theta y gamma junto con algunas alteraciones comportamentales. Las diferencias entre este ratón transgénico y nuestro modelo animal radican en el componente del desarrollo. Creemos que el paso por la adolescencia es clave para el desarrollo de los fenotipos,

tanto conductuales como electrofisiológicos en nuestro modelo. El hecho de que la recombinación se produzca en la adultez en el modelo de Monyer marca una diferencia notable entre los dos animales. Por lo tanto, es de esperar que las alteraciones observadas en ambos sean considerablemente distintas.

Un modelo de esquizofrenia ampliamente utilizado y que involucra el componente del desarrollo es el de MAM (Moore et al. 2006; Flagstad et al. 2004; Gourevitch et al. 2004). La inyección del compuesto antimitótico MAM, impide el correcto desarrollo del hipocampo, y produce fenotipos que son compatibles con esquizofrenia. Sin embargo, este modelo afecta a todos los tipos celulares indistintamente y de manera drástica, lo que puede inducir cambios inespecíficos como consecuencia de la lesión. En este sentido, la ablación realizada en nuestro modelo es mucho más específica y permite extraer conclusiones más claras acerca de las causas de los fenotipos.

El presente trabajo abarcó el análisis circuital de un modelo del desarrollo de esquizofrenia que presenta alteraciones específicas en el periodo pre y postadolescente. Los resultados arrojados por este trabajo son claves para el esclarecimiento de la fisiopatología de esta enfermedad, entendiéndola como una enfermedad del neurodesarrollo. Como se mencionó en la introducción, se han realizado estudios buscando marcadores comportamentales que puedan predecir la ocurrencia de la esquizofrenia. Sin embargo, no todos los individuos que presentan los patrones comportamentales atípicos descritos en estos trabajos terminan desarrollando esquizofrenia, por lo que éstos no son de utilidad para predecir la ocurrencia de la enfermedad. El aumento en la frecuencia de disparo y la disminución en la sincronización con las ondas theta y gamma que se observan en nuestro modelo son candidatos a utilizarse como los primeros

marcadores fisiológicos para predecir la ocurrencia de la enfermedad en la adultez, ya que se encuentran presentes en los animales juveniles, que no presentan fenotipo conductual.

Una de las limitaciones de nuestro trabajo es que los resultados presentados son correlacionales. Ninguno de nuestros experimentos demuestra que la pérdida de conectividad funcional es la causa del desarrollo del fenotipo ni que la facilitación del mecanismo de LTD durante la adolescencia sea responsable del descenso en la conectividad funcional que se observa en los adultos. Para establecer causalidad se podrían realizar experimentos con implantes crónicos en animales KO, aplicando protocolos que induzcan potenciación de largo término durante la adolescencia con el fin de compensar la facilitación del LTD que ocurre durante la misma. En estos experimentos esperaríamos encontrar un estado de conectividad funcional normal de la vía vHP-mPFC y ausencia de los fenotipos compatibles con esquizofrenia que se observan en los animales KO adultos. El estudio de tratamientos preventivos con, por ejemplo, antipsicóticos durante la adolescencia sería relevante desde la clínica. Algunos de los fenotipos conductuales mejoran en el adulto luego del tratamiento con Risperidona (Belforte et al. 2010). Sería interesante analizar si el tratamiento crónico con Risperidona durante la adolescencia previene la aparición de los fenotipos conductuales junto con la pérdida de conectividad funcional de la vía vHP-mPFC en los animales KO.

Además, quedan abiertas algunas preguntas a ser contestadas en experimentos futuros: ¿Dependen las alteraciones observadas del paso por la adolescencia o meramente del tiempo transcurrido desde la ablación? Los parámetros evaluados en el presente trabajo podrían medirse en los animales en los que la recombinación sucede posterior a la adolescencia, que no desarrollan fenotipo conductual (ver “Nuestro modelo” en Introducción). Esperaríamos en este

caso que la conectividad funcional no se encuentre disminuida en estos animales, ya que las alteraciones en este parámetro dependen del paso por la adolescencia según nuestra hipótesis. Especulamos que estos animales KO adultos serían circuitalmente parecidos al anteriormente mencionado KO obtenido por el laboratorio Monyer (Korotkova et. al, 2010) ¿Son las interneuronas de la mPFC en particular las responsables de la aparición del fenotipo electrofisiológico? Proponemos la utilización de la tecnología de los DREADDs, que permite el silenciamiento temporario de una determinada población neuronal en donde se expresan estos receptores. Expresando los DREADDs bajo el control del promotor utilizado en nuestro modelo e inyectando la construcción en la mPFC podría silenciarse la actividad de las interneuronas PV+ exclusivamente en esta área y, de observarse un fenotipo, podría adjudicársele al malfuncionamiento de este subtipo neuronal en esta estructura en particular.

En **RESUMEN**, en el presente trabajo evaluamos parámetros electrofisiológicos relevantes en el marco de la esquizofrenia en un modelo animal en el que el desarrollo durante la adolescencia de animales que carecen del NMDAR en interneuronas del sistema córtico-límbico promueve la aparición de fenotipos conductuales compatibles con esta enfermedad en la adultez. El análisis fue realizado en animales pre y post adolescentes, para evaluar cómo los cambios que ocurren durante esta etapa afectan el desarrollo del circuito. Encontramos que la frecuencia de disparo de las neuronas de la mPFC se encuentra aumentada y que el grado de sincronización de las mismas con ondas locales y distales se encuentra disminuido tanto en los animales juveniles como en los adultos KO, evidenciando posibles marcadores fisiológicos tempranos para la enfermedad. Además, encontramos un parámetro, la conectividad funcional de la vía vHP-

mPFC, que se encuentra disminuida únicamente en animales adultos KO. Proponemos que el hecho de que en el periodo juvenil el circuito se encuentra sobreexcitado por un lado y descoordinado por otro lo convierte en un circuito “ruidoso”, y que esta preponderancia de estímulos asincrónicos perjudica las detecciones de coincidencia, promoviendo el mecanismo de LTD durante la adolescencia y propiciando la pérdida en la conectividad funcional que se observa en el adulto y que, dado que es una alteración que ocurre únicamente en esta etapa, proponemos que subyace los fenotipos conductuales que se observan en nuestro modelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abi-Dargham, A. et al., 2002. Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J Neurosci*, 22(1529-2401 (Electronic)), pp.3708–3719. Available at: f:\7069_AbiDargham2002.pdf.
- Agid, O., Kohn, Y. & Lerer, B., 2000. Environmental stress and psychiatric illness. *Biomed & Pharmacother*, 54, pp.135–141.
- Akbarian, S. & Huang, H.-S., 2006. Molecular and cellular mechanisms of altered GAD1/GAD67 expression in schizophrenia and related disorders. *Brain Research Reviews*, 52(2), pp.293–304. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017306000142>.
- Alexander, G.E. & Goldman, P.S., 1978. (Accepted July 7th, 1977). *Behavioral Biology*, 143, pp.233–249.
- de Almeida, J. et al., 2013. Refinement of Neuronal Synchronization with Gamma Oscillations in the Medial Prefrontal Cortex after Adolescence. *PLoS ONE*, 8(4), pp.1–9.
- Alonso, a. & García-Austt, E., 1987. Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat - I. Laminar distribution of theta field potentials. *Experimental Brain Research*, 67(3), pp.493–501.
- American Psychiatric Association, 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, American Psychiatric Association. Available at: <http://psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9780890425596> [Accessed August 11, 2016].
- Anderson, S.A. et al., 1995. Synchronous development of pyramidal neuron dendritic spines and parvalbumin-immunoreactive chandelier neuron axon terminals in layer III of monkey prefrontal cortex. *Neuroscience*, 67(1), pp.7–22. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030645229500051J>.
- Angrist, B. et al., 1975. Amphetamine psychosis: behavioral and biochemical aspects. pp. 13-23. In: *Matthysse SW, Kety SS, ed. Catecholamines and schizophrenia. Oxford, Pergamon Press*, 11, pp.13–23.
- Anon, deutsch morisha 1989.pdf.

- Arellano, J.I. et al., 2007. Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neuroscience*, 145(2), pp.464–469.
- Arnsten, A.F.T., 2009. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(6), pp.410–422. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2648>.
- Arseneault, L. et al., 2011. Childhood trauma and children ' s emerging psychotic symptoms : A genetically sensitive longitudinal cohort study. *American Journal of Psychiatry*, 168(January), pp.65–72.
- Asada, H. et al., 1997. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp.6496–9. Available at: [/pmc/articles/PMC21078/?report=abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21078/?report=abstract).
- Ascoli, G. a et al., 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(7), pp.557–568.
- Ashok, A.H., Baugh, J. & Yeragani, V.K., 2012. Paul Eugen Bleuler and the origin of the term schizophrenia (SCHIZOPRENIEGRUPPE). *Indian journal of psychiatry*, 54(1), pp.95–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3339235&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 1, 2016].
- Barbato, a, 1998. Psychiatry in transition: outcomes of mental health policy shift in Italy. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*, 32(5), pp.673–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9805590>.
- Bartho, P. et al., 2004. Characterization of Neocortical Principal Cells and Interneurons by Network Interactions and Extracellular Features. , pp.600–608.
- Bartos, M., Vida, I. & Jonas, P., 2007. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(1), pp.45–56.
- Behrens, M.M. et al., 2007. Ketamine-Induced Loss of Phenotype of Fast-Spiking Interneurons Is Mediated by NADPH-Oxidase. *Science*, 318(5856), pp.1645–1647. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1148045>.
- Belforte, J.E. et al., 2010. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature Neuroscience*, 13(1), pp.76–83. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.2447>.
- Belforte, J.E. & Nakazawa, K., 2011. Genetically Engineered Mice for Schizophrenia Research. In pp. 231–242. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-157-4_10 [Accessed August 11, 2016].
- Belujon, P. & Grace, A. a., 2011. Hippocampus, amygdala, and stress: Interacting systems that affect susceptibility to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216(1), pp.114–121.
- Ben-ari, Y. et al., 2007. GABA : A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. , pp.1215–1284.
- Benes, F.M. & Berretta, S., 2001. GABAergic Interneurons: Implications for Understanding Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 25(1), pp.1–27. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T9V-433NP7R-1/2/0a96bef75332c213ee608bfbc550cb2>.
- Benevento, L.A., Bakkum, B.W. & Cohen, R.S., 1995. Gamma-Aminobutyric-Acid and Somatostatin Immunoreactivity in the Visual-Cortex of Normal and Dark-Reared Rats. *Brain Research*, 689(2), pp.172–182.
- Benson, D.L. et al., 1989. Expression of glutamic acid decarboxylase mRNA in normal and monocularly deprived cat visual cortex. *Molecular*

- Brain Research*, 5(4), pp.279–287.
- Bertolino, A. et al., 2000. The relationship between dorsolateral prefrontal neuronal N-acetylaspartate and evoked release of striatal dopamine in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 22(2), pp.125–132.
- Börger, C. & Kopell, N., 2003. Synchronization in networks of excitatory and inhibitory neurons with sparse, random connectivity. *Neural computation*, 15, pp.509–538.
- Bourgeois, J.P., Goldman-Rakic, P.S. & Rakic, P., 1994. Synaptogenesis in the prefrontal cortex of rhesus monkeys. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 4(1), pp.78–96.
- Bragin, a et al., 1995. Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(1 Pt 1), pp.47–60.
- Breier, A. et al., 1997. Association of ketamine-induced psychosis with focal activation of the prefrontal cortex in healthy volunteers. *American Journal of Psychiatry*, 154(6), pp.805–811.
- Buhl, E.H., Tamás, G. & Fisahn, A., 1998. Cholinergic activation and tonic excitation induce persistent gamma oscillations in mouse somatosensory cortex in vitro. *The Journal of Physiology*, 513(1), pp.117–126. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7793.1998.117by.x> [Accessed April 28, 2016].
- Butt, S.J.B. et al., 2005. The Temporal and Spatial Origins of Cortical Interneurons Predict Their Physiological Subtype. *Neuron*, 48(4), pp.591–604. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627305009347>.
- Buzsáki, G., 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33(3), pp.325–340.
- Buzsaki, G. & Chrobak, J.J., 1995. Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: A role for interneuronal networks. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(4), pp.504–510.
- Buzsáki, G. & Wang, X.-J., 2012. Mechanisms of Gamma Oscillations. *Annual Review of Neuroscience*, 35(1), pp.203–225.
- Byne, W. et al., 2002. Postmortem assessment of thalamic nuclear volumes in subjects with schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 159(1), pp.59–65.
- Cannon, M. et al., 2002. Reviews and Overviews Obstetric Complications and Schizophrenia : Historical and Meta-Analytic Review. *American Journal of Psychiatry*, 159(July), pp.1080–1092.
- Carlsson, A., 1974. Antipsychotic drugs and catecholamine synapses. *Journal of psychiatric research*, 11, pp.57–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4156791> [Accessed March 2, 2016].
- Cass, D.K. et al., 2014. NIH Public Access. , 74(7), pp.490–501.
- Chao, H.-T. et al., 2010. Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature*, 468(7321), pp.263–269. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3057962&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chattopadhyaya, B., 2004. Experience and Activity-Dependent Maturation of Perisomatic GABAergic Innervation in Primary Visual Cortex during a Postnatal Critical Period. *Journal of Neuroscience*, 24(43), pp.9598–9611. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1851-04.2004>.
- Chattopadhyaya, B. et al., 2007. GAD67-Mediated GABA Synthesis and Signaling Regulate Inhibitory Synaptic Innervation in the Visual Cortex. *Neuron*, 54(6), pp.889–903. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627307003728>.

- Cherubini, E., Gaiarsa, J.L. & Ben-Ari, Y., 1991. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends in Neurosciences*, 14(12), pp.515–519.
- Chesney, E., Goodwin, G.M. & Fazel, S., 2014. Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: a meta-review. *World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)*, 13(2), pp.153–60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4102288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cho, R.Y., Konecky, R.O. & Carter, C.S., 2006. Impairments in frontal cortical γ synchrony and cognitive control in schizophrenia.
- Chrobak, J.J. & Buzsáki, G., 1998. Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(1), pp.388–398.
- Ciampi, L., 1980. Catamnestic long-term study on the course of life and aging of schizophrenics. *Schizophrenia bulletin*, 6(4), pp.606–618.
- Cochran, S.M. et al., 2003. Induction of Metabolic Hypofunction and Neurochemical Deficits after Chronic Intermittent Exposure to Phencyclidine: Differential Modulation by Antipsychotic Drugs. *Neuropsychopharmacology*, 28(2), pp.265–275. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.npp.1300031>.
- Commission, S., 2012. The abandoned illness: a report from the Schizophrenia Commission. *London: Rethink Mental Illness*. Available at: http://scholar.google.com/secure.scholarhub.io/scholar?lookup=0&q=The+abandoned+illness:+a+report+from+the+Schizophrenia+Commission&hl=es&as_sdt=0,5#0 [Accessed February 25, 2016].
- Corcoran, K.A. & Quirk, G.J., 2007. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(4), pp.840–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251424> [Accessed August 2, 2016].
- Coyle, J.T., 1996. The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harvard review of psychiatry*, 3(5), pp.241–253.
- Cragg, B.G., 1975. The development of synapses in the visual system of the cat. *The Journal of comparative neurology*, 160(2), pp.147–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1112924> [Accessed April 28, 2016].
- Crossley, N.A. et al., 2009. Superior temporal lobe dysfunction and frontotemporal dysconnectivity in subjects at risk of psychosis and in first-episode psychosis. *Human Brain Mapping*, 30(12), pp.4129–4137.
- Cruz, D.A., Egan, S.M. & Lewis, D.A., 2003. Postnatal development of pre- and postsynaptic GABA markers at chandelier cell connections with pyramidal neurons in monkey prefrontal cortex. *J Comp Neurol*, 465(3), pp.385–400. Available at: 12966563.
- Csicsvari, J. et al., 2003. Mechanisms of Gamma Oscillations in the Hippocampus of the Behaving Rat. *Neuron*, 37(2), pp.311–322. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627302011698>.
- Cunningham, M.O. et al., 2003. Gamma Oscillations Induced by Kainate Receptor Activation in the Entorhinal Cortex In Vitro. *J. Neurosci.*, 23(30), pp.9761–9769. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/23/30/9761.long> [Accessed April 28, 2016].
- Dang, M.T. et al., 2006. Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum.
- Davis, G.W., 2006. Homeostatic Control of Neural Activity : From Phenomenology to Molecular Design.
- DeFelipe, J. et al., 2013. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(3), pp.202–216. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn3444>.

- Deicken, R.F. et al., 2000. Reduced concentrations of thalamic N-acetylaspartate in male patients with schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 157(4), pp.644–647.
- Derdikman, D. & Knierim, J.J., 2014. *Space, time and memory in the hippocampal formation*,
- Doischer, D. et al., 2008. Postnatal differentiation of basket cells from slow to fast signaling devices. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(48), pp.12956–12968. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2890-08.2008>
- Doyle, C. et al., 1997. Low-frequency stimulation induces homosynaptic depotentiation but not long-term depression of synaptic transmission in the adult anaesthetized and awake rat hippocampus in vivo. *Neuroscience*, 77(1), pp.75–85. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452296004277>.
- Dupuy, S.T. & Houser, C.R., 1996. Prominent expression of two forms of glutamate decarboxylase in the embryonic and early postnatal rat hippocampal formation. *The Journal of Neuroscience*, 16(21), pp.6919–6932.
- Eaton, W.W., 1985. Epidemiology of schizophrenia. *Epidemiologic reviews*, 7, pp.105–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3902492> [Accessed February 25, 2016].
- Engel, a K., Fries, P. & Singer, W., 2001. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10), pp.704–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11584308>.
- Erickson, S.L. & Lewis, D. a, 2002. Postnatal development of parvalbumin- and GABA transporter-immunoreactive axon terminals in monkey prefrontal cortex. *The Journal of comparative neurology*, 448(2), pp.186–202. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12012429>.
- Euston, D.R., Gruber, A.J. & McNaughton, B.L., 2012. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron*, 76(6), pp.1057–1070. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002>.
- Farde, L. et al., 1987. No D2 receptor increase in PET study of schizophrenia. *Archives of general psychiatry*, 44(7), pp.671–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2955770> [Accessed March 2, 2016].
- Flagstad, P. et al., 2004. Disruption of neurogenesis on gestational day 17 in the rat causes behavioral changes relevant to positive and negative schizophrenia symptoms and alters amphetamine-induced dopamine release in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, 29(11), pp.2052–2064.
- Frankland, P.W. et al., 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5672), pp.881–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131309> [Accessed August 2, 2016].
- Freund, T.F. & Katona, I., 2007. Perisomatic Inhibition. *Neuron*, 56(1), pp.33–42.
- Gabbott, P.L. et al., 1997. Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *The Journal of comparative neurology*, 377(4), pp.465–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007187>.
- Ganguli, R., Brar, J.S. & Rabin, B.S., 1994. Immune Abnormalities in Schizophrenia - Evidence for the Autoimmune Hypothesis. *Harvard Review of Psychiatry*, 2(2), pp.70–83. Available at: <Go to ISI>://WOS:A1994NZ72700002.
- Gattaz, W.F. & Häfner, H. eds., 1999. *Search for the Causes of Schizophrenia*, Heidelberg: Steinkopff. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-47076-9> [Accessed April 27, 2016].

- Gelman, D.M. & Marín, O., 2010. Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *European Journal of Neuroscience*, 31(12), pp.2136–2141. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2010.07267.x>.
- Giedd, J.N. & Rapoport, J.L., 2010. Structural MRI of pediatric brain development: what have we learned and where are we going? *Neuron*, 67(5), pp.728–34. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3285464&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> \n <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.040>.
- Gierdalski, M. et al., 2001. Rapid regulation of GAD67 mRNA and protein level in cortical neurons after sensory learning. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 11(9), pp.806–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532886>.
- Goldman-Rakic, P.S., 1987. Development of cortical circuitry and cognitive function. *Child development*, 58(3), pp.601–622.
- Gonchar, Y., 2008. Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Frontiers in Neuroanatomy*, 1(March). Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/neuro.05.003.2007/abstract>.
- Gonchar, Y. & Burkhalter, a, 1997. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 7(4), pp.347–358.
- Gonzalez-Burgos, G. & Lewis, D.A., 2008. GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*, 34(5), pp.944–61. Available at: <http://schizophreniabulletin.oxfordjournals.org/content/34/5/944>.
- Gottesman, I.I., 1991. Schizophrenia Genesis: The Origins of Madness. , p.9297.
- Gourevitch, R. et al., 2004. Working memory deficits in adult rats after prenatal disruption of neurogenesis. *Behavioural pharmacology*, 15(4), pp.287–292.
- Gourley, S.L. et al., 2012. Arg kinase regulates prefrontal dendritic spine refinement and cocaine-induced plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(7), pp.2314–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3386297&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 28, 2016].
- Grunze, H.C. et al., 1996. NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(6), pp.2034–2043.
- Gupta, A., 2000. Organizing Principles for a Diversity of GABAergic Interneurons and Synapses in the Neocortex. *Science*, 287(5451), pp.273–278. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5451.273>.
- Haider, B. & McCormick, D.A., 2009. Rapid Neocortical Dynamics: Cellular and Network Mechanisms. *Neuron*, 62(2), pp.171–189. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.008>.
- Hájos, N. & Paulsen, O., 2009. Network mechanisms of gamma oscillations in the CA3 region of the hippocampus. *Neural Networks*, 22(8), pp.1113–1119. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neunet.2009.07.024>.
- Hall, W. & Degenhardt, L., 2000. Cannabis use and psychosis: a review of clinical and epidemiological evidence. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*, 34(1), pp.26–34.
- Harris, K. et al., 2003. Organization of cell assemblies in the hippocampus. *Nature*, 424(July), pp.552–556. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v424/n6948/abs/nature01834.html>.

- Harrison, P.J. & Weinberger, D.R., 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Molecular psychiatry*, 10(1), pp.40–68; image 5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15263907>.
- Hasenstaub, A. et al., 2005. Inhibitory postsynaptic potentials carry synchronized frequency information in active cortical networks. *Neuron*, 47(3), pp.423–435.
- Hasselmo, M.E., 2002. A Proposed Function for Hippocampal Theta Rhythm : Separate Phases of Encoding and Retrieval Enhance Reversal of Prior Learning. , 817, pp.793–817.
- Hazan, L., Zugaro, M. & Buzsáki, G., 2006. Klusters, NeuroScope, NDManager: A free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *Journal of Neuroscience Methods*, 155(2), pp.207–216. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027006000410>.
- Heizmann, C.W., 1984. Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia*, 40(9), pp.910–921. Available at: [http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=6205895&retmode=ref&cmd=prlinks&nfile:///Users/balarampooja/Library/Application Support/Papers2/Articles/1984/Heizmann/Experientia 1984 Heizmann.pdf\papers2://publication/uuid/53513](http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=6205895&retmode=ref&cmd=prlinks&nfile:///Users/balarampooja/Library/Application%20Support/Papers2/Articles/1984/Heizmann/Experientia%201984%20Heizmann.pdf\papers2://publication/uuid/53513).
- Hirsch, S.R. & Weinberger, D.R., 2003. *Schizophrenia*,
- Hô, N. & Destexhe, A., 2000. Synaptic background activity enhances the responsiveness of neocortical pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 84(3), pp.1488–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10980021> [Accessed August 14, 2016].
- Holroyd, C.B., Coles, M.G.H. & Nieuwenhuis, S., 2002. Medial prefrontal cortex and error potentials. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), pp.1610–1 author reply 1610–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12041532> [Accessed August 2, 2016].
- Homayoun, H. & Moghaddam, B., 2007. NMDA Receptor Hypofunction Produces Opposite Effects on Prefrontal Cortex Interneurons and Pyramidal Neurons. , 27(43), pp.11496–11500.
- Hoover, W.B. & Vertes, R.P., 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Structure and Function*, 212(2), pp.149–179.
- Huang, Z.J., 2009. Activity-dependent development of inhibitory synapses and innervation pattern: role of GABA signalling and beyond. *The Journal of physiology*, 587(Pt 9), pp.1881–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2689329&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hutcheon, B. & Yarom, Y., 2000. Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends in Neurosciences*, 23(5), pp.216–222.
- Huttenlocher, P.R. & Dabholkar, a S., 1997. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *The Journal of comparative neurology*, 387(2), pp.167–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9336221>.
- Ingvar, D.H. & Franzén, G., 1974. Abnormalities of cerebral blood flow distribution in patients with chronic schizophrenia. *Acta psychiatrica Scandinavica*, 50(4), pp.425–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4423855> [Accessed March 2, 2016].
- Isohanni, M. et al., 2001. Early developmental milestones in adult schizophrenia and other psychoses. A 31-year follow-up of the Northern Finland 1966 Birth Cohort. *Schizophrenia Research*, 52, pp.1–19.

- J.O'Keefe & Recce, M., 1993. Phase relationship between hippocampal place units and the hippocampal theta rhythm. *Hippocampus*, 3(3).
- Jablensky, A., 1997. The 100-year epidemiology of schizophrenia. *Schizophrenia research*, 28(2-3), pp.111–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9468347> [Accessed March 14, 2016].
- Jay, T.M., Burette, F. & Laroche, S., 1995. NMDA Receptor-dependent Long-term Potentiation in the Hippocampal Afferent Fibre System to the Prefrontal Cortex in the Rat. *European Journal of Neuroscience*, 7(2), pp.247–250. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01060.x> [Accessed August 2, 2016].
- Jay, T.M. & Witter, M.P., 1991. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *Journal of Comparative Neurology*, 313(4), pp.574–586.
- Jensen, O. & Lisman, J.E., 1996. Hippocampal CA3 region predicts memory sequences: accounting for the phase precession of place cells. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 3(2-3), pp.279–287.
- Jodo, E., 2004. Activation of Medial Prefrontal Cortex by Phencyclidine is Mediated via a Hippocampo-prefrontal Pathway. *Cerebral Cortex*, 15(5), pp.663–669. Available at: <http://www.cercor.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/cercor/bhh168>.
- Jones, P.B. & Tarrant, C.J., 1999. Specificity of developmental precursors to schizophrenia and affective disorders. *Schizophrenia Research*, 39(2), pp.121–125. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996499001103>.
- K. Franklin, G.P., 2012. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*,
- Kash, S.F. et al., 1997. Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), pp.14060–14065.
- Kawaguchi, Y. & Kubota, Y., 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex*, 7(6), pp.476–486.
- Keefe, R.S.E. et al., 2007. Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Archives of general psychiatry*, 64(6), pp.633–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548746>.
- Keilhoff, G. et al., 2004. Repeated application of ketamine to rats induces changes in the hippocampal expression of parvalbumin, neuronal nitric oxide synthase and cFOS similar to those found in human schizophrenia. *Neuroscience*, 126(3), pp.591–598.
- Kinney, J.W., 2006. A Specific Role for NR2A-Containing NMDA Receptors in the Maintenance of Parvalbumin and GAD67 Immunoreactivity in Cultured Interneurons. *Journal of Neuroscience*, 26(5), pp.1604–1615. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4722-05.2006>.
- Kinon, B.J. & Gómez, J.C., 2013. Clinical development of pomaglumetad methionil: A non-dopaminergic treatment for schizophrenia. *Neuropharmacology*, 66, pp.82–86. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.002>.
- Kiser, P.J., Cooper, N.G.F. & Mower, G.D., 1998. Expression of two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD67 and GAD65) during postnatal development of rat somatosensory barrel cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 402(1), pp.62–74.
- Klimesch, W., 1999. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Research Reviews*, 29(2-3), pp.169–195. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165017398000563>.
- Konick, L.C. & Friedman, L., 2001. Meta-analysis of thalamic size in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 49(1), pp.28–38.
- Korotkova, T; Fuchs, E; Ponomarenko, A; von Engelhardt, J; Monyer, H., 2010. NMDA Receptor Ablation on Parvalbumin-Positive Interneurons

- Impairs Hippocampal Synchrony, Spatial Representations, and Working Memory. *Neuron*, 68(3), pp.557–569. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627310007592>.
- Kubota, Y., Hattori, R. & Yui, Y., 1994. Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Research*, 649(1–2), pp.159–173.
- Kullmann, D.M. & Lamsa, K.P., 2007. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(9), pp.687–99. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2207> [Accessed April 28, 2016].
- Lahti, A.C. et al., 1995. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 13(1), pp.9–19.
- Larson, M.K., Walker, E.F. & Compton, M.T., 2010. Early signs, diagnosis and therapeutics of the prodromal phase of schizophrenia and related psychotic disorders. *Expert review of neurotherapeutics*, 10(8), pp.1347–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20662758> [Accessed August 11, 2016].
- Laruelle, M. et al., 1999. Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biological Psychiatry*, 46(1), pp.56–72. Available at: <http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006322399000670/fulltext> [Accessed January 25, 2016].
- Leinekugel, X. et al., 1995. Synaptic GABAA activation induces Ca²⁺ rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampal slices. *The Journal of physiology*, 487 (Pt 2(Pt 2)), pp.319–29. Available at: [/pmc/articles/PMC1156575/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC1156575/?report=abstract) [Accessed February 29, 2016].
- Leung, L.W. & Borst, J.G., 1987. Electrical activity of the cingulate cortex. I. Generating mechanisms and relations to behavior. *Brain research*, 407(1), pp.68–80.
- Lewis, D.A. et al., 2012. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, 35(1), pp.57–67. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2011.10.004>.
- Lewis, D.A., Hashimoto, T. & Volk, D.W., 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(4), pp.312–324. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn1648>.
- Li, Q. et al., 2002. NMDA receptor antagonists disinhibit rat posterior cingulate and retrosplenial cortices: a potential mechanism of neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 22(8), pp.3070–3080. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11943810&retmode=ref&cmd=prlinks&npapers2://publication/uuid/7B721B6F-F4E4-4C99-B9FF-2ABE5D24B7A9>.
- Liang, F., Isackson, P.J. & Jones, E.G., 1996. Stimulus-dependent, reciprocal up- and downregulation of glutamic acid decarboxylase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II gene expression in rat cerebral cortex. *Experimental brain research*, 110(2), pp.163–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8836681> [Accessed February 29, 2016].
- Lim, C., Chong, S.A. & Keefe, R.S.E., 2009. Psychosocial factors in the neurobiology of schizophrenia: a selective review. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 38(5), pp.402–406. Available at: papers2://publication/uuid/F8E52599-FF53-42AD-BFD2-7C18D0BE273A.
- Lisman, J., 2005. The theta/gamma discrete phase code occurring during the hippocampal phase precession may be a more general brain coding scheme. *Hippocampus*, 15(7), pp.913–922.
- Lisman, J.E. & Idiart, M.A., 1995. Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5203), pp.1512–1515.

- Llinas, R.R., 1988. Intrinsic Electrophysiological Properties Central Nervous System Function. , (3).
- Lopes-Aguiar, C. et al., 2013. NMDA receptor blockade impairs the muscarinic conversion of sub-threshold transient depression into long-lasting LTD in the hippocampus-prefrontal cortex pathway in vivo: Correlation with gamma oscillations. *Neuropharmacology*, 65(October), pp.143–155. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.09.013>.
- Mainen, Z.F. & Sejnowski, T.J., 1995. Reliability of spike timing in neocortical neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5216), pp.1503–1506.
- Mann, E.O., Radcliffe, C.A. & Paulsen, O., 2005. Hippocampal gamma-frequency oscillations: from interneurons to pyramidal cells, and back. *The Journal of physiology*, 562(Pt 1), pp.55–63. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2004.078758>.
- Manoach, D.S., 2003. Prefrontal cortex dysfunction during working memory performance in schizophrenia: Reconciling discrepant findings. *Schizophrenia Research*, 60(2-3), pp.285–298.
- Marwaha, S. & Johnson, S., 2004. Schizophrenia and employment. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 39(5), pp.337–349. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00127-004-0762-4>.
- Mataga, N., Mizuguchi, Y. & Hensch, T.K., 2004. Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron*, 44(6), pp.1031–1041.
- McGuire, P. et al., 2008. Functional neuroimaging in schizophrenia: diagnosis and drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(2), pp.91–98.
- Meyer-Lindenberg, A. & Tost, H., 2012. Neural mechanisms of social risk for psychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 15(5), pp.663–668.
- Mintz, J. & Kopelowicz, A., 2007. CULASS confirms CATIE. *Archives of general psychiatry*, 64(8), p.978; author reply 979–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17679644> [Accessed March 2, 2016].
- Mitchell, S.J. & Ranck, J.B., 1980. Generation of theta rhythm in medial entorhinal cortex of freely moving rats. *Brain Research*, 189(1), pp.49–66.
- Miyoshi, G. et al., 2007. Physiologically Distinct Temporal Cohorts of Cortical Interneurons Arise from Telencephalic Olig2-Expressing Precursors. *Journal of Neuroscience*, 27(29), pp.7786–7798. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1807-07.2007>.
- Moghaddam, B. et al., 1997. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(8), pp.2921–2927.
- Moore, H. et al., 2006. A Neurobehavioral Systems Analysis of Adult Rats Exposed to Methylazoxymethanol Acetate on E17: Implications for the Neuropathology of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 60(3), pp.253–264.
- Morales, B., Choi, S.-Y. & Kirkwood, A., 2002. Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(18), pp.8084–8090.
- Morgan, C. & Fisher, H., 2007. Environment and schizophrenia: Environmental factors in schizophrenia: Childhood trauma - A critical review. *Schizophrenia Bulletin*, 33(1), pp.3–10.
- Morrow, B. a, Elsworth, J.D. & Roth, R.H., 2007. Repeated phencyclidine in monkeys results in loss of parvalbumin-containing axo-axonic projections in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 192(2), pp.283–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17265073>.

- Munk-Jørgensen, P., 1987. First-admission rates and marital status of schizophrenics. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/sci-hub.io/doi/10.1111/j.1600-0447.1987.tb02886.x/abstract> [Accessed February 25, 2016].
- Nakazawa, K. et al., 2012. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology*, 62(3), pp.1574–1583. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.022>.
- Nelson, M.D. et al., 2015. Hippocampal Volume Reduction in Schizophrenia as Assessed by Magnetic Resonance Imaging. , 55(May 1998), pp.433–440.
- Nestler, E.J. & Hyman, S.E., 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 13(10), pp.1161–1169. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.2647> [Accessed August 11, 2016].
- Neurons, C., 1985. γ -Aminobutyric Acid-. , 492, pp.984–986.
- Neuroscience, B., 2004. Large-scale recording of neuronal ensembles. , 7(5), pp.446–451.
- Nordstrom, A.L. et al., 1995. No elevated D 2 dopamine receptors in neuroleptic-naïve schizophrenic patients revealed by positron emission tomography and [11 C] N -methylspiperone. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 61(2), pp.67–83.
- Nuechterlein, K.H. et al., 2004. Identification of separable cognitive factors in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 72(1), pp.29–39.
- Oblak, A.L., Gibbs, T.T. & Blatt, G.J., 2011. Reduced GABAA receptors and benzodiazepine binding sites in the posterior cingulate cortex and fusiform gyrus in autism. *Brain Research*, 1380, pp.218–228. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.021>.
- Okubo, Y. et al., 1997. Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature*, 385(6617), pp.634–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9024661> [Accessed December 4, 2015].
- Olney, J.W., 1989. Glutamate, a neurotoxic transmitter. *J Child Neurol*, 4, pp.218–226. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2570095>.
- Orczyk, J.J. et al., 2015. Reconciling Homeostatic and Use-Dependent Plasticity in the Context of Somatosensory Deprivation. *Neural Plasticity*, 2015, pp.1–9. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/np/2015/290819/> [Accessed August 11, 2016].
- Padilla-coreano, N. et al., 2016. Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Article Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. *Neuron*, pp.1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.011>.
- Pakkenberg, B., 1990. Pronounced reduction of total neuron number in mediodorsal thalamic nucleus and nucleus accumbens in schizophrenics. *Archives of general psychiatry*, 47(11), pp.1023–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2241504>.
- Pakkenberg, B., 1992. The volume of the mediodorsal thalamic nucleus in treated and untreated schizophrenics. *Schizophrenia Research*, 7(2), pp.95–100.
- Pakkenberg, B., 1993. Total nerve cell number in neocortex in chronic schizophrenics and controls estimated using optical disectors. *Biological Psychiatry*, 34(11), pp.768–772.
- Paré, D. & Collins, D.R., 2000. Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: multiple extracellular recordings in conscious cats. *J Neurosci*, 20(7), pp.2701–2710.
- Patil, S.T. et al., 2007. Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nature Medicine*, 13(9), pp.1102–1107. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm1632>.

- Patz, S. et al., 2003. Neuronal activity and neurotrophic factors regulate GAD-65/67 mRNA and protein expression in organotypic cultures of rat visual cortex. *European Journal of Neuroscience*, 18(1), pp.1–12.
- Penttonen, M., 2003. Natural logarithmic relationship between brain oscillators. *Thalamus & Related Systems*, 2(2), pp.145–152. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472928803000074>.
- Petronis, a, Paterson, a D. & Kennedy, J.L., 1999. Schizophrenia: an epigenetic puzzle? *Schizophrenia bulletin*, 25(4), pp.639–655.
- Petsche, H., Stumpf, C. & Gogolak, G., 1962. The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 14(2), pp.202–211. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0013469462900305>.
- Pezaris, J. S., Sahani, M., and Andersen, R.A., 1996. Tetrodes for monkeys. *Computational Neuroscience: Trends in Research*.
- Pierri, J.N. et al., 2001. Decreased somal size of deep layer 3 pyramidal neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Archives of general psychiatry*, 58(5), pp.466–473.
- Pinault, D. & Deschênes, M., 1992. Control of 40-Hz firing of reticular thalamic cells by neurotransmitters. *Neuroscience*, 51(2), pp.259–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1361219>.
- POSNER, M.I. et al., 2007. The anterior cingulate gyrus and the mechanism of self-regulation. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 7(4), pp.391–395. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.3758/CABN.7.4.391> [Accessed August 2, 2016].
- Rajkowska, G., Selemon, L.D. & Goldman-Rakic, P.S., 1998. Neuronal and Glial Somal Size in the Prefrontal Cortex. *Archives of General Psychiatry*, 55(3), p.215. Available at: <http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpsyc.55.3.215>.
- Rapp, P. & Bachevalier, J., 2003. Cognitive development and aging. *Fundamental Neuroscience, 2nd ed. Academic Press*, Available at: <http://scholar.google.ru/secure.sci-hub.io/scholar?q=Rapp+and+Bachevalier+2003#0> [Accessed April 27, 2016].
- Remington, G., 2003. Understanding antipsychotic “atypicality”: A clinical and pharmacological moving target. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 28(4), pp.275–284.
- Roosendaal, B., McEwen, B.S. & Chattarji, S., 2009. Stress, memory and the amygdala. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(6), pp.423–433.
- Rosoklija, G. et al., 2000. Structural abnormalities of subicular dendrites in subjects with schizophrenia and mood disorders: preliminary findings. *Archives of general psychiatry*, 57(4), pp.349–356.
- Rushworth, M.F.S. et al., 2011. Frontal cortex and reward-guided learning and decision-making. *Neuron*, 70(6), pp.1054–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21689594> [Accessed August 2, 2016].
- Sampson, E.E., 2014. American Sociological Association. , 26(2), pp.146–162.
- Schlösser, R. et al., 2003. Altered effective connectivity during working memory performance in schizophrenia: A study with fMRI and structural equation modeling. *NeuroImage*, 19(3), pp.751–763.
- Schreier, A. et al., 2009. Prospective study of peer victimization in childhood and psychotic symptoms in a nonclinical population at age 12 years. *Archives of general psychiatry*, 66(5), pp.527–536.
- Seeman, P. et al., 1984. Bimodal distribution of dopamine receptor densities in brains of schizophrenics. *Science (New York, N.Y.)*, 225(4663), pp.728–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6147018> [Accessed August 11, 2016].
- Seeman, P., 1987. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse (New York, N.Y.)*, 1(2), pp.133–152.

- Selemon, L.D., 2013. A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. *Transl Psychiatry*, 3(3), p.e238. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23462989>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3625918/pdf/tp20137a.pdf>.
- Selemon, L.D., Rajkowska, G. & Goldman-Rakic, P.S., 1998. Elevated neuronal density in prefrontal area 46 in brains from schizophrenic patients: application of a three-dimensional, stereologic counting method. *The Journal of comparative neurology*, 392(3), pp.402–412.
- Selten, A.A.R.S.K.J.-P., 2014. Sex Differences in the Risk of Schizophrenia. , 60(June 2003).
- Shenton, M.E. et al., 2001. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 49, pp.1–52.
- Shu, Y., Hasenstaub, A. & McCormick, D.A., 2003. Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature*, 423(6937), pp.288–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748642> [Accessed August 14, 2016].
- Sigurdsson, T. & Duvarci, S., 2015. Hippocampal-Prefrontal Interactions in Cognition, Behavior and Psychiatric Disease. *Frontiers in systems neuroscience*, 9, p.190. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26858612> [Accessed August 11, 2016].
- Singer, W. & Gray, C.M., 1995. Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. , 18, pp.555–586.
- Sirota, A. et al., 2008. Entrainment of Neocortical Neurons and Gamma Oscillations by the Hippocampal Theta Rhythm. *Neuron*, 60(4), pp.683–697.
- Somers, D. & Kopell, N., 1993. Rapid synchronization through fast threshold modulation. *Biological Cybernetics*, 68(5), pp.393–407.
- Spear, L.P., 2000. *The adolescent brain and age-related behavioral manifestations*,
- Spellman, T. et al., 2015. Hippocampal – prefrontal input supports spatial encoding in working memory.
- Spencer, K.M. et al., 2004. Neural synchrony indexes disordered perception and cognition in schizophrenia.
- Steriade, M., 2001. Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *Journal of neurophysiology*, 86(1), pp.1–39.
- Steven, H., 1990. Synchronization of pulse-coupled biological oscillators*. , 50(6), pp.1645–1662.
- Suarez, D. & Haro, J.M., 2008. Overview of the findings from the European SOHO study. *Expert review of neurotherapeutics*, 8(6), pp.873–880. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18505352>.
- Takahashi, S. et al., 2013. Reduction of cortical GABAergic inhibition correlates with working memory impairment in recent onset schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 146(1-3), pp.238–243. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2013.02.033>.
- Takashima, A. et al., 2006. Declarative memory consolidation in humans: a prospective functional magnetic resonance imaging study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), pp.756–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407110> [Accessed August 2, 2016].
- Takita, M. et al., 1999. Induction of stable long-term depression in vivo in the hippocampal-prefrontal cortex pathway. *European Journal of Neuroscience*, 11(11), pp.4145–4148.
- Tamura, M. et al., 2016. Developmental Inhibition of Gsk3 Rescues Behavioral and Neurophysiological Deficits in a Mouse Model of Schizophrenia Predisposition Article Developmental Inhibition of Gsk3 Rescues Behavioral and Neurophysiological Deficits in a Mouse Model of Schizophre. *Neuron*, pp.1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.025>.
- Thomson, A.M. & West, D.C., 2003. Presynaptic frequency filtering in the gamma frequency band; dual intracellular recordings in slices of adult rat and cat neocortex. *Cereb Cortex*, 13(2), pp.136–143.
- Thune, J.J., Uylings, H.B.M. & Pakkenberg, B., 2001. No deficit in total number of neurons in the prefrontal cortex in schizophrenics. *Journal of*

- Psychiatric Research*, 35(1), pp.15–21.
- Todtenkopf, M.S., Vincent, S.L. & Benes, F.M., 2005. A cross-study meta-analysis and three-dimensional comparison of cell counting in the anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar brain. *Schizophrenia Research*, 73(1), pp.79–89.
- Toledo-Rodriguez, M., 2004. Correlation Maps Allow Neuronal Electrical Properties to be Predicted from Single-cell Gene Expression Profiles in Rat Neocortex. *Cerebral Cortex*, 14(12), pp.1310–1327. Available at: <http://www.cercor.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/cercor/bhh092>.
- Tort, A.B.L. et al., 2008. Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), pp.20517–20522.
- Touma, C., 2011. Stress and affective disorders: animal models elucidating the molecular basis of neuroendocrine-behavior interactions. *Pharmacopsychiatry*, 44 Suppl 1, pp.S15–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21544741>.
- Tsodyks, M. V et al., 1996. Population dynamics and theta rhythm phase precession of hippocampal place cell firing: a spiking neuron model. *Hippocampus*, 6(3), pp.271–280. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8841826>.
- Turrigiano, G.G. & Nelson, S.B., 2004. HOMEOSTATIC PLASTICITY IN THE DEVELOPING NERVOUS SYSTEM.
- Uhlhaas, P.J. & Singer, W., 2010. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nature reviews. Neuroscience*, 11(2), pp.100–113. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn2774> \n <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20087360>.
- Varela, F. et al., 2001. The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(4), pp.229–239. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283746>.
- Vollenweider, F.X. et al., 1997. Metabolic hyperfrontality and psychopathology in the ketamine model of psychosis using positron emission tomography (PET) and [18F]fluorodeoxyglucose (FDG). *European Neuropsychopharmacology*, 7(1), pp.9–24.
- Weinberger, D.R., 1999. Cell biology of the hippocampal formation in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 45(4), pp.395–402.
- Weinberger, D.R., 1987. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Archives of general psychiatry*, 44(7), pp.660–669.
- Weinberger, D.R. et al., The frontal lobes and schizophrenia.
- Weinberger, D.R., Berman, K.F. & Illowsky, B.P., 1988. Physiologic dysfunction of dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 45, pp.609–615.
- Welsh, R.C., Chen, A.C. & Taylor, S.F., 2010. Low-frequency BOLD fluctuations demonstrate altered thalamocortical connectivity in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 36(4), pp.713–722.
- Whittington, M.A. & Traub, R.D., 2003. Interneuron Diversity series: Inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends in Neurosciences*, 26(12), pp.676–682. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223603003369>.
- Wolf, R.C. et al., 2009. Temporally anticorrelated brain networks during working memory performance reveal aberrant prefrontal and hippocampal connectivity in patients with schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(8), pp.1464–1473. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584609002607>.
- Wong, D.F. et al., 1984. Effects of age on dopamine and serotonin receptors measured by positron tomography in the living human brain. *Science (New York, N.Y.)*, 226(4681), pp.1393–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6334363> [Accessed August 14,

2016].

Woodruff, P.W.R. et al., 2000. Meta-Analysis of Regional Brain Volumes in Schizophrenia. , (January).

Wu, E.Q. et al., 2005. The economic burden of schizophrenia in the United States in 2002. *The Journal of clinical psychiatry*, 66(9), pp.1122–9.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16187769> [Accessed November 14, 2015].

Wu, X. et al., 2012. GABA Signaling Promotes Synapse Elimination and Axon Pruning in Developing Cortical Inhibitory Interneurons. *Journal of Neuroscience*, 32(1), pp.331–343. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3189-11.2012>.

Zaitsev, A.V., 2004. Localization of Calcium-binding Proteins in Physiologically and Morphologically Characterized Interneurons of Monkey Dorsolateral Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, 15(8), pp.1178–1186. Available at: <http://www.cercor.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/cercor/bhh218>.

Zammit, S. et al., 2003. Paternal age and risk for schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 183, pp.405–408. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14594914.

Zhou, Y. et al., 2008. Altered resting-state functional connectivity and anatomical connectivity of hippocampus in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 100(1-3), pp.120–132. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920996407005634>.

Zivanovic, O. & Nedic, A., 2012. Kraepelin's concept of manic-depressive insanity: one hundred years later. *Journal of affective disorders*, 137(1-3), pp.15–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21497402> [Accessed March 15, 2016].

ANEXO

Protocolo 1: Purificación de tejido y PCR

Buffer de Lisis:

- | | | |
|-------------------------------------|-------------|--------|
| • 100mM Tris:HCl (pH 8.0) | stock 1 M | 50 ml |
| • 5mM EDTA, pH8.0 | stock 0.5 M | 5ml |
| • 0.2% SDS | stock 20 % | 5ml |
| • 200mM NaCl | stock 5 M | 20 ml |
| • Agua ultrapura (MilliQ o similar) | hasta | 500 ml |

Digestión del tejido:

1. Colocar en un tubo *ependorff* aproximadamente 0,5 cm de colita y 0,5ml de **a+b**.

- **a:** 0,5ml de buffer de lisis.
- **b:** 4µl de proteinasa K (20mg/mg).

Verificar que las colitas queden completamente sumergidas y que los tubos estén bien cerrados para que no se evaporen.

2. Incubar los tubos durante la noche a 55°C.

Purificación:

1. Sacudir los tubos fuerte
2. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos.
3. Transferir el sobrenadante (aproximadamente 400µl a un nuevo tubo) y agregar el mismo volumen (400µl) de isopropanol (2-propanol).
4. Mezclar el rack invirtiendo sin agitar los tubos de 20 a 30 veces.
5. Utilizando un tip de pipeta de 20 µl se pesca el DNA (pellet) y se lo coloca en un tubo nuevo.

Es importante que una vez colocados los DNA en cada tubo, se los deje reposar un tiempo con la tapa de cada tubo abierta, para permitir evaporar el isopropanol restante.

6. Se agrega a cada tubo con DNA 500µl de buffer TE pH=8.

En este paso es importante verificar que los DNA se encuentren bien sumergidos en el buffer.

7. Se colocan las muestras a calentar a 55°C hasta que se disuelva el DNA (puede ser toda la noche o en un par de horas si se los agita cada tanto).
8. Se guardan a temperatura ambiente, duran años si no se evaporan.

Reactivos para las PCRs:

PCR FYL1

Reactivos	Mix 1X (para 1 µl)
Agua	14.78
Buffer 5X	4
dNTP's 10mM	0.4
Primer P2	0.08
Primer P3	0.08
Taq polimerasa *	0.16
DNA	0.5
Vol final	20

PCR CRE

Reactivos	Mix 1X (para 1 µl)
------------------	----------------------------

Agua	14.7
Buffer 5X	4
dNTP's 10mM	0.4
Primer CRE 22	0.08
Primer CRE 23	0.08
Actina SENSE	0.04
Actina ANTI-SENSE	0.04
Taq polimerasa *	0.16
DNA	0.5
Vol final	20

* GoTaq DNA Polymerase promega. Catalog #M3005

Protocolo para la PCR:

- Calcular volúmenes de la mix multiplicando los valores por el # de muestras + 2 controles.
- Cortar la cantidad de wellles que voy a usar, rotularlos y colocarlos en hielo sobre una placa de plástico para que no les entre agua.
- Poner los tubos conteniendo los ingredientes de la mix en el hielo en el orden que los voy a usar. Evitar en todo momento que entre agua.
- Marcar el eppendorf de la mix para cuando lo centrifugue.
- Encender la PCRera antes de preparar la master mix para que se estabilice.
- Preparar mix, vortexearla y después centrifugar corto y balanceando.

- Devolver la Taq polimerasa en el freezer, y el resto de los reactivos en la heladera. Las muestras se guardan a temperatura ambiente.
- Poner 19.5 μ l de la mix en el borde de los tubos.
- Meter la muestra (0,5 μ l), llevándose con el tip la gota que quedo en el borde cuando puse la mix.
- Poner el film en los wellles, cerrar la tapa de la PCR y bajar la platina caliente.
- Escoger el protocolo de PCR a utilizar.

Protocolo 2: Corrida en geles de Agarosa

- Pesar 3g de agarosa.
- Colocar 150ml de buffer TAE y agitar.
- Calentar en microondas hasta que se vea la solución transparente (~ 3min).
- Dejar enfriar hasta que alcance ~ 55°C.
- Colocar 7.5 μ L de Bromuro de Etidio y agitar con cuidado.
- Volcar la solución en la placa lentamente desde un costado intentando que no se produzcan burbujas que pudieran interferir con la corrida.
- Colocar los peines paralelos a la base de la cuba.
- Dejar secar el gel hasta que adquiera un tono blancuzco (~ 30 min).
- Remover los peines de manera vertical.
- Colocar Orange G (4 μ l) a las muestras.

- Sembrar las muestras de manera vertical (18 μ l) sin tocar el fondo del well y retirando la pipeta a medida que se siembra.
- Tapar la cuba y conectar los cables.
- Empezar la corrida a 100mV.
- Dejar correr por ~40 min.
- Cuando la banda del Orange G esta apenas pasando la mitad de la corrida en la corrida de Cre y llegando al final en la corrida de Flox retirar el gel.
- Apagar el equipo de corrida.
- Revelar en UV.

Protocolo 3: Confección de tetrodos

Se construyó un aparato que permite enroscar los alambres del tetrodo cuantificando la cantidad de vueltas deseada. El aparato consta de un motor a pila que produce la rotación de un imán en donde se coloca un cocodrilo que se amarra a los alambres del tetrodo.

- Limpiar con alcohol la mesa y el sostenedor.
- Desenrollar 50 cm de alambre * evitando muescas.
- Doblar el alambre por la mitad.
- Levantarlo con la pinza y colocarlo en el sostenedor por la parte media de manera que todos sus extremos queden a la misma altura y evitando que el alambre se enganche en los bordes del sostenedor.
- Enganchar los extremos a un cocodrilo y colocar este último sobre el imán

- Cerciorarse que el alambre se encuentre tirante y que el cocodrilo no forme ángulo con el sostenedor (ni hacia los costados ni hacia adelante/atrás)
- Retorcer dando 90 vueltas hacia un lado (~ 1.30 min) y desenrollar 30 para el otro (~ 30seg)
- Calentar con una pistola de calor a una distancia de ~ 1cm recorriendo toda la extensión del alambre enroscado realizando 5 idas y 5 vueltas a poca velocidad.
- Cortar la parte inferior con tijera y retirar el tetrodo. Si la parte de abajo esta deshilachada realizar otro corte.
- Cortar 6 pedazos de tubo hueco de poliamida **.
- Pasar un alambre de 50 μm de diámetro por dentro de los tubos (para que el calor de la reacción exotérmica del acrílico dental que será utilizado posteriormente no los encoja).
- Colocar una placa de radiografía y pegar los tubos en el arreglo deseado utilizando cinta scotch. Afirmar el arreglo de tubos con acrílico dental dejando una porción de alambre afuera. Retirar la placa de radiografía una vez realizado el pegado.
- Pegar un tubo de acero inoxidable (punta de jeringa cortada) uniendo los tubos de poliamida y el chip donde irá conectado el tetrodo.
- Retirar los alambres de 50 μm y colocar un tip cortado en la punta del arreglo para no dañar los tetrodos mientras se enhebran.
- Enhebrar los tetrodos. Cortarles la parte posterior diagonalmente para facilitar la unión al chip. Cortar la parte anterior de ser necesario.
- Enhebrar los 4 electrodos a los agujeros del conector.
- Colocar los pins dorados en el agujero del conector, golpear la punta suavemente, hacer un poco de presión con la pinza azul y finalmente introducirlos del todo con una pinza especial.

-Cortar el excedente de alambres por debajo del conector.

-Para el dorado de los tetrodos, colocarlos en solución de oro. Conectar un impedanciometro a cada uno de los alambres del tetrodo (uno a uno) y utilizar una unidad aislada para inyectar 2 μ A de corriente de manera que los alambres se recubran de oro hasta alcanzar la impedancia deseada (entre 200 y 500 K Ω).

* Alambre Kanthal MN^o755768. Diámetro 0.0005 inches (12 μ m).

** Phelps Dodge Cat: 263_MD_315393. Diámetro 0.00551 inches (140 μ m).

Protocolo 4: Tinción Nissel con safranina “o” y montaje de cortes

Pasar los portas por:

Alcohol 70%: 5 min

Safranina: 20 min

Secado al aire: 1 min

Agua destilada: 3 inmersiones aprox.

Etoh 96%: 20 seg aprox.

Etoh 100%: 1 min aprox.

Xilol: Mas de 5 min

Montar utilizando bálsamo sintético.