



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Rol de la corteza prefrontal medial en la codificación de información contextual en un modelo murino de esquizofrenia

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Javier Alberto Gonzalez Sanabria

Directora de tesis: Dra. Camila Lidia Zold

Director Adjunto de tesis: Dr. Juan Emilio Belforte

Consejera de estudios: Dra. Eleonora Katz

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO UBA-CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 22 de Noviembre del 2023

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	8
Corteza Prefrontal	8
Conexiones de la PFC: Aferencias y eferencias	9
Conexiónado interno de la PFC: Circuitos excitatorios e inhibitorios	10
Interneuronas GABAérgicas parvalbúmina (PV+)	11
Características del desarrollo de interneuronas PV	13
Funciones de la Corteza Prefrontal	14
Corteza Prefrontal y Esquizofrenia	15
Esquizofrenia	17
Epidemiología	17
Reseña histórica del concepto de esquizofrenia	20
Sintomatología	23
Síntomas positivos	23
Síntomas negativos	24
Síntomas cognitivos	25
Otros aspectos clínicos	26
Etiología	28
Factores Genéticos	28
Factores Ambientales	29
Fisiopatología	31
Hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia	31
Hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia	33
Hipótesis del origen GABAérgico de la esquizofrenia: Hipofunción del receptor NMDA en interneuronas GABAérgicas	34
Rol del receptor de NMDA en interneuronas cortico-límbicas asociado al neurodesarrollo	35
Modelos animales útiles para el estudio de la fisiopatología de la esquizofrenia	36
Modelos genéticos de hipofunción del rNMDA	37
Nuestro modelo de hipofunción del rNMDA en interneuronas GABAérgicas cortico-límbicas	39

OBJETIVOS	42
MATERIALES Y MÉTODOS	44
Animales	44
Modelo experimental y genotipado	44
Microdispositivo de registro (microdrive)	46
Cirugía e implante de microdrives	47
Registro electrofisiológico in-vivo	50
Protocolos comportamentales	50
Análisis del comportamiento	52
Registros con Tetrodos: Análisis de la actividad de neuronas únicas	53
Clasificación de unidades en interneuronas o células piramidales	55
Normalización de la actividad neuronal y criterios de selección	55
Análisis del potencial de campo local y análisis de enganche de fase	56
Estadística	57
Histología	58
Tabla resumen de los datos analizados	60
RESULTADOS	61
Actividad de neuronas piramidales de la mPFC en tareas de exploración sobre un corredor lineal con distintos niveles en la carga contextual: prueba de discriminación social-objeto.	62
Animales KO no logran establecer una preferencia social durante la reexposición a la tarea de discriminación social.	65
La codificación de información contextual a nivel de neurona única en la mPFC está conservada en los KO. Los ratones mutantes presentan un déficit en el reclutamiento de neuronas codificantes en la mPFC exclusivamente en un contexto de alta carga cognitiva.	72
La mPFC de los ratones mutantes presenta un déficit en la codificación a nivel poblacional exclusivamente cuando enfrenta una decisión compleja en la exploración espontánea de un laberinto en Y.	85
Los animales KO presentan una subrepresentación de neuronas que responden significativamente al punto de toma de decisión en dirección al centro del YM.	87
Análisis de la sincronización hipocampo-prefrontal en pruebas de exploración con distinta carga contextual en un modelo murino de esquizofrenia.	99
DISCUSIÓN	106
CONCLUSIÓN general	114
BIBLIOGRAFÍA	115

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento:

A mis directores, Juan y Cami, por haberme acompañado, enseñado y guiado en el desarrollo de este trabajo y durante esta etapa fundamental de mi formación académica.

A los animales de experimentación que fueron utilizados en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañerxs y amigxs del laboratorio, tanto a aquellos que me acompañan día a día como a los que ya no están, por crear un ambiente de trabajo cálido y por brindarme su apoyo en cada momento.

A mi familia por ser mi gran sostén, por confiar en mí y apoyarme en cada momento.

Al grupo de neurociencia de sistemas del IFIBIO por permitirme formar parte de un excelente grupo de investigación del cual aprendí muchísimo.

A la Universidad de Buenos Aires y al CONICET por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo este trabajo.

RESUMEN

Título: “Rol de la corteza prefrontal medial en la codificación de información contextual en un modelo murino de esquizofrenia”

La corteza prefrontal medial (mPFC) es una región cerebral clave en el control comportamental y la cognición. Integra información de diversas estructuras cerebrales, lo que le permite establecer una representación adecuada y compleja del contexto, incorporando elementos espaciales y emocionales, dando sustento a comportamientos dirigidos a metas. En la esquizofrenia, un trastorno mental grave que presenta profundas alteraciones cognitivas, muchas de las funciones alteradas han sido atribuidas a un mal funcionamiento de la mPFC. No obstante, en la actualidad poco se sabe acerca de cuáles son los mecanismos de procesamiento de información que utiliza la mPFC y cómo estos se encuentran alterados en la esquizofrenia.

Esta tesis busca comprender el rol que cumple la mPFC en la codificación de la información contextual y cuales serian las alteraciones presentes en un modelo animal de esquizofrenia con ablación post-natal temprana de receptores NMDA asociados a neuronas GABAérgicas cortico-límbicas (mutante). Para ello registramos la actividad unitaria de las neuronas de la mPFC mientras ratones mutantes y controles realizaban tareas de exploración con diferentes niveles de carga cognitiva y emocional. Estas comprenden un corredor lineal al cual le agregamos un estímulo social y un objeto inanimado en los extremos (prueba de discriminación social) y una prueba de alternancia espontánea sobre un laberinto en forma de Y (YM). Aquí, identificamos neuronas corticales (piramidales putativas) capaces de codificar elementos específicos asociados a la carga contextual que presentan las tareas. Detectamos neuronas piramidales capaces de discriminar la ubicación de un estímulo social de un objeto y viceversa. Además, identificamos neuronas que responden al centro del YM justo antes del punto de elección de brazos, lo que sugiere que estarían involucradas en la toma de decisiones. Encontramos que los mutantes disponen de neuronas codificantes con una calidad de respuesta conservada pero exhiben una subrepresentación de estas neuronas a nivel poblacional consistente con alteraciones en el reclutamiento neuronal asociado a la carga contextual de la tarea. Además, detectamos una reducción generalizada del porcentaje de neuronas piramidales sincronizadas con el ritmo theta del hipocampo ventral, consistente con una hipoconexión funcional de la vía vHP-mPFC.

Nuestros resultados en su conjunto contribuyen a un mejor entendimiento de cómo la mPFC asigna recursos cognitivos durante el desempeño comportamental y la exploración del ambiente, y cómo las alteraciones en esta representación podrían estar relacionadas con los trastornos cognitivos presentes en la esquizofrenia.

Palabras clave: corteza prefrontal medial, esquizofrenia, receptores NMDA, electrofisiología in-vivo, codificación contextual.

ABSTRACT

Title: “Role of the Medial Prefrontal Cortex in Encoding Contextual Information in a Mouse Model of Schizophrenia”

The medial prefrontal cortex (mPFC) is a pivotal brain region for cognition and behavioral control. It integrates information from various brain regions, enabling the formation of complex contextual representations that include spatial and emotional elements to guide goal-directed behaviors. In schizophrenia, a severe mental disorder characterized by profound cognitive impairments, many of them have been linked to mPFC dysfunction. However, little is currently known about the information processing mechanisms in the mPFC and how these are disrupted in schizophrenia.

This thesis aims to unravel the role of the mPFC in encoding contextual information and identify the alterations present in an animal model of schizophrenia with early postnatal ablation of NMDA receptors in corticolimbic GABAergic neurons (mutant). To achieve this, we recorded mPFC neurons in mutant and control animals while they performed exploration tasks with varying cognitive and emotional loads. These tasks involved a linear track with the incorporation of social and inanimate object stimuli at the ends (social-object discrimination task, SO) and Y-maze spontaneous alternation test (YM). Here, we identified cortical neurons (putative pyramidal) capable of encoding elements related to the contextual load of the tasks. In the SO task, we identified neurons that discriminate the location of social stimuli from the object and vice versa. Also, in YM we identified neurons that respond to the center of the maze just before the turning decision point suggesting they are involved in the decision making process. Interestingly, mutant animals maintained response quality of encoding neurons in both tasks. However, mutants exhibited a reduction in the proportion of encoding neurons at the population level, consistent with altered recruitment patterns of cortical units during heightened cognitive demands. In addition, we observed a reduction in the percentage of pyramidal neurons synchronized with the theta rhythm of the ventral hippocampus, suggesting functional hypoconnectivity in the vHP-mPFC pathway.

Taken together, these results contribute to a better understanding of how the mPFC allocates cognitive resources during behavioral performance and environmental exploration, and how alterations in this representation may be related to the cognitive disorders present in schizophrenia.

Keywords: medial prefrontal cortex, schizophrenia, NMDA receptors, in-vivo recordings, contextual encoding

ABREVIATURAS

5HT3aR: receptor de serotonina 5HT3a
ACC: corteza cingulada anterior
ANOVA: análisis de la varianza
BLA: amígdala basolateral
CCK: colecistoquinina
CB: calbindina
CLA: claustró
COMT: catecol-O-metiltransferasa
CTRL: animales controles
Cre: recombinasa Cre
CR: calretinina
dHP: hipocampo dorsal
D1: receptor dopaminérgico D1
D2: receptor dopaminérgico D2
DISC1: gen "Disrupted in Schizophrenia 1"
DSM: Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría
E/I: balance excitación/inhibición
FD: frecuencia de disparo
FS: interneuronas fast-spiking
GABA: Ácido γ -aminobutírico
GAD67: glutamato descarboxilasa 67
GxE: interacción entre factores genéticos y factores ambientales
GRM3: receptor glutamatérgico metabotrópico 3
I.p.-: inyección intraperitoneal
ICD: Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud
IL: área infralímbica de mPFC
IL-: interleucina en PCR
KO: knockout condicional de la subunidad NR1 del rNMDA (mutante)
LFP: potencial de campo local
LTD: depresión de largo término
LTP: potenciación de largo término
Lox: sitios de secuencia LoxP
MATRICS: Investigación sobre medición y tratamiento para mejorar la cognición en la esquizofrenia
mGluR5: receptor glutamatérgico metabotrópico tipo 5
mPFC: corteza prefrontal medial
MyM: materiales y métodos

NIMH: Instituto Nacional de la Salud Mental, EEUU.
NPY: neuropéptido Y
NR1: subunidad NR1 del rNMDA
NRG1: neuregulina 1
PFA: paraformaldehído
PFC: corteza prefrontal
PCA: análisis de componentes principales
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PL: área prelímbica fr mPFC
PPI: inhibición del reflejo de sobresalto por prepulso
PV: parvalbúmina
PV+: parvalbúmina positivo
REML: modelo de efectos mixtos con medidas repetidas
REM: movimiento ocular rápido
RM ANOVA: análisis de la varianza con medidas repetidas
rNMDA: receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato
SO: prueba de discriminación social-objeto sobre el corredor lineal
SOM: somatostatina
STR: estriado
THAL: tálamo
VTA: área tegmental ventral
vHP: hipocampo ventral
YM: prueba de alternancia espontánea sobre un laberinto en forma de Y
Z: variable normalizada en escala z-score

INTRODUCCIÓN

Corteza Prefrontal

La corteza prefrontal (PFC, prefrontal cortex) se encuentra ubicada en el polo anterior del cerebro de los mamíferos. Esta región ha sido ampliamente estudiada debido a que está implicada en procesos cognitivos complejos, participa en funciones ejecutivas y dirigidas a metas, y está relacionada con el funcionamiento socioemocional en humanos, otros primates y también en roedores. Dentro de la corteza prefrontal se pueden distinguir tres grandes regiones: la corteza prefrontal lateral, a su vez subdividida en dorsal y ventral; la corteza prefrontal orbital u “orbitofrontal”; y la corteza prefrontal medial que incluye a la corteza cingulada anterior (ACC, anterior cingulate cortex), (Fuster, 2000).

En un principio, con los estudios neuroanatómicos de Brodmann a comienzos del siglo XX, se consideraba que el córtex prefrontal era una estructura exclusiva de los primates (Levin et al., 1991). Luego a través de estudios que evaluaban el conexionado, las propiedades funcionales, la distribución de neurotransmisores y receptores, el desarrollo embrionario y las características citoarquitectónicas, se comenzó a identificar distintas regiones de la PFC que podrían ser consideradas como análogas funcionales entre primates y roedores. Es así que, funcionalmente, la corteza prefrontal medial (mPFC, *medial prefrontal cortex*) en ratones es considerada un análogo funcional de la corteza dorsolateral prefrontal de los humanos (Kolb, 1984; H. B. M. Uylings et al., 2003; H. B. Uylings & van Eden, 1990).

A diferencia de lo que ocurre en los primates, la mPFC de los roedores es íntegramente agranular. Posee una citoarquitectura de cinco láminas o capas (L1, L2/3, L5 y L6) con ausencia de la capa L4 (capa granular interna en primates). Dentro de la mPFC se pueden distinguir tres áreas o cortezas: el área prelímbica (PL) y el área infralímbica (IL), ambas ubicándose por debajo de la ACC (Anastasiades & Carter, 2021; Carlén, 2017) (ver esquema en Figura I1B). Pese a que la literatura destaca inconsistencias en cuanto a las subdivisiones y a las analogías que se puedan hacer entre la mPFC de roedores y primates (Le Merre et al., 2021), habitualmente se acepta en el campo que la mPFC constituye un buen modelo, dado los grandes beneficios metodológicos que esta ofrece,

para acceder al conocimiento de lo que ocurre no solo en los roedores sino en otras especies de mamíferos incluyendo a los primates (Carlén, 2017).

Conexiones de la PFC: Aferencias y eferencias

Se considera a la PFC como un gran centro integrador de información tanto externa como interna. Al igual que en los primates, se ha visto que la PFC de roedores recibe aferencias de múltiples áreas sensoriales, como la corteza somatosensorial, visual y auditiva, al igual que de otras áreas relacionadas con procesamiento cognitivo y afectivo como la amígdala y el hipocampo (ver Figura 11A). Dichas aferencias son integradas por la mPFC dotando al individuo de una representación cognitiva y emocional, incluyendo aspectos ambientales y del estado interno del individuo, lo que vincula a la actividad de la PFC con la generación de respuestas comportamentales complejas.

En su mayoría, las conexiones establecidas con la PFC son de tipo bidireccional, organizadas como bucles recíprocos, lo que permite a la PFC orquestar diversos comportamientos a lo largo del tiempo mediante la actualización continua de la actividad neuronal. Parte de las aferencias distales provienen de otras zonas corticales, del tálamo (THAL), el claustró (CLA), la amígdala basolateral (BLA), el hipocampo dorsal (dHP) y el área tegmental ventral (VTA). Además, la corteza prefrontal recibe proyecciones distales monosinápticas, algunas más próximas provienen de la corteza prefrontal contralateral y otras más distales provienen del hipocampo ventral (vHP) (Anastasiades & Carter, 2021). En particular, la vía monosináptica que proyecta del vHP a la mPFC fue ampliamente estudiada por su participación en funciones comportamentales y cognitivas, más aún, alteraciones en esta vía han sido reportadas en enfermedades neuropsiquiátricas, con mayor frecuencia en la esquizofrenia (Sigurdsson & Duvarci, 2016).

A todas estas conexiones se suman las proyecciones provenientes de estructuras neuromoduladoras como el prosencéfalo basal, los núcleos del rafe y el locus coeruleus. Además, el tálamo dorsomedial, cuyas proyecciones a la corteza prefrontal constituyen una de las más prominentes de entre sus aferencias subcorticales, funciona de núcleo de relevo para estructuras involucradas en el procesamiento de información con naturaleza muy diversa, como lo son la formación reticular mesencefálica, la amígdala, la corteza prepiriforme, la corteza temporal inferior, la sustancia nigra pars reticulata, el cerebelo y el globo pálido.

Conexión interno de la PFC: Circuitos excitatorios e inhibitorios

En cuanto a las distintas poblaciones neuronales que se encuentran en la mPFC, como en todo circuito cortical existen componentes excitatorios e inhibitorios. Dentro de los excitatorios se encuentran las neuronas de proyección o neuronas piramidales, glutamatérgicas, que no solo envían sus proyecciones a otras regiones corticales y subcorticales (siendo el 70-80% de las neuronas de la mPFC), sino que también proveen una importante entrada excitatoria local mediante axones colaterales (DeFelipe & Fariñas, 1992). La porción restante comprende a neuronas inhibitorias, la gran mayoría GABAérgicas del circuito local que modulan la actividad del circuito intra- o intercolumnar cortical. Estas son denominadas interneuronas y existen de distintos tipos con diferentes características morfológicas, fisiológicas, moleculares y sinápticas (Markram et al., 2004).

Las neuronas piramidales reciben contactos sinápticos inhibitorios tanto en el árbol dendrítico como en la región del soma y el segmento inicial del axón, mientras que las aferencias excitatorias son recibidas en las dendritas (Boivin & Nedivi, 2018). En las dendritas basales reciben contactos locales mientras que en las dendritas distales se reciben proyecciones de otras regiones corticales y del tálamo (Spruston, 2008). La mayoría de los contactos excitatorios que inciden sobre las dendritas, lo hacen sobre estructuras especializadas que se denominan espinas dendríticas. Estas estructuras han sido relacionadas con las propiedades bioquímicas y eléctricas de las conexiones sinápticas, y más aún, las alteraciones de las espinas dendríticas han sido observadas en diversos trastornos neuropsiquiátricos, describiéndose en el caso de la esquizofrenia un excesivo podado sináptico o "*pruning*" de las mismas (Penzes et al., 2011).

En cuanto a las interneuronas, en su gran mayoría células GABAérgicas, suelen clasificarse en distintos subtipos. La clasificación más actualizada subdivide a las interneuronas corticales según expresión de: la proteína de unión al calcio parvalbúmina (PV), el neuropéptido somatostatina (SOM), o el receptor de serotonina 5HT3a (5HT3aR, por *5HT3a receptor*), que a su vez pueden expresar o no el péptido intestinal vasoactivo (VIP, *vasoactive intestinal peptide*) (Tremblay et al., 2016). Otros marcadores relevantes como la reelina, las proteínas de unión al calcio calretinina (CR) y calbindina (CB), la colecistoquinina (CCK) y el neuropéptido Y (NPY) presentan mayor superposición y no permiten definir subpoblaciones tan discretamente separadas de interneuronas (Tremblay et al., 2016). Respecto a la morfología, se diferencian las interneuronas

de tipo “cesto” (*basket cells*), que pueden ser de tipo PV+ o CCK+ y establecen conexiones axo-somáticas conocidas como terminales perisomáticos que resultan fundamentales para el control inhibitorio de las neuronas piramidales (Freund & Katona, 2007). Por otro lado, se encuentran las interneuronas de tipo “candelabro” (*chandelier cells*), que establecen sinapsis de tipo axo-axónicas alrededor del segmento inicial del axón de las neuronas piramidales y pertenecen al grupo de las PV+. Otro tipo de morfologías que se distinguen, por ejemplo, son las células de *Martinotti* que expresan SOM y son interneuronas con un bajo umbral de disparo y se conectan con las dendritas distales de las células piramidales, regulando así la excitabilidad dendrítica. Además, existen las células de *doble bouquet* CR+, que establecen sinapsis simétricas con otro tipo de interneuronas y pueden desempeñar un papel en la desinhibición de las neuronas piramidales (Markram et al., 2004). De esta forma podemos entender que los distintos subtipos de interneuronas GABAérgicas presentes en la PFC favorecen las funciones de los circuitos corticales, participan en la generación y mantención de las oscilaciones fundamentales de la red (Bartos et al., 2007) y mantienen el equilibrio excitación/inhibición de la corteza (Shu et al., 2003).

Interneuronas GABAérgicas parvalbúmina (PV+)

En términos poblacionales, las interneuronas PV+ representan aproximadamente el 40% de las interneuronas neocorticales y pertenecen a un subgrupo bien definido, ya que la coexpresión de PV con otros marcadores resulta ser baja o nula (Gonchar et al., 2008). Se distribuyen en subpoblaciones de células tipo “cesto” y tipo “candelabro”, ejerciendo un control inhibitorio sobre las células piramidales de la mPFC tanto en los somas como en regiones del cono axónico. De esta forma, las interneuronas PV+ constituyen un elemento del microcircuito cortical especialmente dotado para influir de manera importante sobre la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales y, por lo tanto, de los elementos de proyección de la corteza (H. Hu et al., 2014). Desde el punto de vista electrofisiológico, las interneuronas PV+ en su mayoría presentan un patrón de actividad característico de alta frecuencia, con potenciales de acción cortos y de baja acomodación, motivo por el cual se las clasifica en estudios *ex vivo* bajo la denominación FS (*fast-spiking interneurons*) (H. Hu et al., 2014). Se sabe que la activación de este tipo de interneuronas resulta fundamental para la generación y mantención de ritmos oscilatorios locales en la PFC, como lo son las oscilaciones de frecuencia gamma (30-90 Hz), relacionadas a respuestas

conductuales y funciones cognitivas como la memoria de trabajo (Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009; Uhlhaas & Singer, 2010). A nivel del microcircuitos de la mPFC, las interneuronas PV+ cumplen un rol fundamental en la integración temporal de la información. Dado que las aferencias de la mPFC conectan tanto neuronas excitatorias como inhibitorias, la participación de las interneuronas PV+ en los microcircuitos determinan un retraso o delay en la señalización y consecuentemente inhiben a las neuronas piramidales mediante mecanismos de propagación negativa o “*feed-forward inhibition*” (Pouille & Scanziani, 2001). Este fenómeno define una función general de las interneuronas como reguladoras de las ventanas temporales en las que las neuronas piramidales están disponibles para disparar, cumpliendo un rol en la regulación de la temporalidad o “*timing*”. Es así que las interneuronas PV+ cumplen un papel fundamental en el mantenimiento de los niveles de actividad excitatoria e inhibitoria de los microcircuitos corticales, más específicamente, en el balance excitación/inhibición (Shu et al., 2003). Las alteraciones en dicho balance y en las oscilaciones gamma de la mPFC han sido relacionadas con la fisiopatología de la esquizofrenia especialmente con lo que respecta a los déficits cognitivos presentes en esta patología (Nahar et al., 2021; Spencer et al., 2004; Uhlhaas & Singer, 2010).

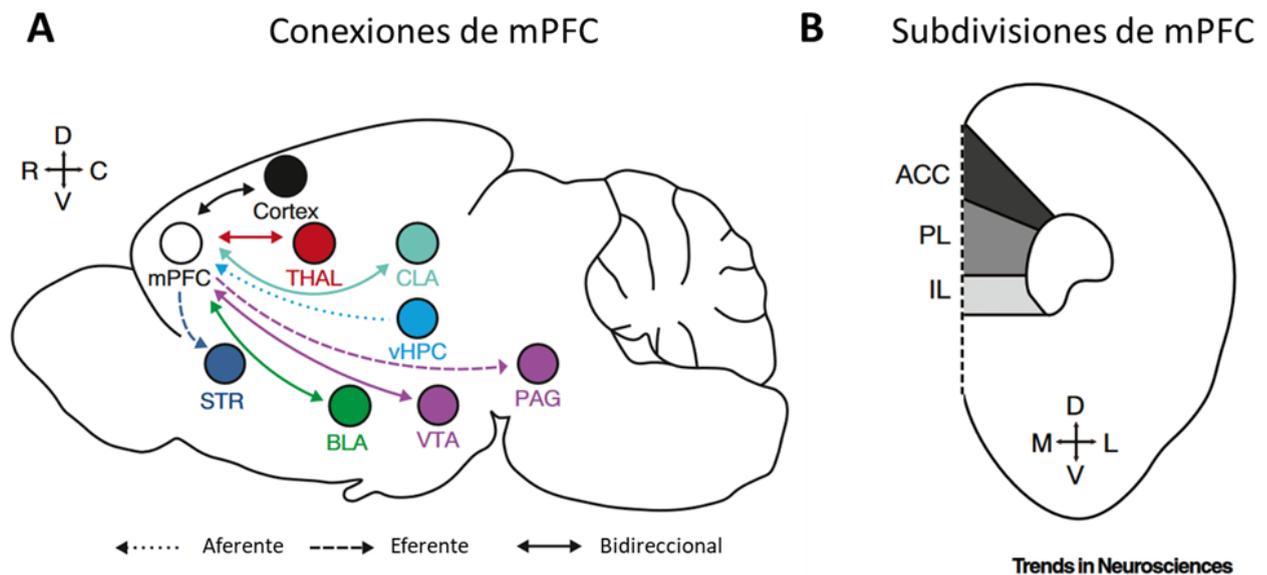


Figura 11. Organización general de la corteza prefrontal medial (mPFC) de roedores (extraído de Anastasiades & Carter, 2021). (A) Esquema de un corte sagital del cerebro de ratón. Se indican las regiones claves del cerebro que se comunican con la mPFC, ya sea por vías de entrada (aferentes) y vías de salida (eferentes), o haciendo conexiones recíprocas con la mPFC (bidireccionales). (B) Esquema de un corte coronal mostrando las subdivisiones de la mPFC a lo largo del eje dorsoventral. Direcciones: D, dorsal; V, ventral; R, rostral; C, caudal; M, medial; L, lateral. Regiones: BLA, amígdala basolateral; CLA, claustrum; PAG, sustancia gris periacueductal; STR, estriado; THAL, tálamo; vHPC, hipocampo ventral; VTA, área tegmental ventral. Subdivisiones de mPFC: ACC, corteza cingulada anterior; PL, área prelímbica; IL, área infralímbica.

Características del desarrollo de interneuronas PV

Durante el desarrollo postnatal de los circuitos corticales, las interneuronas PV experimentan un considerable proceso madurativo. Esta maduración se relaciona con un aumento en los niveles de ARN mensajero y proteína parvalbúmina (Caballero & Tseng, 2016), lo que a su vez se correlaciona con los niveles de actividad de las interneuronas PV (Donato et al., 2013). A su vez, aumentan los niveles de GAD67, la enzima limitante en la síntesis del neurotransmisor “ácido gamma-aminobutírico” (GABA). Es interesante destacar que, durante la adolescencia, los contactos excitatorios sobre estas interneuronas sufren un refinamiento sináptico, podado o *pruning* (Chung et al., 2017). El refinamiento de estas sinapsis se produciría de manera diferencial entre los contactos excitatorios locales y distales, optimizando el reclutamiento de las interneuronas PV por parte de los elementos del circuito local maduro en la vida adulta (J. Lu et al., 2014).

Se considera que alteraciones en los procesos normales de maduración de estas interneuronas, durante períodos críticos de vulnerabilidad como lo es la adolescencia, podría determinar una maduración anómala de los microcircuitos corticales y asociarse con la fisiopatología de la esquizofrenia (Caballero & Tseng, 2016; Sakurai & Gamo, 2019). Se ha reportado en pacientes con esquizofrenia una reducción en la densidad de entradas excitatorias a nivel de la PFC, producto de procesos anormales de *pruning* asociado a las alteraciones que presentan las interneuronas PV (Chung et al., 2016).

En base a lo hasta aquí planteado, queda en evidencia la importancia de las interneuronas PV en los procesos normales del neurodesarrollo, tanto de los circuitos corticales de la PFC como de la mantención de ritmos oscilatorios locales y el balance E/I, cobrando particular interés en el estudio de la fisiopatología de la esquizofrenia (Chung et al., 2016; Enwright et al., 2016).

Funciones de la Corteza Prefrontal

La corteza prefrontal es considerada una estructura de alta jerarquía a nivel del desempeño comportamental de los animales y se la ha vinculado con una amplia gama de funciones cognitivas y emocionales complejas. Entre ellos se destaca su participación en las llamadas funciones ejecutivas (Chudasama, 2011; Koechlin, 2016), procesos de control cognitivo necesarios para el desarrollo correcto de secuencias complejas del comportamiento. Aquí participan procesos que evalúan el estado interno del individuo, integrando la información sensorial, de experiencias previas (Frankland et al., 2004; Takashima et al., 2006) y procesos atencionales (Paneri & Gregoriou, 2017). Dicha integración participa en la planificación, la toma de decisiones (V. J. Brown & Bowman, 2002; Holroyd et al., 2002) y el autocontrol ejecutivo (Posner et al., 2007), lo que sustenta las conductas dirigidas a metas (Hok et al., 2005; Mansouri et al., 2017). Además, la mPFC cumple una función clave en la memoria de trabajo (Alexander & Goldman, 1978; Goldman-Rakic, 1995), y recientemente, se ha comenzado a estudiar su rol en el procesamiento de emociones, habiéndose demostrado su capacidad de codificar estímulos sociales (Murugan et al., 2017). Disfunciones en la PFC desencadenaría alteraciones cognitivas y emocionales, incluyendo aquellas que ocurren a nivel de la cognición social y las conductas sociales inapropiada en desórdenes neuropsiquiátricos, incluyendo el autismo y la esquizofrenia (Green et al., 2015; Phillips et al., 2018; Uddin, 2011). Sin embargo, es muy poco lo que se sabe acerca de cuáles son los mecanismos que posee la mPFC en cuanto a la integración y codificación de información relevante durante tareas conductuales que requieren de la integración contextual y afectiva para un correcto desempeño comportamental (Hyman et al., 2012), ni cómo dichos mecanismos responden frente a demanda cognitiva creciente. En este aspecto se ha propuesto que la vía monosináptica hipocampo-prefrontal juega un papel importante en el control de la mPFC (ver BOX 1) en cuanto a su rol en la memoria y el aprendizaje, así como en la regulación emocional (Sigurdsson & Duvarci, 2016). Se ha reportado que esta vía juega un papel importante en la patogénesis de la esquizofrenia (Sigurdsson et al., 2010), y se ha demostrado que modelos murinos de esta enfermedad presentan una disminución en la conectividad funcional de esta vía (Alvarez et al., 2020). Estos hallazgos dotan de vital interés a la vía vHP-mPFC, tanto para comprender cómo la mPFC integra información proveniente de estructuras relevantes a nivel comportamental como lo es el vHP y que tipos de alteraciones presenta la comunicación entre estas estructuras en un contexto patológico como ocurre en la esquizofrenia.

Corteza Prefrontal y Esquizofrenia

Como hemos mencionado hasta el momento, la PFC resulta ser una región del cerebro considerada de alta jerarquía en el desempeño comportamental. A lo largo de los años los estudios han sugerido que alteraciones en esta corteza podrían explicar las alteraciones funcionales de enfermedades neuropsiquiátricas como lo es la esquizofrenia.

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico grave que se caracteriza por disfunciones cognitivas importantes, muchas de las cuales son controladas por la PFC, como las funciones ejecutivas, la toma de decisiones, la memoria de trabajo y aspectos de la cognición social (Glahn et al., 2003; Green et al., 2015; P. J. Snyder et al., 2008). Parte de la evidencia que vincula esta región con la esquizofrenia proviene de estudios post-mortem de pacientes esquizofrénicos en los que se reportan alteraciones estructurales en la PFC, como una reducción en el volumen cortical, disminución en la materia gris y alteraciones morfológicas en las neuronas corticales (Cannon et al., 2002; Glantz et al., 2006; W. Hu et al., 2015). Más aún, se han reportado alteraciones en la actividad oscilatoria local de la PFC, como la actividad oscilatoria de tipo gamma (30-90 Hz) (Cho et al., 2006; Uhlhaas & Singer, 2010), vinculada a la memoria de trabajo (Howard et al., 2003); y alteraciones en la conectividad de la PFC con otras áreas del cerebro fundamentales para el desempeño cognitivo, como el hipocampo y el tálamo (Andreasen et al., 1996; Meyer-Lindenberg et al., 2005). Estos hallazgos, a su vez, se suman a la idea de que alteraciones en el curso normal del neurodesarrollo de la PFC junto con otras regiones del cerebro podrían ser fundamentales en el estudio de la etiología y la fisiopatología de la esquizofrenia (Nakazawa et al., 2012). A continuación profundizaremos sobre la esquizofrenia, abordando la sintomatología, la etiología y la fisiopatología de esta enfermedad.

BOX 1. Vía hipocampo ventral-corteza prefrontal medial

El hipocampo (HP) y la corteza prefrontal (PFC) son dos estructuras fundamentales para el control de conductas y funciones cognitivas en el cerebro. El HP se puede subdividir en dos subregiones anatómicas y funcionales: la dorsal y la ventral. Múltiples estudios han demostrado que la región dorsal (septal) estaría más involucrada en la navegación espacial, mientras que la región ventral (o temporal) tendría mayor relevancia en el control de conductas motivacionales y emocionales (Bannerman et al., 2004; Kjelstrup et al., 2002). Por otro lado, la PFC es esencial para la regulación de funciones ejecutivas, la toma de decisiones, la memoria de trabajo y el control de las emociones (Kesner & Churchwell, 2011; Miller & Cohen, 2001). Ambas estructuras cerebrales se comunican mediante varias vías polisinápticas y, en particular, por una vía monosináptica que proyecta desde el hipocampo ventral (vHP) a la corteza prefrontal medial (mPFC) (Barbas & Blatt, 1995; Condé et al., 1995; Hoover & Vertes, 2007). Esta conexión provee de información contextual relevante a la mPFC y juega un papel clave en la modulación de comportamientos emocionales como el miedo y la ansiedad (Adhikari et al., 2010; Padilla-Coreano et al., 2016; Sotres-Bayon et al., 2012).

La actividad eléctrica del HP se caracteriza por presentar oscilaciones theta (4-12 Hz) prominentes durante la actividad exploratoria y el sueño REM (Buzsáki, 2002; Fujisawa & Buzsáki, 2011). Se ha descrito que la actividad de neuronas únicas de la mPFC puede ser modulada por el ritmo theta del vHP, es decir, que las neuronas disparan preferencialmente en alguna fase de la oscilación (lo que se conoce como sincronización o “enganche de fase”) (Siapas et al., 2005). Además, se ha observado que esta interacción HP-PFC es capaz de fluctuar dinámicamente en diferentes tareas conductuales y cognitivas (Bähner et al., 2015; Gordon, 2011; Spellman et al., 2015). Sin embargo, todavía se desconoce de qué manera la vía vHP-mPFC participa en el procesamiento de información contextual relevante y sostiene la toma de decisiones, la carga cognitiva y el desempeño comportamental.

Alteraciones en dicha vía han sido reportadas tanto en pacientes con esquizofrenia como en modelos animales (Godsil et al., 2013; Meyer-Lindenberg et al., 2005; Sigurdsson et al., 2010; Tost et al., 2012). De hecho, en nuestro modelo animal útil para el estudio de la esquizofrenia (Belforte et al., 2010), hemos registrado alteraciones en la conectividad funcional de la vía vHP-PFC en animales anestesiados (Alvarez et al., 2020). Aún resta por comprender qué rol cumple la interacción vHP-mPFC en el control de la exploración y en comportamientos con componentes emocionales, en animales despiertos, y qué posibles alteraciones en dicha interacción se encuentran alteradas en la esquizofrenia.

Esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno mental severo con graves consecuencias en las capacidades cognitivas, emocionales y comportamentales de las personas que la sufren. Se trata de una de las enfermedades neuropsiquiátricas más debilitantes que existen, dada su complejidad, su carácter crónico y por ser altamente invalidante para los pacientes. Se caracteriza por un deterioro sostenido de varios aspectos del funcionamiento psíquico del individuo, principalmente la conciencia de la realidad y una desorganización en el desempeño de funciones ejecutivas que se correlaciona con una dificultad para mantener conductas motivadas y dirigidas a metas. Todo esto tiene consecuencias significativas sobre la cognición social (ver BOX 2), interfiriendo en las conexiones sociales y siendo determinantes en el grado de deterioro del funcionamiento cotidiano de los pacientes.

Epidemiología

Desde el punto de vista epidemiológico, la esquizofrenia es considerada uno de los principales problemas médicos a nivel mundial, a pesar de su relativa baja incidencia. Se estima que la prevalencia de padecer esquizofrenia es cercana al 1% de la población mundial (Saha et al., 2005), el doble que lo observado en Alzheimer y seis veces más prevalente que la diabetes insulino-dependiente (Jablensky, 1997), con una incidencia anual estimada de 15,2 cada 100.000 habitantes (McGrath et al., 2004) y aproximadamente 0,7% de riesgo promedio de prevalencia. En Argentina se estima que de la población total de 47 millones de habitantes, el total de personas afectadas con esquizofrenia se ubicaría en el rango de 300.000 a 500.000 (aproximadamente el 1% de los habitantes). Típicamente, el inicio de la esquizofrenia suele ser entre los 16 y 30 años de edad (etapa de transición entre la adolescencia y la adultez temprana), impactando en la expectativa de vida de los pacientes con una reducción de entre 10 y 25 años (Laursen et al., 2014) y llevando al 10% de los pacientes a cometer suicidio. La incidencia por sexo es de alrededor de 1,4 (hombre/mujer), con un comienzo de los síntomas en etapas más tempranas para los hombres (entre 20-30 años) y en las mujeres puede extenderse hasta los 45 años (Abel et al., 2010). Al igual

que ocurre en otras enfermedades mentales, la esquizofrenia, además de ser devastadora para quien la padece, tiene graves consecuencias tanto en la vida de los familiares, como económicas en cuanto al cuidado y tratamiento de los pacientes. En los Estados Unidos se estima que los costos asociados a la enfermedad podrían superar los 150 billones de dólares anuales (Cloutier et al., 2016). A pesar de ser un trastorno que afecta al 1% de la población, tales costos son atribuibles a que se trata de una enfermedad que comienza en etapas tempranas de la adultez con deficiencias a largo plazo que impactan directamente en las funciones sociales y laborales (Andreasen, 1979).

Los datos epidemiológicos disponibles dependen ampliamente de un correcto diagnóstico, el cual se ve afectado por una marcada heterogeneidad clínica y por la falta de marcadores biológicos específicos. Hoy en día el diagnóstico continúa siendo eminentemente clínico (Owen et al., 2016), y se basa en clasificaciones multidimensionales y en la separación de los distintos dominios psicopatológicos en grupos.

BOX 2. Cognición social y esquizofrenia

La cognición social hace referencia a los procesos psicológicos que intervienen en la percepción, el procesamiento y la utilización de la información social. Esta habilidad es de vital importancia en el desempeño de conductas sociales, tanto sean cooperativas, confrontativas o sexuales. En la esquizofrenia, la cognición social se encuentra gravemente alterada, lo que se traduce en dificultades para interpretar y responder adecuadamente a claves sociales (expresión facial, lenguaje corporal, espacio personal, etc). Varios estudios han demostrado que los pacientes con esquizofrenia tienen déficits en la percepción de información emocional, la teoría de la mente, la comprensión de las intenciones de los demás, la empatía y la toma de perspectiva social (Green et al., 2015; Pinkham, 2014; Vaskinn et al., 2015).

Estos déficits tienen un impacto negativo en la capacidad de los pacientes para establecer relaciones sociales significativas, afectando la motivación y agudizando síntomas negativos como la retracción social. En general, los déficits en la cognición social representan un importante obstáculo para la recuperación de los pacientes y la mejora de su calidad de vida. Es así que resulta crucial investigar los déficits en la cognición social en la esquizofrenia para encontrar nuevas opciones terapéuticas en el futuro. Se ha reportado en estudios realizados en humanos y en otros primates que la corteza prefrontal (PFC), una región especialmente afectada en la esquizofrenia, desempeña un papel importante en el procesamiento de información de tipo social (Adolphs, 2009; Grossmann, 2013; Van Overwalle, 2009). Estudios electrofisiológicos realizados en roedores han demostrado que las neuronas de la mPFC responden diferencialmente a los estímulos sociales (E. Lee et al., 2016; Levy et al., 2019; Murugan et al., 2017; Zhao et al., 2022). Sin embargo, todavía se necesita entender mejor los mecanismos a través de los cuales la PFC interviene en la codificación de la información de tipo social y cómo las alteraciones en esta codificación se relacionan con la esquizofrenia.

Reseña histórica del concepto de esquizofrenia

Las primeras definiciones conceptuales de la esquizofrenia se remonta a fines del siglo XIX, donde Benedict Morel introduce el término “*démence précoce*”, posteriormente conceptualizado por Emil Kraepelin (*dementia praecox*), basándose en los trabajos de Karl Ludwig Kahlbaum y Ewald Hecker (Falkai et al., 2015; Häfner, 2014). Dentro de la demencia precoz, Kraepelin agrupó a la hebefrenia, la catatonía y las demencias paranoides (Corrales et al., 2021). Además, distinguió la psicosis manía-depresiva de otras enfermedades psicóticas crónicas (Zivanovic & Nedic, 2012), remarcó la existencia de factores hereditarios y consideró que el sustrato biológico de este trastorno mental podría circunscribirse a la corteza cerebral de los lóbulos frontales (Falkai et al., 2015). Si bien la concepción kraepeliana de demencia precoz tuvo amplia difusión en la época, los procedimientos de su artífice resultaron excesivamente rígidos para el desarrollo del conocimiento psiquiátrico (Enric J. & Rafael, 2010).

Posteriormente, en 1908, Eugen Bleuler introdujo el término “esquizofrenia” (del griego *schizo*, «división», y *phrenos*, «mente»), refiriéndose a la demencia precoz como “grupo de las esquizofrenias” (Ashok et al., 2012). Este término resaltaba uno de los síntomas fundamentales descritos hasta el momento en los pacientes: la fragmentación en la formulación y expresión de los pensamientos. Propuso diagnosticar la enfermedad por la presencia de cuatro signos o síntomas que él consideraba fundamentales o primarios (las cuatro A de Bleuler): profunda ambivalencia, pérdida de la asociación, perturbaciones afectivas y pensamiento autista. Estos síntomas se caracterizaban por perdurar durante el curso de la enfermedad, diferenciando otros síntomas secundarios o “accesorios” (como los delirios y las alucinaciones), que también estaban presentes en otros trastornos. De esta forma, Bleuler afirmaba que la esquizofrenia no era una entidad única, sino un grupo de enfermedades que aún no eran accesibles al diagnóstico (Hoff, 2012).

Tanto las ideas de Kraepelin como las de Bleuler son consideradas preeminentes a nivel conceptual, pero no fue hasta las siguientes décadas donde las contribuciones de Kurt Schneider (1959, 1974) y Karl Jaspers (1963, 1968) enriquecieron al diagnóstico de la enfermedad desde su punto de vista más pragmático. Jaspers se propuso a describir la estructura subjetiva de las experiencias anormales (vivencias psicóticas), destacando la incomprensión de los relatos como una característica fundamental de la esquizofrenia (*non-understandability*) (Enric J. & Rafael, 2010). De esta misma forma, Schneider puso el foco del diagnóstico en aquellos síntomas

compatibles con experiencias cualitativamente alteradas (clasificados como “*first-rank symptoms*”). Este grupo incluía a los pensamientos audibles, extracción o inserción del pensamiento, difusión del pensamiento y percepciones delirantes. A su vez, hizo distinción en las alucinaciones u otros trastornos perceptivos presentes en un amplio rango de desórdenes mentales (los “*second-rank symptoms*”). Es así que Schneider propone que hay tipos específicos de experiencias psicóticas que ocurren únicamente en la esquizofrenia, dándole preponderancia a aspectos que originalmente Kraepelin y Bleuler habían considerado reactivos o secundarios (Enric J. & Rafael, 2010). Dicho viraje en el diagnóstico tuvo influencia sobre las clasificaciones diagnósticas vigentes y se refleja en la inclusión de los síntomas de primer orden entre los criterios para el diagnóstico de la esquizofrenia en la ICD-9 de 1977, y en los DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) edición III (1980), III-R (1987), IV (1994) y IV-TR (2000) (Andreasen & Carpenter, 1993; Kendler & Mishara, 2019).

Posteriormente, con el avance de los estudios de neuroimágenes y de las manifestaciones clínicas, surgen importantes estudios internacionales orientados hacia la estandarización diagnóstica de la esquizofrenia (Sartorius et al., 1974). El grupo de Carpenter en 1974 propuso agrupar los signos y síntomas en tres categorías, hipotetizando que distintos procesos patológicos podrían subyacer a cada una de ellas (Carpenter et al., 1974). De esta forma, agruparon los síntomas en: los síntomas positivos (delirios, alucinaciones, trastornos motores catatónicos), que corresponden a procesos activos con aparición y resolución más o menos precisa, y son de naturaleza relativamente flexible; los síntomas negativos (apatía, aplanamiento afectivo), caracterizados por la ausencia o pérdida de funciones normales, que siguen un curso más bien inflexible; y por último a los trastornos de las relaciones personales, que plantearon como de evolución independiente en relación a las otras dos categorías. Por otro lado, Crow (1980) propone un modelo de dos síndromes de la esquizofrenia: el síndrome tipo I, que recapitula la mayoría de los síntomas positivos, con buena respuesta al tratamiento con antipsicóticos, potencialmente reversible y asociado a un aumento de receptores dopaminérgicos de tipo D2; mientras que el síndrome tipo II incluye síntomas negativos, a veces asociado a alteraciones intelectuales, con escasa respuesta al tratamiento farmacológico antipsicótico, escasa o nula remisión sintomática, y patológicamente asociado a alteraciones estructurales a nivel de interneuronas (Crow, 1980, 1985). Si bien este modelo no perduró, tanto la contribución de Crow como la del grupo de Carpenter resultaron fundamentales para el desarrollo del concepto de “dominios” en la esquizofrenia, y más aún, se destaca la

relevancia de una relación dicotómica entre los síntomas positivos y negativos en esta enfermedad (Marneros et al., 1991).

En la actualidad, esta dicotomía se sigue reflejando en la última edición del DSM (DSM-5-TR), teniendo para el diagnóstico aún mayor peso los síntomas positivos que en los negativos. Así el manual indica como síntomas característicos: delirios, alucinaciones, discurso desorganizado, conducta desorganizada o catatónica, y síntomas negativos, como disminución de la expresión y abulia (DSM-5). Por otro lado, el ICD-11 incluye un total de seis dominios sintomáticos para la definición clínica de la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos primarios: síntomas positivos, síntomas negativos, síntomas depresivos, síntomas maníacos, síntomas psicomotores y síntomas cognitivos (ICD-11).

Esta breve reseña sobre la evolución del concepto nosológico de la esquizofrenia da idea sobre la complejidad y marcada heterogeneidad que existe en la conceptualización y caracterización de la esquizofrenia como trastorno mental. Más específicamente, el desconocimiento que existe sobre la etiología (el origen o las causas que subyacen a la enfermedad) y la fisiopatología general (los procesos patológicos presentes) son factores que determinan la falta de un tratamiento efectivo. A continuación vamos a describir en más detalle las afecciones más frecuentes en relación a los dominios sintomáticos que se consideran en la actualidad.

Sintomatología

Síntomas positivos

Dentro de esta categoría se encuentran los síntomas relacionados con la aparición de procesos activos que determinan un aumento o exageración de funciones por sobre lo considerado como normal. Dichos síntomas se caracterizan por una marcada alteración en el juicio de “lo que es real y lo que no”, tales como las alucinaciones, los delirios, los pensamientos desorganizados y, en algunos casos, acompañados por manifestaciones psicomotoras. En términos generales, los síntomas positivos responden bien al tratamiento con antipsicóticos. En los pacientes se pueden observar recaídas o remisión de estos síntomas, aunque una fracción de los pacientes experimentan síntomas psicóticos residuales a largo plazo (Owen et al., 2016).

Las alucinaciones son experiencias sensoriales que ocurren en ausencia total de un estímulo sensorial en el campo perceptivo. Estas pueden ocurrir en cualquiera de las modalidades sensoriales, pero las más comunes en la esquizofrenia suelen ser alucinaciones auditivas (Leon et al., 1993). En su mayoría suelen ser descritas como voces que se dirigen al paciente o pueden incluso dialogar entre ellas. Pueden repetir pensamientos, indicar acciones, opinar y juzgar sobre las acciones de los pacientes e incluso advertir de posibles peligros. Por medio de estudios de imágenes funcionales en humanos se observó que existe una correlación entre las zonas del cerebro que participan durante la percepción de un estímulo auditivo normal y los que se perciben durante un episodio de alucinaciones auditivas (Shergill et al., 2000; Silbersweig et al., 1995). Recientemente, un estudio novedoso realizado en humanos y en roedores abordó la posibilidad de que las percepciones símil-alucinatorias (tener la confianza de haber recibido una señal auditiva cuando en realidad se trata de una falsa alarma), comparten los mecanismos neurales con las alucinaciones espontáneas. Dichos episodios “símil-alucinatorios” estarían mediados por altos niveles de dopamina en el estriado, que producirían un sesgo a favor de las expectativas previas frente a la evidencia sensorial actual (Schmack et al., 2021).

Los delirios hacen referencia a ideas o creencias falsas mantenidas con una fuerte convicción, carentes de lógica alguna y que no pueden ser atribuidas a la educación, la cultura o el entorno social del paciente (Mishara & Fusar-Poli, 2013). Los delirios pueden ser de distintos tipos (de

inserción, robo o difusión del pensamiento, de control, persecutorios, etc.) y variar en cuanto al grado de sistematización y persistencia, afectando en mayor o menor grado la función del paciente (Tandon et al., 2008).

La mayoría de los pacientes con esquizofrenia presentan algún grado de deterioro en el procesamiento de los pensamientos. Dentro de los pensamientos desorganizados se pueden destacar algunas de las alteraciones presentes en el discurso como: retardo (pausas prolongadas), circunstancialidad (detalles innecesarios), tangencialidad (no llegar al punto), descarrilamiento (sin conexión entre pensamientos), bloqueo (pausa abrupta) y perseveración (recurrencia del pensamiento) (Andreasen, 1979).

Síntomas negativos

Como contraparte de los síntomas positivos, podemos pensar a los síntomas negativos como una disminución o negación de los procesos normales (Berrios, 1985). En términos generales, los síntomas negativos están conceptualizados como desórdenes de omisión (o cosas que los pacientes no hacen). Dentro de este grupo se encuentran: la abulia (pérdida de iniciativa, falta de energía e inconstancia en actividades), la alogia (pobreza de lenguaje), la apatía (falta de interés), la anhedonia (falta de placer), el aplanamiento afectivo y la retracción social (falta de interés en el contacto social).

Los síntomas negativos son aún más importantes que los positivos para la prognosis de la esquizofrenia. En muchos casos preceden a la manifestación de la sintomatología positiva y suelen persistir una vez que remiten los síntomas positivos. Presentan una pobre respuesta al tratamiento farmacológico actual, muchas veces siendo refractarios a los mismos y en su conjunto resultan altamente debilitantes para los pacientes (Tandon et al., 2009). No todos los síntomas negativos poseen el mismo peso. Actualmente se considera a los síntomas negativos primarios como los “síntomas de déficit” (intrínsecos y fundamentales a la enfermedad), y a los secundarios asociados a factores extrínsecos (factores ambientales, tratamiento antipsicótico, depresión concomitante) (Carpenter et al., 1988; Kirkpatrick et al., 2006; Tandon et al., 2009). Esta distinción permitió que la investigación se centrará en los síntomas de déficit, enriqueciendo su validez a través de estudios neuropsicológicos, neurológicos, de neuroimágenes, y por sobre la estabilidad temporal, la historia

evolutiva y la respuesta al tratamiento (Kirkpatrick et al., 2001). La caracterización de los síntomas primarios además resulta fundamental en el ámbito del tratamiento farmacológico y el descubrimiento de nuevos fármacos y enfoques novedosos como los antipsicóticos, que hasta el momento no han mostrado ser muy eficaces para el tratamiento de los síntomas negativos (Arango et al., 2004; Kirkpatrick et al., 2006).

Síntomas cognitivos

Desde las descripciones tradicionales de Kraepelin (1919) y Bleuler (1911), los déficits cognitivos son considerados características fundamentales de la esquizofrenia. Los pacientes pueden exhibir alteraciones cognitivas previo, durante y con posterioridad a la manifestación inicial de los primeros síntomas psicóticos (Caspi et al., 2003; Good, 2004; Simon et al., 2007). De esta forma, los déficits cognitivos suelen considerarse como los mejores predictores de la evolución funcional de los pacientes y al principio se manifiestan de forma sutil, siendo usualmente detectados por medio de baterías de análisis cognitivo. El más reconocido proviene del NIMH (*National Institute of Mental Health, USA*) bajo la iniciativa de nombre MATRICS (*Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia*). De estos trabajos se distinguen como dimensiones fundamentales de los déficit cognitivos presentes en la esquizofrenia, las alteraciones en: funciones ejecutivas, velocidad de procesamiento, atención/vigilancia, aprendizaje y memoria (tanto verbal como visual), razonamiento y resolución de problemas; y de particular interés para el desarrollo de esta tesis, déficit en la memoria de trabajo (Glahn et al., 2003; P. J. Snyder et al., 2008) (ver BOX 3).

La mayoría de los pacientes con esquizofrenia presentan al menos algún deterioro cognitivo, y como se ve en otros aspectos de la enfermedad, la gravedad y la amplitud de los deterioros varían de un paciente a otro. Una característica bastante singular de los déficits cognitivos es que permanecen relativamente estables en el mismo paciente a lo largo del tiempo (Harvey et al., 1990). Al igual que ocurre con los síntomas negativos, las alteraciones cognitivas presentan una leve respuesta frente al tratamiento antipsicótico disponible (Keefe et al., 2007; Klingberg et al., 2008) lo que indicaría la presencia de componentes fisiopatológicos adicionales a la disregulación dopaminérgica propuesta para los síntomas positivos. Existe evidencia que asocia los déficits cognitivos con alteraciones estructurales a nivel de interneuronas GABAérgicas (Nahar et al., 2021;

Spencer et al., 2004; Uhlhaas & Singer, 2010), evidenciado por alteraciones en los ritmos de actividad local de la corteza prefrontal y que a su vez acompaña la idea de deterioros o alteraciones en etapas críticas del neurodesarrollo.

Otros aspectos clínicos

Los pacientes con esquizofrenia también pueden presentar síntomas psicomotores con episodios de inmovilidad o enlentecimiento (más asociado a los síntomas negativos), y por otro lado presentar hiperactividad y agitación psicomotora especialmente en situaciones estresantes (síntomas positivos). En ocasiones puede hacerse manifiesto un síndrome catatónico con ecopraxia, ecolalia, obediencia automática, flexibilidad cérica y negativismo extremo (Tandon et al., 2009). Es importante destacar que la catatonia ha sido considerada como un subtipo de esquizofrenia en todas las ediciones recientes del DSM y el ICD.

Asimismo, ya desde las conceptualizaciones más tradicionales se ha planteado la presencia de síntomas de ansiedad como característicos de la esquizofrenia, incluso se encuentran presentes de manera temprana en la evolución de la enfermedad. De esta forma, se describe que los trastornos de ansiedad y el trastorno obsesivo compulsivo son frecuentemente comórbidos en los pacientes con esquizofrenia (Tandon et al., 2009).

También se ha asociado a la esquizofrenia con alteraciones en la integración sensoriomotora (*sensorimotor gating*). Se ha observado en pacientes que presentan una disminución en la respuesta normal de inhibición del reflejo de sobresalto por prepulso (PPI, *prepulse inhibition of the startle reflex*). Esta alteración se ha planteado como un posible endofenotipo y su estudio es ampliamente utilizado en el abordaje preclínico de la esquizofrenia (San-Martin et al., 2020; Swerdlow et al., 2018).

BOX 3. Memoria de trabajo y esquizofrenia

La memoria de trabajo hace referencia a un proceso cognitivo que permite mantener temporalmente y manipular información en la mente para realizar tareas complejas. Es una función esencial para la vida cotidiana, ya que permite planificar, resolver problemas y tomar decisiones. En la esquizofrenia, se han observado alteraciones en la memoria de trabajo que afectan secundariamente otras funciones cognitivas, como la orientación visual, la memoria de rostros y objetos, así como otras funciones ejecutivas (Galletly et al., 2007; Piskulic et al., 2007). Se ha propuesto a la PFC con un prominente rol en la formación de este tipo de memorias (Goldman-Rakic, 1995). En este sentido, la actividad neuronal oscilatoria del circuito local de la PFC conocida como oscilaciones gamma (30-80 Hz), está asociada con la memoria de trabajo. En sujetos sanos, la amplitud de las oscilaciones gamma en la mPFC aumenta en relación a la carga de memoria de trabajo a la que es sometido un individuo (Howard et al., 2003; Jensen et al., 2007; Thompson et al., 2021). Los pacientes con esquizofrenia muestran una disminución relativa de la potencia gamma en respuesta a las demandas de la memoria de trabajo (Uhlhaas & Singer, 2010). Además, estudios previos han reportado que los pacientes con esquizofrenia tienen una disminución de la conectividad funcional entre las áreas cerebrales asociadas con la memoria de trabajo, como la corteza prefrontal dorsolateral y el hipocampo, lo que sugiere una disrupción en la comunicación efectiva entre estas áreas (Godsil et al., 2013; Tost et al., 2012). En roedores, se ha reportado que la vía hipocampo-corteza prefrontal (HP-mPFC) participa en tareas de memoria de trabajo espacial y en la toma de decisiones (Jones & Wilson, 2005; Sigurdsson & Duvarci, 2016; Vogel et al., 2022), y dicha sincronización se encuentra alterada en modelos animales útiles para el estudio de la esquizofrenia (Sigurdsson et al., 2010). En este sentido, se ha visto que nuestro modelo animal, con ablación postnatal temprana de los rNMDA en interneuronas PV+ cortico-límbicas, presenta alteraciones en la memoria de trabajo espacial (Belforte et al., 2010), y a su vez, al estimular el vHP en animales anestesiados se registra una respuesta evocada reducida registrada en la mPFC, consistente con una hipoconexión funcional de la vía vHP-mPFC (Alvarez et al., 2020). Aún resta por caracterizar qué alteraciones circunscriben a nuestro modelo en cuanto a la actividad de neurona única, la actividad poblacional de la mPFC y la sincronización vHP-mPFC en animales despiertos durante momentos de alta demanda cognitiva como lo es la toma de decisiones.

Etiología

A lo largo de las últimas décadas el entendimiento sobre cuáles podrían ser las causas (etiología) de la esquizofrenia aumentó sustancialmente, destacando la importancia tanto de factores genéticos como de factores ambientales y la interacción que existe entre ellos (interacción gen-ambiente, GxE). Desde las definiciones más clásicas, Kraepelin ya destacaba la importancia de factores hereditarios asociados. El riesgo de padecer esquizofrenia posee un correlato con el grado de afinidad genética entre personas afectadas, de manera tal que resulta 10 veces mayor el riesgo en aquellos casos de descendencia directa (Smeland et al., 2020). Estudios en gemelos mostraron que existe un riesgo de padecer esquizofrenia del 40-50% en gemelos monocigóticos (comparten el 100% del material genético), en comparación a gemelos dicigóticos (50% del material genético), con un 10-15% de riesgo (Tandon et al., 2008). De la misma forma, se ha visto que el riesgo es mayor en personas cuyos padres biológicos fueron diagnosticados con esquizofrenia en comparación con los casos de padres adoptivos (Tsuang et al., 1991).

Factores Genéticos

En las últimas décadas, el avance de las técnicas de biología molecular y el mapeo del genoma humano han permitido estudiar la relación entre segmentos cromosómicos específicos y la esquizofrenia. Por medio de análisis de enlazamiento genético (linkage analysis), el cual vincula genes y patrones de enfermedad en familias de alto riesgo, se encontraron anomalías estructurales cromosómicas asociadas a un mayor riesgo de padecer esquizofrenia, como por ejemplo el loci 22q11–12 (Tandon et al., 2008). Luego con técnicas más precisas de asociación de genes de interés al riesgo de padecer esquizofrenia, fue posible evaluar más de 1000 genes candidatos. En su gran mayoría, los diversos genes que han sido estudiados se han relacionado con la maquinaria molecular asociada con la neurotransmisión, entre ellos: neuregulina 1 (NRG1), disbindina (DTNBP1), receptores dopaminérgicos D1-D4 (DRD1-4), *disrupted in schizophrenia 1* (DISC1), catecol-O-metiltransferasa (COMT) y el receptor glutamatérgico metabotrópico 3 (GRM3) (Harrison & Weinberger, 2005; M. A. Snyder & Gao, 2013; Tandon et al., 2008).

Se ha demostrado que la arquitectura genética de la esquizofrenia es muy compleja, heterogénea y poligénica (Henriksen et al., 2017). Incluso con los genes “más prometedores” existieron problemas de reproducibilidad de los resultados y una falta de coherencia en cómo determinados alelos se vinculan con la esquizofrenia (Sanders et al., 2008; Sullivan, 2007). No obstante, es importante destacar que varios de los genes que se han postulado como genes de riesgo para la esquizofrenia están implicados, de manera directa o indirecta, en la regulación de la función de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, de proteínas asociadas a estos, o de vías de señalización relacionadas con estos receptores (Harrison & Weinberger, 2005; M. A. Snyder & Gao, 2013).

Factores Ambientales

Aunque a menudo se hace hincapié en los factores genéticos asociados a la esquizofrenia, los factores de riesgo que actúan en periodos críticos del neurodesarrollo resultan ser fundamentales para el desarrollo de la enfermedad. La adversidad y el estrés en los primeros años de vida (Agid et al., 2000; Tost & Meyer-Lindenberg, 2012), el crecimiento en un entorno urbano, la pertenencia a un grupo minoritario y el consumo de cannabis u otras drogas psicoactivas (Hall & Degenhardt, 2000; Mizrahi et al., 2014; van Os et al., 2010) son algunos ejemplos de los factores ambientales identificados.

Se ha visto que la exposición repetida a factores estresantes durante etapas tempranas de la vida provoca alteraciones neurobiológicas que impactan en el neurodesarrollo y predisponen a que se manifiesten fenotipos patológicos a largo plazo (Agorastos et al., 2019). Respecto a esto, aunque la esquizofrenia típicamente se manifiesta en la etapa de adultez temprana, existe evidencia de que la patogénesis de la enfermedad comienza muy temprano en el neurodesarrollo. Estas pruebas incluyen complicaciones perinatales como infecciones intrauterinas o inanición durante el embarazo, y complicaciones obstétricas como parto prematuro o preeclampsia (Hulshoff Pol et al., 2000; Ursini et al., 2018; Xu et al., 2009). Es así que la exposición a factores ambientales incluso en etapas prenatales son capaces de incidir en las trayectorias normales del neurodesarrollo (A. S. Brown, 2011; Meyer & Feldon, 2010). Más aún, existe evidencia de mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN, la modificación post-traducciona de histonas y la síntesis de ARN no

codificante; asociados al riesgo de desarrollar esquizofrenia como un ejemplo más de interacciones GxE (Smigielski et al., 2020).

Existe un amplio consenso de que la patogénesis de la esquizofrenia se asocia a múltiples factores, tanto genéticos como ambientales. Uno de los modelos más considerados es el “modelo de los dos golpes” (Bayer et al., 1999). Este modelo postula que las alteraciones en el neurodesarrollo durante la etapa perinatal, resultado de la interacción entre predisposiciones genéticas y adversidades, representan el "primer golpe". Esto crea una condición de alta vulnerabilidad que aumenta la susceptibilidad a un "segundo golpe" en etapas posteriores de la vida, debido a la incapacidad para hacer frente a factores ambientales adversos, como el aislamiento social, el estrés o el abuso de drogas, entre otros. Se sugiere que el desarrollo del fenotipo patológico de la esquizofrenia es el resultado de la interacción aditiva de estos "golpes" (Guerrin et al., 2021; Maynard et al., 2001).

Como síntesis de lo que hemos planteado sobre la etiología de la esquizofrenia, podemos destacar que la enfermedad está vinculada a trastornos del neurodesarrollo, donde la acción combinada de factores genéticos y epigenéticos predisponen al individuo a un estado de susceptibilidad sobre los que inciden factores ambientales perinatales y afectan la trayectoria normal del neurodesarrollo que se completa en la etapa de adultez temprana.

Fisiopatología

Diversas teorías referentes a los procesos patológicos presentes en la esquizofrenia han surgido a lo largo de los años. Estas teorías proponen alteraciones sobre distintos sistemas de neurotransmisión a nivel del sistema nervioso central, entre ellos la dopamina, el glutamato y GABA. A continuación veremos aspectos generales de las hipótesis vigentes asociadas a la esquizofrenia respecto de estos sistemas de neurotransmisores.

Hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia

Las primeras estrategias terapéuticas para el tratamiento de la esquizofrenia surgen en la década del 50 con el descubrimiento de los neurolépticos o antipsicóticos “típicos”, tales como la clorpromazina y el haloperidol. En un comienzo estos fármacos fueron estudiados en animales mostrando su relación con el metabolismo de la dopamina (Carlsson, 1974; Carlsson et al., 1957). Los neurolépticos presentaban efectos adversos simil-parkinsonianos que denotaban su efecto sobre la señalización dopaminérgica. Luego se confirmó in vivo su acción como antagonistas de los receptores dopaminérgicos (Seeman, 1987). Experimentos de unión o binding mostraban que la dopamina se unía con mayor potencia a los sitios marcados con [H3]-haloperidol (tritiado), denominando a estos como receptores de antipsicóticos, hoy en día conocidos como receptores para dopamina de tipo D2 (Madras, 2013). Desde entonces, el uso de antagonistas de receptores D2 ha sido utilizado como un tratamiento parcialmente efectivo para la esquizofrenia (Carlsson, 1974). El desarrollo de esta teoría se completaría al conocerse el efecto de la anfetamina (un agonista indirecto de los receptores dopaminérgicos), que en individuos sanos podía provocar episodios psicóticos (Angrist et al., 1975) y a su vez se agravaban los síntomas positivos en pacientes esquizofrénicos (Lieberman et al., 1987). Algunos de los estudios de imágenes en pacientes con esquizofrenia mostraron un aumento en la densidad de receptores de tipo D2 (Seeman, 1987) junto a un aumento en la transmisión dopaminérgica (Laruelle et al., 1996), lo que inicialmente fue muy influyente en el campo de estudio. Todos estos hallazgos sentaron las bases de la teoría dopaminérgica de la esquizofrenia, la cual proponía que un aumento en la liberación

de dopamina era responsable de la aparición de los síntomas asociados a la patología. Sin embargo, los síntomas negativos y cognitivos, permanecían resistentes al tratamiento con los antipsicóticos típicos (Matthysse, 1973), a lo que comienzan a surgir resultados inconsistentes con la simple propuesta de un aumento en la neurotransmisión dopaminérgica. Por ejemplo numerosos estudios comenzaron a mostrar el impacto de la dopamina actuando sobre receptores de tipo D1 en la mPFC y su rol en la memoria de trabajo. Así, para fines de los 80's se propuso actualizar la teoría dopaminérgica proponiéndose que las proyecciones dopaminérgicas hacia regiones subcorticales estarían hiperactivas implicando una hiperestimulación del receptor D2, consecuente con la aparición de los síntomas positivos y el efecto terapéutico de los neurolépticos. Por otro lado, las proyecciones dopaminérgicas dirigidas a la PFC estarían hipoactivas, resultando en la hipoestimulación del receptor D1, trayendo aparejados los síntomas negativos y cognitivos (Davis et al., 1991; Howes & Kapur, 2009). Como las proyecciones dopaminérgicas se originan en una región localizada cerca de la línea media del piso del mesencéfalo, denominada "área tegmental ventral" (VTA, por sus siglas en inglés), surge la controversia sobre la activación diferencial de estas dos vías. La PFC envía proyecciones hacia las distintas poblaciones de neuronas dopaminérgicas en VTA, por un lado excitando directamente a las neuronas dopaminérgicas mesocorticales (que proyectan en sentido VTA-PFC) y a su vez activando neuronas GABAérgicas que inhiben de forma indirecta a las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas (Sesack & Carr, 2002). La disregulación dopaminérgica estaría dada por alteraciones en dichos circuitos durante el neurodesarrollo, determinando la hipofunción mesocortical y la hiperfunción mesolímbica, consistente con la sintomatología de la esquizofrenia. A pesar de la importancia que tiene la teoría dopaminérgica en la psiquiatría clínica, es destacable la pobre respuesta terapéutica de los antipsicóticos frente a los síntomas negativos y cognitivos, lo que sugiere la participación de otros sistemas de neurotransmisión respecto de la fisiopatología y la etiología de la esquizofrenia (Lally & MacCabe, 2015).

Hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia

En paralelo al surgimiento de los antipsicóticos típicos, comienzan las observaciones de que anestésicos, como la fenciclidina (también conocida como PCP o “polvo de ángel”), podían inducir un cuadro similar a la esquizofrenia en individuos sanos bajo dosis subanestésicas (Luby et al., 1959). Posteriormente, se determina el mecanismo de acción de estos fármacos como antagonistas no competitivos del receptor glutamatérgico de tipo NMDA (rNMDA) (Lodge & Anis, 1982). En su conjunto, surgen las bases de la teoría de la hipofunción glutamatérgica de la esquizofrenia, haciendo énfasis en una disfunción asociada a rNMDA. Al igual que el PCP, otros antagonistas no competitivos de rNMDA como la ketamina o la dizocilpina (también llamada MK-801), a bajas dosis pueden inducir un cuadro tipo esquizofrenia en voluntarios sanos y exacerban los síntomas en pacientes diagnosticados (Javitt & Zukin, 1991; Krystal et al., 1994; Lahti et al., 1995). Tanto estudios farmacológicos como genéticos en modelos animales apoyan la relación entre la hipofunción de los rNMDA y la esquizofrenia, produciendo fenotipos conductuales que emulan no solo síntomas positivos, sino que también negativos y cognitivos (G. Lee & Zhou, 2019). En estudios post mortem de pacientes se observó una reducción de materia gris (Cannon et al., 2002), consistente con los posteriores hallazgos de alteraciones estructurales en neuronas piramidales corticales, reducción de árboles dendríticos y del volumen de los somas (W. Hu et al., 2015). En este sentido, el rNMDA cumple un rol fundamental en el desarrollo de árboles dendríticos y axonales, en el desarrollo dependiente de actividad glutamatérgica, siendo crítico para la formación y el refinamiento de los circuitos corticales (Ewald & Cline, 2009). Estos hechos vinculan a los rNMDA con las alteraciones en el neurodesarrollo, principalmente asociadas a interneuronas GABAérgicas corticales, fundamentales en el estudio de la etiología de la esquizofrenia (Nakazawa et al., 2012).

Hipótesis del origen GABAérgico de la esquizofrenia: Hipofunción del receptor NMDA en interneuronas GABAérgicas

Luego de que la teoría de la hipofunción glutamatérgica de la esquizofrenia se vuelva relevante, comenzaron a surgir resultados paradójicos. Dosis subanestésicas de ketamina producen en la corteza frontal de ratas un aumento de glutamato extracelular (Moghaddam et al., 1997), sugiriendo una hiperactivación de las neuronas corticales. Más aún, dosis bajas de antagonistas de rNMDA induce cambios neurodegenerativos en las regiones corticales y límbicas producto de un aumento neto de glutamato (Olney, 1989). Estos hallazgos permitieron la propuesta de un nuevo modelo que vinculaba un efecto más potente de los bloqueantes de rNMDA sobre neuronas GABAérgicas de la corteza y del sistema límbico (Olney & Farber, 1995 revisado en Nakazawa et al., 2012). Así, la hipofunción del receptor NMDA en las interneuronas GABAérgicas da lugar a un déficit en el control inhibitorio sobre las neuronas piramidales glutamatérgicas. Esta pérdida de inhibición conlleva un incremento en la actividad de las neuronas piramidales, lo que a su vez desencadena alteraciones en el funcionamiento de los circuitos en los que participan tanto las neuronas piramidales como las interneuronas (Homayoun & Moghaddam, 2007; Olney & Farber, 1995). Registros en la mPFC de rodajas de cerebros de ratas mostraron un aumento de la excitabilidad de las neuronas piramidales luego de la administración de antagonistas rNMDA asociado a un fenómeno de desinhibición por parte de las interneuronas GABAérgicas (Zhang et al., 2008). Además, otros estudios han demostrado que la administración temprana de antagonistas de rNMDA durante el desarrollo conlleva una reducción en la expresión de marcadores asociados a interneuronas, como GAD67 y la parvalbúmina (PV), en modelos animales. Estos cambios son similares a lo observado en pacientes con esquizofrenia (Cochran et al., 2003; Morrow et al., 2007). La desregulación de GAD67 es uno de los hallazgos más consistentes en los estudios post mortem, habiéndose confirmado tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína en pacientes esquizofrénicos. Es importante destacar que esta reducción no se debe a una disminución en el número total de células en la corteza prefrontal (Akbarian, 1995; Thune et al., 2001) ni está relacionada específicamente con una reducción en el número de interneuronas PV+ (Enwright et al., 2016).

Rol del receptor de NMDA en interneuronas cortico-límbicas asociado al neurodesarrollo

Existe evidencia del importante rol que cumplen los rNMDA en el neurodesarrollo. Estos receptores juegan un papel fundamental en los procesos normales de maduración de los componentes inhibitorios de la PFC, más específicamente sobre el desarrollo del circuito local de la corteza cerebral. Se sabe que las interneuronas PV sufren cambios madurativos durante la adolescencia y la adultez temprana (Caballero & Tseng, 2016), y estos cambios se encuentran asociados a una disminución en las corrientes de rNMDA (Wang & Gao, 2009). Durante el período crítico postnatal, caracterizado por la inmadurez de las interneuronas PV y, por consiguiente, del circuito cortical prefrontal, la exposición a factores ambientales adversos, lo que conlleva a un aumento del estrés oxidativo a nivel celular, podría interactuar con factores genéticos predisponentes. Esto podría resultar en una hipofunción del rNMDA en las interneuronas GABAérgicas, en particular, en las interneuronas PV (Nakazawa et al., 2012). Es de esta forma que se han planteado a las interneuronas PV como una suerte de vía final común a través de la cual los posibles factores etiológicos desencadenarían los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a los síntomas de la esquizofrenia. Teniendo en cuenta las observaciones sobre las alteraciones en las neuronas piramidales descritas en relación a la hipótesis glutamatérgica, se ha pensado a la hipofunción del rNMDA en dos etapas (Nakazawa et al., 2017). Este modelo plantea que en una primera etapa, durante la vida postnatal temprana, se produce la hipofunción del rNMDA en las interneuronas GABAérgicas corticales. Esto afecta a los procesos madurativos de las interneuronas PV y en consecuencia al desarrollo normal del microcircuito cortical. Además, la actividad inhibitoria deficiente afecta a la sincronización de la actividad local de las neuronas piramidales corticales, alterando las oscilaciones gamma. La consecuente desinhibición de las neuronas piramidales corticales produce un aumento anormal en los niveles de glutamato, activando procesos celulares compensatorios como la internalización homeostática de rNMDA, dando lugar a la segunda etapa de hipofunción del rNMDA sobre las neuronas piramidales. De lo hasta el momento planteado se desprende el importante papel que juegan los rNMDA en el neurodesarrollo de los circuitos corticales de la mPFC, siendo fundamentales en los proceso madurativos de las interneuronas GABAérgicas y resultando críticos en el estudio de la fisiopatología de la esquizofrenia (Belforte & Nakazawa, 2011).

Modelos animales útiles para el estudio de la fisiopatología de la esquizofrenia

Al igual que en diversas áreas de la ciencia médica, los modelos animales de enfermedades psiquiátricas resultan en herramientas pre-clínicas muy valiosas en el entendimiento de las bases neurobiológicas de los desórdenes psiquiátricos. Estos ofrecen una plataforma rápida para monitorear la progresión de la enfermedad, la oportunidad de realizar estudios invasivos analizando posibles factores moleculares, estructurales y electrofisiológicos que subyacen a la enfermedad y de evaluar nuevas terapéuticas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que ningún modelo animal puede reproducir un trastorno psiquiátrico en su totalidad (Pletnikov & Ross, 2013). En la actualidad, persisten controversias en el campo de la psiquiatría sobre la incapacidad de reproducir ciertos síntomas psiquiátricos particularmente restringidos a la mente humana, como ocurre en el caso de los delirios (Canetta & Kellendonk, 2018). Es así que en el estudio de las enfermedades neuropsiquiátricas se vuelve fundamental la caracterización de endofenotipos que permitan la reducción de conductas complejas en sus elementos más fundamentales, los cuales pueden ser más fácilmente evaluados en los modelos animales (Gould & Gottesman, 2006; van der Staay, 2006). Y si bien se plantea que un endofenotipo no necesariamente es específico de un trastorno, todo trastorno psiquiátrico está conformado por una combinación específica de endofenotipos (van der Staay, 2006). Se han establecido tres criterios básicos para evaluar la utilidad de aquellos modelos animales para el estudio de los trastornos mentales: la validez de apariencia (*face validity*), la validez de predicción (*predictive validity*), y la validez de constructo (*construct validity*).

La validez de apariencia implica una semejanza respecto al fenotipo presente en el modelo junto a los síntomas y signos del trastorno a modelar. Como ya se dijo, hay aspectos clínicos específicos de la especie humana que difícilmente puedan ser modelados en otros animales. Sin embargo, a pesar de que los aspectos subjetivos psicopatológicos no pueden ser reproducidos, las disfunciones cognitivas y conductuales que subyacen a este tipo de trastornos psiquiátricos sí pueden ser abordadas mediante modelos animales (Willner, 1986). Teniendo en cuenta todo esto, algunos consideran que una pobre validez de apariencia no necesariamente invalida a un modelo animal (van der Staay, 2006).

La validez de predicción hace referencia a la capacidad de poder realizar predicciones sobre aspectos del trastorno modelado partiendo de las observaciones realizadas sobre el modelo

animal (Willner, 1986). De connotación empírica, la validez de predicción de un modelo animal neuropsiquiátrico permite la extrapolación de los efectos de una manipulación realizada sobre el modelo animal al ser humano. Es así que la validez de predicción suele relacionarse con la capacidad de detectar tratamientos farmacológicos efectivos aplicables a humanos (van der Staay, 2006).

La validez de constructo se ubica en el plano teórico e implica la existencia de una base teórica sólida que respalde al modelo (Willner, 1986). Considerando que en gran parte la etiología de los trastornos neuropsiquiátricos sigue siendo desconocida, muchas veces lo que se busca es modelar una hipótesis particular (van der Staay, 2006). La validez de constructo implica que los constructos teóricos evaluados en el modelo son homólogos a aquellos que son relevantes en el trastorno presente en el humano (Willner, 1986). Un modelo animal que reproduzca aspectos fisiopatológicamente relevantes para el trastorno es, consecuentemente, un modelo que presenta validez de constructo (Lipska & Weinberger, 2000).

Modelos genéticos de hipofunción del rNMDA

Existe evidencia de estudios en pacientes con esquizofrenia que involucran a varios genes en la función de los rNMDA como genes de riesgo (Harrison & Weinberger, 2005; M. A. Snyder & Gao, 2013). Existen diversos modelos animales de ratones transgénicos que presentan ablaciones en distintas subunidades de los rNMDA. Esto incluye la subunidad esencial NR1, a menudo denominada Grin1, así como las subunidades NR2A y NR2B. Además, también existen modelos con alteraciones en los receptores metabotrópicos tipo 5 glutamatérgicos (mGluR5), que regulan la actividad de los rNMDA, y en factores de crecimiento junto con sus receptores. Entre estos últimos se encuentran los modelos que presentan la ablación de los genes de Neuregulina 1 y su receptor ErbB4 (G. Lee & Zhou, 2019). Respecto de los modelos basados en la subunidad NR1 del rNMDA, Mohn et al., (1999) describe un modelo transgénico murino con niveles reducidos de NR1 (a nivel de todo el sistema nervioso), el cual presenta hiperlocomoción, estereotipias, retracción social llegada la etapa adulta y responde positivamente a la administración de haloperidol o clozapina. La ablación de los rNMDA en este modelo resulta no ser específica en cuanto a su localización anatómica o tipo celular y presenta fenotipos que no están relacionados con el trastorno, tales como convulsiones y una significativa reducción en el peso corporal.

Posteriormente surgieron modelos genéticos de mayor especificidad en términos de la capacidad de ablación génica, los cuales utilizan el sistema Cre/lox y seleccionan distintos promotores para dirigir la ablación del gen GRIN1. De esta forma, surgen modelos genéticos condicionales en los que la ablación de los rNMDA se restringe a un tipo neuronal, ya sea piramidales o interneuronas GABAérgicas (Bygrave, Kilonzo, et al., 2019; Nakazawa et al., 2017). Los modelos de ablación en las neuronas piramidales no recapitulan las alteraciones descritas a nivel neuroquímico (como la disminución de GAD67 y PV), y presentan alteraciones conductuales y cognitivas dependiendo la edad de comienzo de la delección (Bygrave, Kilonzo, et al., 2019). Si se produce a las 2 semanas postnatal, se observan alteraciones cognitivas y atencionales (Rompala et al., 2013). En cambio si se produce entre la semana 4 y 6 postnatal se observan alteraciones en conducta sociales, en el armado del nido, en la memoria de trabajo espacial y una hiperlocomoción (Tatard-Leitman et al., 2015). Y si bien estos modelos resultan ser valiosos, ninguno presenta una validez de apariencia tan completa como la de los modelos dirigidos hacia las interneuronas GABAérgicas (Nakazawa et al., 2017). En este sentido, Korotkova et al., (2010) describen un modelo de ablación del rNMDA específicamente en las interneuronas PV dirigiendo la ablación bajo el promotor de PV, la cual se completa alrededor del periodo de la adolescencia. En este modelo observaron una disminución en el poder de las oscilaciones theta y gamma, una alteración en el procesamiento de la información espacial por parte de las neuronas piramidales del hipocampo, alteraciones en la memoria de trabajo espacial y en la memoria de reconocimiento espacial (de corto y de largo término). No se observaron alteraciones en la conducta social ni en la inhibición por prepulso. Por otra parte, Carlén et al., (2012) utiliza un modelo cuya recombinación ocurre entre el día P13 y las octava semanas de vida, observando alteraciones en las oscilaciones gamma basales e inducidas en corteza somatosensorial de los ratones mutantes, déficits en el aprendizaje asociativo, sin hiperlocomoción ni alteraciones en la inhibición por prepulso. En este mismo modelo, Billingslea et al., (2014) describe además alteraciones en la actividad gamma basal, sin alteraciones en la locomoción, déficits en el armado del nido y en la interacción social. Luego, al usar una variante de esta línea pero con una ablación más temprana, observan una hiperlocomoción a partir de los 5 meses de vida, sin alteraciones en la inhibición por prepulso ni déficits cognitivos (Bygrave, Jahans-Price, et al., 2019). Todo esto pone de manifiesto que el tiempo de recombinación y la consecuente ablación del rNMDA es un factor crucial en la determinación del fenotipo en estos modelos animales. En este sentido, pasaremos ahora a describir las características principales del modelo utilizado por nuestro laboratorio, el cual fue descrito en (Belforte et al., 2010).

Nuestro modelo de hipofunción del rNMDA en interneuronas GABAérgicas cortico-límbicas

Nuestro grupo de trabajo aborda la fisiopatología de la esquizofrenia a través del estudio de un modelo murino que resulta de un knockout condicional en el cual la expresión de Cre recombinasa se encuentra bajo la dirección del promotor Ppp1r2 [por *protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2*], la línea Ppp1r2-Cre. Esta línea se cruza con una línea flox, donde el gen GRIN1 (que codifica para la subunidad fundamental NR1 del rNMDA), se encuentra flanqueado por sitios loxP, resultando en un ratón doble transgénico condicional, de manera similar a los otros modelos descritos en la sección anterior. Sin embargo, hay dos diferencias relevantes de este modelo respecto de los anteriormente mencionados. Por un lado, el promotor Ppp1r2 se expresa de manera endógena en interneuronas GABAérgicas del cuerpo estriado, corteza e hipocampo, y, en menor medida, en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Por otro lado, la distancia entre los dos sitios loxP que flanquean a NR1 es menor que en los otros trabajos mencionados, comenzando la recombinación en el día P7 y completándose para el día P21. Luego esta recombinación se mantiene estable hasta los 4-5 meses de edad. Específicamente, al mes de vida se detectó una ausencia de expresión del ARNm de NR1 exclusivamente en las interneuronas GABAérgicas corticales e hipocampales GAD67+ (afectándose un 40 a 50% de las mismas), sin una disminución en el número de estas células (Belforte et al., 2010). Además, este modelo reproduce la disminución en los niveles de GAD67 y de PV descritos en pacientes (Akbarian, 1995).

Nuestro modelo fue evaluado a nivel conductual por una batería de pruebas conductuales, mostrando hiperlocomoción inducida por novedad en una prueba de campo abierto (*open field*), altos niveles de ansiedad en una prueba de laberinto elevado en forma de cruz (*elevated plus maze*), anhedonia evaluada por falta de preferencia por el consumo de sacarina, una disminución en conductas reproductivas y déficits en el armado del nido, falla en la memoria de tipo social a corto plazo, falla en la memoria de trabajo espacial en una prueba de laberinto en Y (*Y-maze*) y un déficit en la prueba de inhibición por prepulso del reflejo de sobresalto (PPI) (Belforte et al., 2010). Dichas alteraciones solo fueron observadas en animales adultos, no así en animales juveniles, a pesar de que la recombinación se extiende hasta el día P28. Esto dota de una buena validez de apariencia al modelo respecto a la manifestación de los síntomas pasada la etapa juvenil. En este sentido, en el trabajo de Belforte et al., (2010), con la idea de estudiar los efectos de la ablación

sobre el neurodesarrollo, se generó además un knock-out condicional de NR1 en el cual la ablación del rNMDA ocurre después de la adolescencia, en etapa adulta, en las mismas áreas y en los mismos tipos neuronales que el anterior mutante. Interesantemente, esta última línea KO no presentó ningún fenotipo conductual ni neuroquímico en la etapa adulta, lo que sugiere que existe una interacción entre la falta de rNMDA y el neurodesarrollo durante la adolescencia que explicaría el desarrollo del fenotipo compatible con la esquizofrenia.

Trabajos posteriores en el mismo modelo evaluaron el efecto del aislamiento social posterior al destete, en el día P21, observando que parte del fenotipo simil-esquizofrenia se encuentra exacerbado, con altos niveles de ansiedad, déficit en la memoria de trabajo espacial, anhedonia y alteraciones en comportamientos sociales (Jiang et al., 2013). Además, se reportó un aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno en la mPFC junto con un aumento del estrés oxidativo, peroxidación lipídica y daño al ADN, a las cuales las interneuronas PV+ serían particularmente susceptibles. También, se han reportado cambios en el sistema dopaminérgico, con aumentos en la liberación de dopamina inducida por la administración de anfetaminas y altos niveles basales de dopamina en el núcleo accumbens (vía mesolímbica) siendo menor en corteza prefrontal (vía mesocortical) (Nakao et al., 2019). Estos resultados serían compatibles con lo esperado en base a la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia.

En trabajos previos de nuestro grupo, se demostró que nuestro modelo presenta una desconexión funcional de la vía vHP-mPFC, con una menor capacidad de evocar respuesta en la mPFC por medio de estimulación directa sobre el vHP y una mayor respuesta de plasticidad sináptica de depresión de largo término (LTD, del inglés *long-term depression*) (Alvarez et al., 2020). Esta reducción en la conexión funcional de la vía vHP-mPFC solo fue observada en ratones adultos, consistente con la manifestación de los síntomas en dicha etapa. Además, los mutantes juveniles muestran una actividad cortical de base aumentada y son más susceptibles a la potenciación de largo término (LTP, del inglés *long-term potentiation*), lo que sugiere cambios en el circuito cortical con cierto grado de compensación funcional durante la adolescencia. Por otro lado, los mutantes adultos presentan alteraciones en el balance de excitación/inhibición en la mPFC, caracterizados por un aumento de la actividad excitatoria sobre las neuronas piramidales del circuito cortical y dependiente de la actividad cortical (Pafundo et al., 2021). Sin embargo, todos estos estudios fueron realizados en animales anestesiados, por lo que aún desconocemos cuáles son los relatos conductuales asociados a las alteraciones observadas en nuestro modelo animal de esquizofrenia.

En base a lo hasta aquí expuesto sobre nuestro modelo de ratón doble transgénico (Ppp1r2-Cre/NR1-floxP) de ablación postnatal temprana del rNMDA en las interneuronas GABAérgicas corticales e hipocampales, podemos decir que la ablación impacta en los procesos de desarrollo normales del circuito cortical permitiendo cierta compensación funcional durante la adolescencia y manifestando el fenotipo alterado llegada la etapa de la adultez temprana. Esto dota a nuestro modelo con una buena validez de apariencia y de constructo ya que resulta en importantes paralelismos a nivel neurobioquímico, fisiológico y conductual con la esquizofrenia incluyendo un neurodesarrollo anómalo durante la adolescencia y la manifestación de alteraciones conductuales y cognitivas llegada la etapa adulta. Todavía resta por indagar el alcance de los cambios fisiológicos que subyacen a nuestro modelo, específicamente en animales despiertos realizando tareas conductuales, y es de esta forma que en mi trabajo de tesis doctoral nos propusimos estudiar qué tipo de alteraciones en los procesos normales de codificación de la información contextual por parte de la corteza prefrontal medial ocurren en nuestro modelo animal útil para el estudio de la esquizofrenia.

OBJETIVOS

El **objetivo general** del presente trabajo es comprender cómo la corteza prefrontal es capaz de codificar la información contextual saliente durante la exploración de ambientes con distinta carga cognitiva y emocional. Además, buscamos establecer las alteraciones en dicha codificación que podría presentar un modelo animal de esquizofrenia generado mediante la ablación postnatal temprana del receptor NMDA en interneuronas GABAérgicas de la corteza (en su mayoría del tipo PV+). Para esto registramos la actividad unitaria de neuronas de la mPFC de ratones mutantes y controles, al mismo tiempo que registramos la actividad de campo local del vHP, mientras los animales realizan tareas de exploración con diferentes niveles de carga cognitiva y emocional. De esta forma, articulamos nuestro trabajo bajo los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Determinar el impacto de la ablación temprana del receptor NMDA en interneuronas GABAérgicas sobre la capacidad de codificación contextual de la mPFC ante diferentes cargas cognitivas. Para esto registramos a los animales durante una tarea de exploración sobre un corredor lineal al cual le variamos la carga contextual agregando un estímulo social y un objeto inanimado en los extremos del corredor. Nuestra hipótesis de trabajo se centra en que las neuronas corticales de la mPFC responden de forma diferencial a un contexto enriquecido, respondiendo a los estímulos salientes de la prueba y presentando un deterioro en dicha codificación en los animales mutantes.

Objetivo específico 2: Establecer la capacidad de la mPFC de los ratones mutantes para codificar información contextual en una tarea que involucra la memoria de trabajo. Para esto registramos animales mutantes y controles durante una tarea de exploración denominada prueba de alternancia espontánea sobre un laberinto en forma de Y. Esta prueba suele evaluar la memoria de trabajo espacial y presenta una carga cognitiva adicional asociada a la toma de decisiones. Nuestra hipótesis de trabajo se centra en que las neuronas corticales responden de forma diferencial frente a puntos críticos del laberinto en forma de Y que difieren en la carga cognitiva asociada a la toma de decisiones y dicha codificación se encuentra deteriorada en los animales mutantes.

Objetivo específico 3: Dilucidar el estado de la sincronización entre el ritmo theta del hipocampo ventral y las neuronas corticales de la mPFC durante pruebas de exploración con distinta carga contextual. De forma conjunta con la actividad cortical, registramos en los animales la actividad de campo local del hipocampo ventral (vHP). La sincronización de la vía vHP-mPFC puede estudiarse a través del grado de sincronización que presentan las neuronas corticales al ritmo theta hipocampal (6-10 Hz). Se ha planteado que la modulación vHP-mPFC participa en conductas adaptativas y procesos cognitivos como la toma de decisiones, viéndose comprometida en pacientes y modelos animales de esquizofrenia. Nuestra hipótesis de trabajo se centra en que frente a la carga contextual asociada a las tareas de exploración sobre el corredor lineal y el laberinto en forma de Y, aumentará la sincronización entre la actividad de las neuronas corticales y el ritmo theta del vHP y dicha sincronización se encuentra alterada en los animales mutantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para los experimentos del presente trabajo se utilizaron ratones macho adultos de 12-14 semanas de edad con un peso corporal de entre 25-30 gramos. Se utilizaron distintas líneas transgénicas con un *background* genético de *C57BL/6NTac*, las cuales serán introducidas en detalle en la próxima sección. Todos los experimentos con animales fueron realizados acorde con la regulación y las normas del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, RS617/2002) y el procedimiento experimental ha sido aprobado por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (RS2964 y RS783/15). 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 alojados en el bioterio del Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO, UBA-CONICET), 7mo piso de la Facultad de Medicina de la UBA, bajo cuidado de personal capacitado y mantenidos en un ciclo de 12/12 horas (luz/oscuridad), a temperatura climatizada de 21-24°C con alimento y agua ad libitum.

Modelo experimental y genotipado

El periodo de la adolescencia en ratones se extiende aproximadamente hasta el día P55, comenzando a considerarse como adultos jóvenes a los dos meses de edad (Spear, 2000). Como se mencionó previamente, se utilizaron ratones macho adultos de 12-14 semanas de edad y de distintas líneas transgénicas. Se utilizó una línea transgénica en la que la expresión de la proteína recombinasa Cre está regulada por el promotor de *Ppp1r2*, el cual se expresa fundamentalmente en neuronas GABAérgicas de la corteza y el hipocampo (Belforte et al., 2010). La recombinación de la línea *Ppp1r2-cre* ocurre durante el desarrollo postnatal temprano. Comienza a ser detectable a partir del día postnatal 7 en el 45%-50% de las células GABAérgicas de corteza e hipocampo, siendo la mayoría de tipo PV+ (85-95% según la región). La recombinación alcanza su máximo para la tercera semana de vida y permanece estable hasta los 5 meses de edad.

Para restringir la ablación del NMDAR a las neuronas GABAérgicas que expresan Cre, los ratones Ppp1r2-cre fueron cruzados con la línea FYL1 NR1^{loxP/loxP}. Esta línea presenta la subunidad NR1 del receptor glutamatérgico de tipo NMDA (rNMDA) flanqueada por sitios loxP, resultando blanco de Cre (Dang et al., 2006). La subunidad NR1 es indispensable para el funcionamiento del rNMDA, por lo cual la ablación del gen resulta en la pérdida de la función del receptor. De esta forma, la ablación del gen se logra exclusivamente en aquellas neuronas que expresan Cre.

Los animales experimentales se generaron mediante la cruce de ratones NR1^{loxP/loxP} Ppp1r2-cre^{+/-} y NR1^{loxP/loxP} Ppp1r2-cre^{-/-}. De la descendencia obtenida, los animales NR1^{loxP/loxP} Ppp1r2-cre^{+/-} son los llamados mutantes (*knock-out*, KO) y presentan la ablación de NR1 del rNMDA. Los ratones NR1^{loxP/loxP} Ppp1r2-cre^{-/-} carecen de la expresión de Cre y fueron utilizados como animales control (CTRL). Las crías fueron sexadas y se las utilizó tanto para realizar experimentos (sólo machos) como para perpetuar la línea (machos y hembras). A continuación, se muestra un esquema sobre la generación de los animales KO:

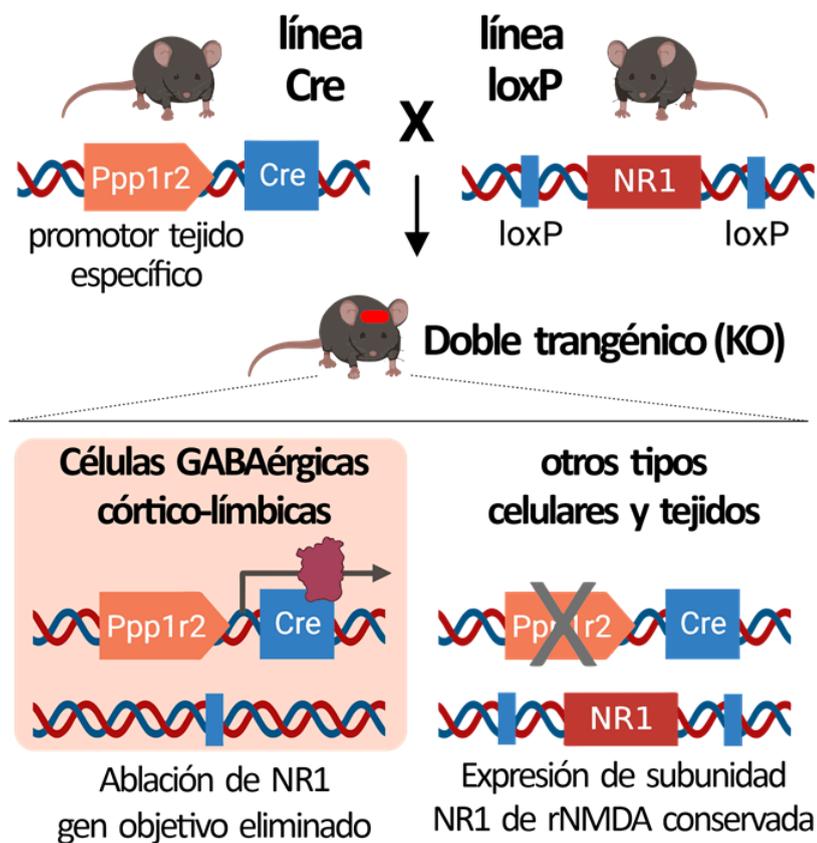


Figura M1. Ablación genética del NMDAR en células GABAérgicas del cerebro anterior usando el sistema Cre/lox-P.

Los animales experimentales fueron destetados en el día postnatal 21 y se les tomó una muestra de tejido de aproximadamente 3-5 mm de la punta de la cola 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. El ADN purificado de esta manera fue sometido a reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando primers específicos para Cre y NR1 floxeado. Los productos obtenidos de la PCR fueron separados en geles de agarosa siguiendo procedimientos estándar, 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 M2.

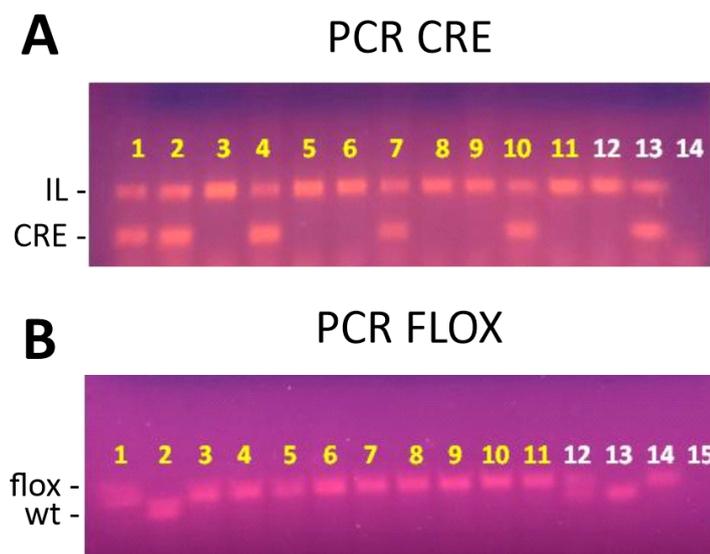


Figura M2. Ejemplos de geles de agarosa mostrando el patrón de bandas de las PCRs para Cre y NR1 flox. (A) PCR de Cre. Cada calle corresponde a un animal genotipado (amarillas). Calles controles (blanco): 12 Cre negativo; 13 Cre positivo; 14 control negativo. Bandas: IL interleucina 324 pb, CRE 100 pb. **(B) PCR de Flox:** Las calles se corresponden con los mismos animales en A. Calles controles (blanco): 12 NR1^{loxP/wt}; 13 NR1^{wt/wt}; 14 NR1^{loxP/loxP}; 15 control negativo. Bandas: NR1^{loxP/loxP} ~280 bp; NR1^{wt/wt} ~238 bp; NR1^{loxP/w} ambas. Notar que: la calle 2

corresponde a un bicho **control Cre:** NR1^{wt/wt} Ppp1r2-cre^{+/-}; la calle 3 corresponde a un bicho **control Flox:** NR1^{loxP/loxP} Ppp1r2-cre^{-/-}; la calle 4 corresponde a un bicho **mutante-KO:** NR1^{loxP/loxP} Ppp1r2-cre^{+/-}.

Microdispositivo de registro (*microdrive*)

Ratones KO y controles fueron implantados de manera crónica con un microdispositivo (*microdrive*) de fabricación propia (Figura M3A). Este consiste en un micromanipulador de acrílico, con una cánula guía a la cual adherimos los tetrodos y un conector (*Omnetics 1534*) compatible con un amplificador de 32 canales (*Intan RHD2132*). En la parte posterior, el microdrive posee un tornillo que se coloca sobre la cánula guía. Así, al girar el tornillo, podemos avanzar los electrodos

con una precisión de 300µm por vuelta de tornillo, y de esta forma somos capaces de registrar distintas alturas de la mPFC durante distintas sesiones de registro.

Cada animal fue implantado con un arreglo de cuatro tetrodos en la mPFC (16 canales) para el registro de neuronas únicas (*single-units*), y dos electrodos bipolares en el vHP (4 canales) para registrar la actividad de campo local (LFP). Cada tetrodo está formado por 4 alambres entrelazados de *Nichrome* (12µm de diámetro con aislamiento de Formvar y dorados a 200-400 kΩ), lo que nos permite registrar un gran número de neuronas por sitio de registro (potenciales de acción extracelulares). Los electrodos bipolares están formados por dos alambres de tungsteno de 50µm enrollados y nos permiten registrar el LFP hipocampal (filtrando en 1-300 Hz). Los electrodos implantados en vHP permanecen inmóviles. Para más información sobre la construcción del microdrive ver en la sección de protocolos.

Cirugía e implante de *microdrives*

Los animales fueron anestesiados con isoflurano y colocados en un marco estereotáxico regulando su temperatura corporal entre 36 y 37°C mediante una manta térmica servo-controlada (*Fine Science Tools*, Vancouver, Canadá) (foto de la cirugía en Figura M3B). Luego de limpiar el área de incisión con antisépticos (tres lavados de iodopovidona y tres de etanol 70%), se inyectó un anestésico local (lidocaína) y antiinflamatorio (dexametasona 10 mg/kg ratón i.p.). Se realizó una incisión longitudinal en sentido anteroposterior, se expuso la calota del cráneo del animal y se limpió la zona expuesta con solución fisiológica. A continuación, se colocaron seis pequeños tornillos metálicos que se utilizaron como soporte del implante. A uno de los tornillos ubicados en la región occipital le adherimos un pin metálico que posteriormente utilizamos como tierra (o ground). Se realizaron tres craneotomías: 1) sobre la mPFC; 2) sobre el vHP ipsilateral a la mPFC; 3) para la referencia. El esquema de la Figura M4A detalla la ubicación de las craneotomías y los tornillos colocados. A continuación se detallan las coordenadas de las craneotomías medidas con respecto al Bregma:

mPFC: anteroposterior: +1.9 mm; lateral: 0.5 mm; vertical: 1 mm midiendo desde la altura del cráneo. Se utilizó un ángulo de 10° en el plano coronal. **vHP:** anteroposterior: -3 mm; lateral: 2.8 mm; vertical: 3.4 mm midiendo desde la altura del cráneo, con un ángulo de -10° en el plano coronal. **Referencia:** -1 mm; lateral: -2 mm; vertical: 2 mm largo del electrodo (apoyado sobre el cráneo).

Para finalizar, se implantaron y fijaron los electrodos con acrílico dental. Se controló cuidadosamente que no hubiera infiltraciones y se aplicó Pervinox alrededor del implante para garantizar una correcta cicatrización. Luego de la cirugía, los animales fueron colocados en jaulas separadas, aisladas de otros animales para evitar que muerdan el implante. Durante los tres días post cirugía, se los trató con antibiótico (Gentamicina) y un antiinflamatorio no esteroideo (Meloxicam 5 mg/kg ratón i.p.). Al cabo de una semana, todos los animales lograron recuperar su peso prequirúrgico (aprox. 30 gramos) y no mostraron alteraciones en sus facultades sensoriales o motoras. Una foto de un animal implantado perfectamente recuperado se puede observar en la Figura M3C.

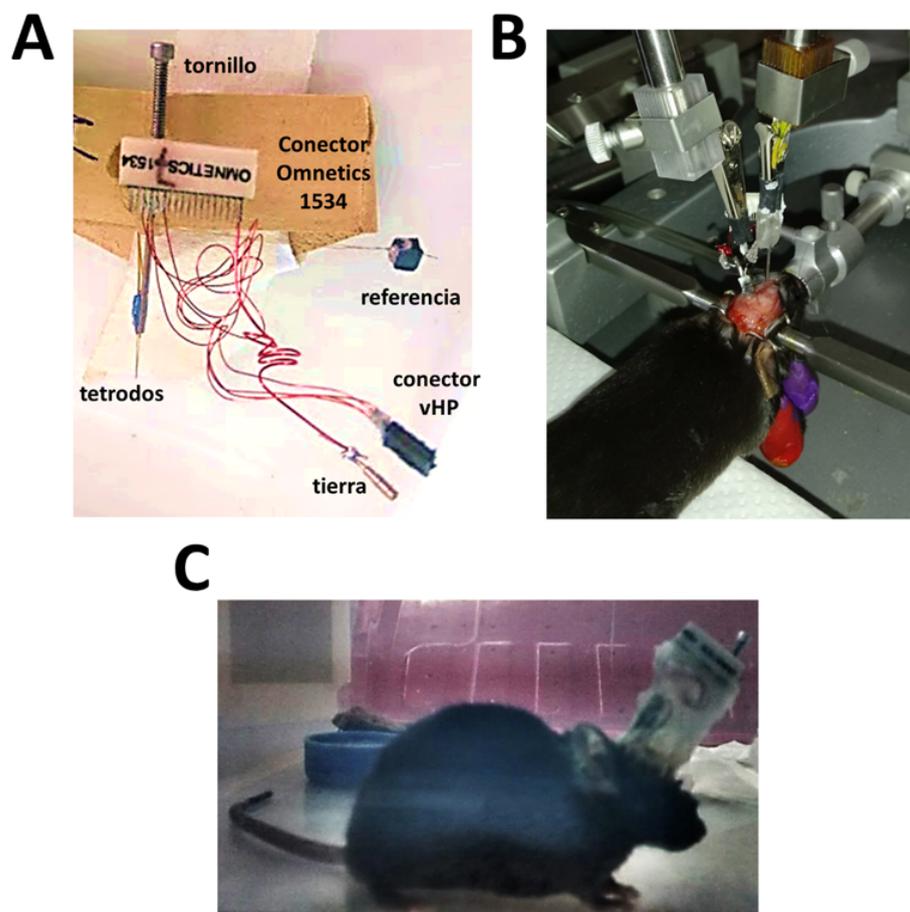


Figura M3. Implante crónico del microdispositivo. (A) Foto del Microdrive de fabricación propia **(B)** Foto de un animal en el puesto estereotáxico durante la cirugía para implantar el microdispositivo. **(C)** Foto del animal implantado en su home cage, luego de una semana de recuperación.

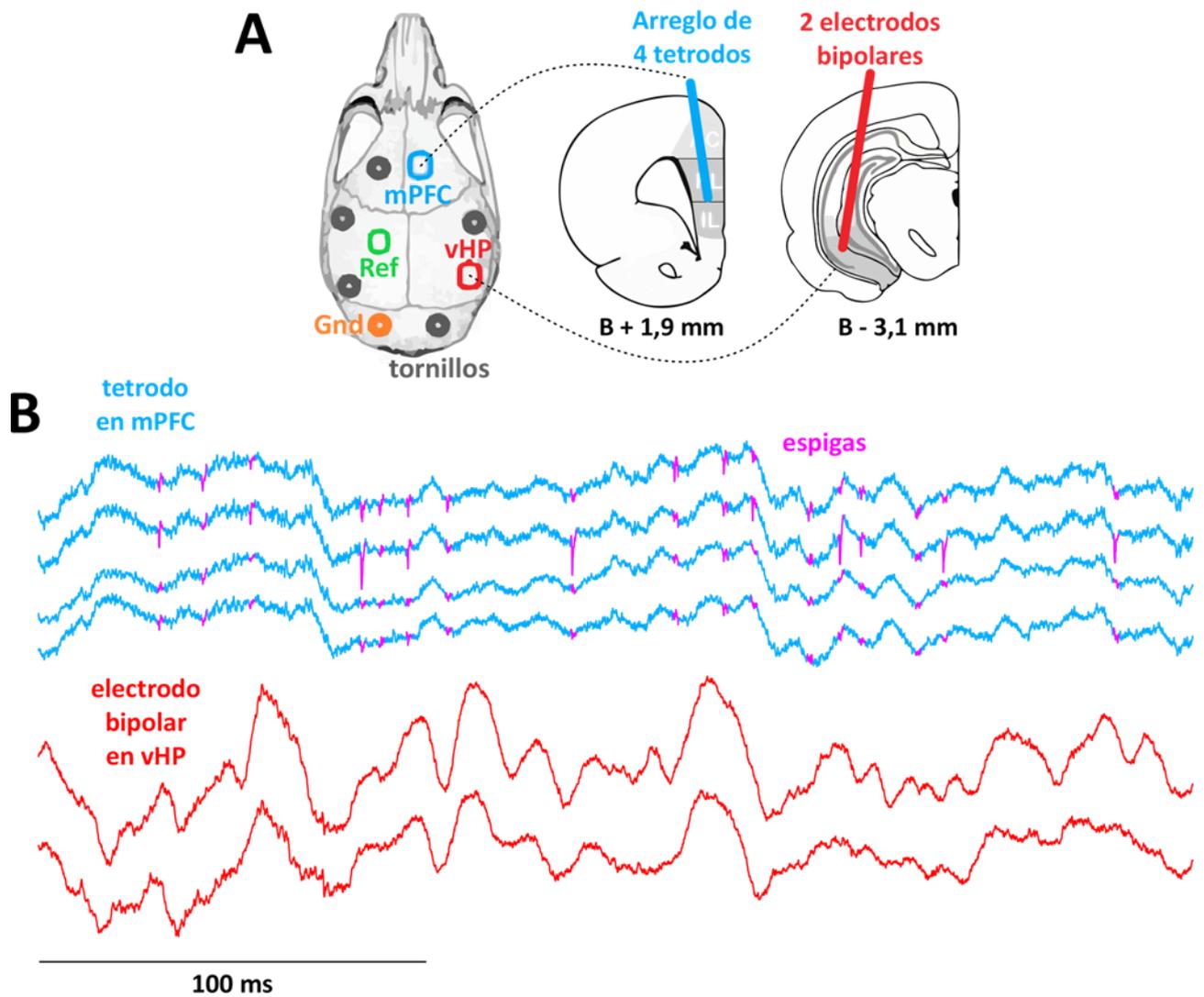


Figura M4. Registro simultáneo de la actividad neuronal en mPFC y el potencial de campo local en HP ventral. (A) Esquema de implantación del microdrive: un arreglo de 4 tetrodos en la mPFC (celeste) implantado en Bregma + 1,9 mm, 2 electrodos bipolares en vHP (rojo), la referencia (verde) y 5 tornillos (gris) más uno de tierra (naranja). **(B)** Fragmento de la señal obtenida. Se pueden ver 300 ms de señal de sólo uno de los tetrodos en celeste (4 canales) y en violeta los potenciales de acción extracelular de neuronas únicas (espigas). Debajo, en rojo, se encuentra la señal de un electrodo bipolar (2 canales).

Registro electrofisiológico *in-vivo*

Luego de una semana de recuperación, los animales implantados son registrados en un cuarto de registro acondicionado para tal fin. Este se encuentra insonorizado y aislado eléctricamente por una jaula de Faraday. La iluminación es tenue (30 lux), para garantizar que el ambiente sea poco aversivo para los animales. La señal electrofisiológica es recogida por un amplificador Intan de 32 canales (*RHD 32-Channel Recording Headstage*, de 24 x 15.5 mm y ~1 gr de peso) que va enchufado al conector *Omnetics* 1534 del implante. El amplificador digitaliza la señal y esta es enviada a la placa de adquisición RHD2000, donde luego se guarda en una computadora de registro. En simultáneo, registramos la posición y el comportamiento de los animales a través de una cámara cenital (*OpenMV Cam M7*). Esta posee canales I/O digitales (entradas y salidas), lo que nos permite activar la cámara digitalmente al mismo tiempo que envía una señal de entrada al RHD2000. De esta forma, podemos sincronizar la señal de video con el registro electrofisiológico. Un esquema detallado del *setup* de registro se puede ver en la Figura M5.

Protocolos comportamentales

Fase de ajuste y habituación de los animales: Durante los primeros 3-5 días los ratones implantados fueron sometidos a sesiones de registro diarias, donde fueron habituados a ser conectados al amplificador y al cuarto de registro. Además, evaluamos la calidad de la señal electrofisiológica, controlando la relación señal/ruido y las impedancias de los electrodos. Durante esta fase avanzamos lentamente los tetrodos hasta alcanzar la profundidad deseada en la mPFC (avanzamos 1 mm en promedio hasta encontrarnos en el área prelímbica de la mPFC). Los animales fueron colocados sobre un corredor lineal (LT del inglés "*linear track*"), el cuál posee paredes bajas de 1 cm de alto y dimensiones: 78 cm largo x 7 cm ancho x 15 cm alto. El laberinto se coloca encima de una mesa negra y los animales son incapaces de reconocer la distancia a la que se encuentra, evitando que salten desde el corredor. Registramos 15-20 minutos durante la exploración del LT permitiendo que los ratones se adapten al sistema de suspensión mecánica al cual se encuentra adherido el amplificador. **Tareas sobre el corredor lineal:** Una sesión típica de registro comienza con 5 minutos de registro en una arena neutral (tupper de 30x30 cm). Sin detener el registro, el ratón conectado es transferido al corredor lineal registrándose su actividad

durante otros 10-15 minutos. Durante esta etapa los animales exploran libremente el corredor, realizando transiciones estereotipadas desde un extremo al otro. A esta prueba la denominamos "LT". **Prueba de discriminación social-objeto sobre el LT (SO):** Sin interrumpir el registro, los animales pasan luego por un período de reposo de 5 minutos en la arena neutral y luego son reintroducidos al corredor lineal con un contexto enriquecido. En los extremos se encuentran adosadas jaulas de presentación de estímulos (de 10 x 10 cm, a la altura del corredor lineal). Una de ellas aloja un estímulo social (macho adulto *wildtype* C57Bl/6 previamente habituado a la jaula de presentación) y en la otra un objeto inanimado que ocupa un volumen similar al de un ratón (frasco de vidrio). El animal implantado explora libremente el corredor y ambos extremos durante 10-15 minutos. Luego de completar la sesión de registro, el animal es desenchufado y devuelto a su jaula. Al final de cada sesión de registro, avanzamos el tornillo del implante unos 50-100 μm (en profundidad) de manera de poder muestrear una población neuronal diferente dentro de la mPFC en la siguiente sesión. Cada sesión consta de una prueba LT y una prueba SO. Los animales realizan este protocolo durante 3-5 sesiones que pueden ser días aislados o consecutivos. En cada sesión randomizamos la ubicación de los estímulos respecto de la ubicación espacial del cuarto. A su vez, en algunas sesiones se repitió la prueba SO intercambiando la ubicación del objeto y el ratón demostrador. **Prueba de alternancia espontánea sobre un laberinto en forma de Y (YM):** Luego de 5 minutos en una arena neutral. Los animales conectados son colocados sobre un laberinto en forma de Y de características similares a las del corredor lineal. El laberinto posee 3 brazos idénticos, cada uno de 47 cm de largo, 7 cm de ancho, 15 cm de alto y paredes bajas de 1 cm de alto. Los brazos se encuentran separados entre sí por 120° . Los animales son registrados durante 16 minutos, realizando comportamientos exploratorios y alternando entre los brazos. Los animales realizan sesiones de YM durante 3-5 días, de forma no consecutiva. Es importante aclarar que los animales nunca realizan la prueba SO y YM el mismo día. La información adquirida en cada sesión (registros electrofisiológicos y videos) fue procesada *offline*.

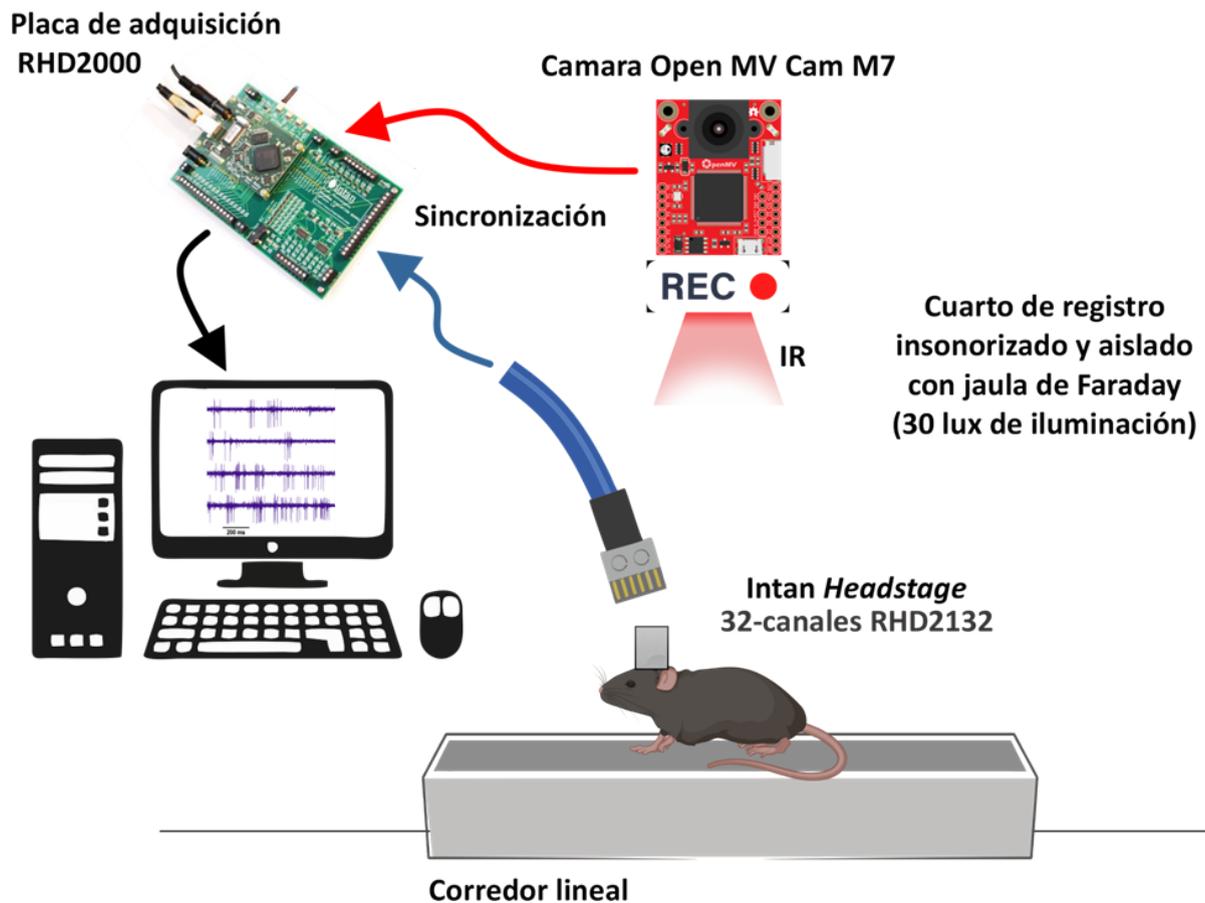


Figura M5. Esquema del puesto de registro. Los registros se llevan a cabo en un cuarto específicamente diseñado para tal fin. El amplificador se encuentra adherido a un sistema de suspensión mecánica que permite a los ratones desplazarse sin resistencia sobre los laberintos. La señal recogida por el amplificador es digitalizada en el mismo *headstage* (Intan 32 canales). La posición bidimensional y el comportamiento de los animales se registran por una cámara cenital (OpenMV Cam M7) controlada digitalmente de manera de poder sincronizar la señal de video con el registro electrofisiológico.

Análisis del comportamiento

Los videos son adquiridos por el software *OpenMV IDE* (v4.0.1) y convertidos en formatos de videos adecuados (con códigos propios de *MicroPython* v1.20). Posteriormente, cada video es procesado con *ANY-maze* (v4.98) obteniendo la posición bidimensional de los animales en función del tiempo. Los registros electrofisiológicos y los videos son sincronizados utilizando la señal TTL digital enviada a la cámara y amplificador. A través de códigos de *MATLAB* (vR2017b) de propia autoría, calculamos la frecuencia de disparo de las neuronas en segmentos discretos de los laberintos, con el objetivo de estudiar cómo cambia la actividad de las neuronas en regiones particulares siguiendo nuestras hipótesis de trabajo.

Registros con Tetrodos: Análisis de la actividad de neuronas únicas

La tecnología de tetrodos permite registrar y discriminar la actividad extracelular de varias neuronas registradas en simultáneo. Los tetrodos presentan niveles bajos de impedancia (aprox 200 kOhms) y son capaces de registrar los potenciales de acción (*spikes*) de las neuronas circundantes a una distancia óptima de aproximadamente 50 μm (Ver Figura M6). Cada tetrodo está compuesto por cuatro alambres enrollados sobre sí mismos, de manera que sus puntas se encuentran muy próximas entre sí, por lo que reciben señales ligeramente distintas provenientes de una misma neurona. Dicha variabilidad en la señal registrada por cada alambre de un tetrodo permite distinguir con alto grado de diferenciación cuáles de todos los spikes registrados corresponden a una neurona única. Este procedimiento comprende la clasificación de espigas (o en inglés "*spike-sorting*") y permite detectar la actividad de neuronas únicas. 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 distancias más lejanas.

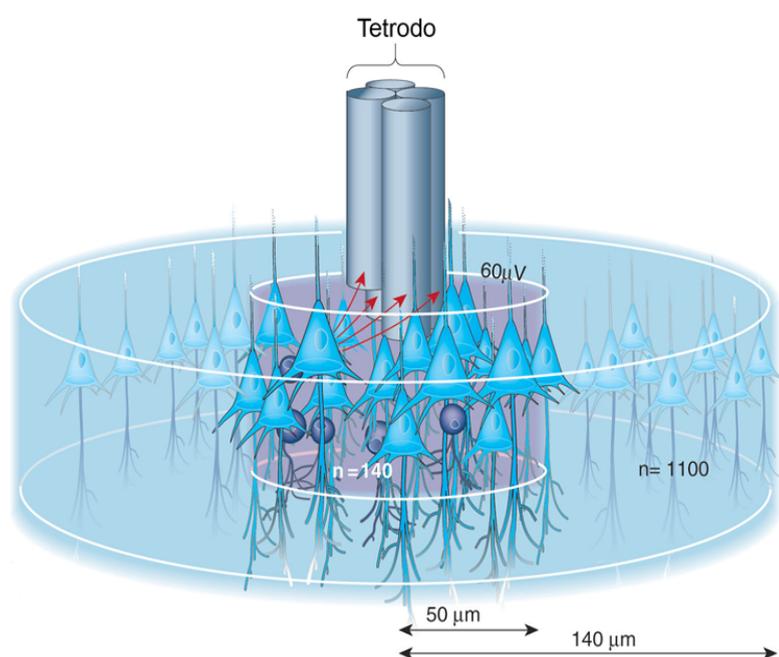


Figura M6. Esquema del área estimada de registro de un tetrodo (extraído de Buzsáki, 2004). Un tetrodo implantado en la corteza registra la actividad en $\sim 140\ \mu\text{m}$ de radio (radio celeste). La calidad de la detección y el aislamiento de unidades (neuronas putativas) varía en función de la distancia desde el electrodo. En el área gris ($\sim 50\ \mu\text{m}$) la amplitud de la señal de las neuronas es lo suficientemente grande como para depurar la señal proveniente de una única unidad a través de métodos de clusterización. La distancia entre las puntas de cada alambre y una neurona piramidal (triángulo) está indicada con flechas rojas.

Para realizar la identificación de espigas y el procedimiento de *spike-sorting*, utilizamos el paquete de análisis *Klusters*, *NeuroScope*, *NManager* desarrollado en el laboratorio Buzsáki (Hazan et al., 2006). Este corre únicamente bajo el sistema operativo Linux, por lo que emulamos el sistema con la herramienta *Oracle VM Virtualbox* (v 6.0). A modo de resumen de la metodología utilizada: los registros obtenidos por el Intan (en archivos de 1 minuto de duración), fueron concatenados y filtrados. Para extraer los *spikes* de la señal cruda obtenida se utilizó un filtro digital (filtro de la mediana con un ancho medio de la ventana de 2,4 mseg). Por medio de un análisis de componentes principales (PCA de “*Principal Component Analysis*”) y de las amplitudes relativas registradas por cada tetrodo, las espigas se asignaron a cada unidad aislada (neurona putativa) o cluster mediante un método semiautomático de clasificación de spikes (*Klusters*). La verificación semiautomática de la calidad de cada *cluster* se realizó utilizando autocorrelogramas, la forma de onda de las espigas y las matrices de correlación entre clusters (Figura M7B). Debido a que pequeños movimientos en el implante pueden provocar que se pierda la señal de una neurona, aquellos clusters que no se mantuvieron estables a lo largo de toda la sesión de registro fueron descartados.

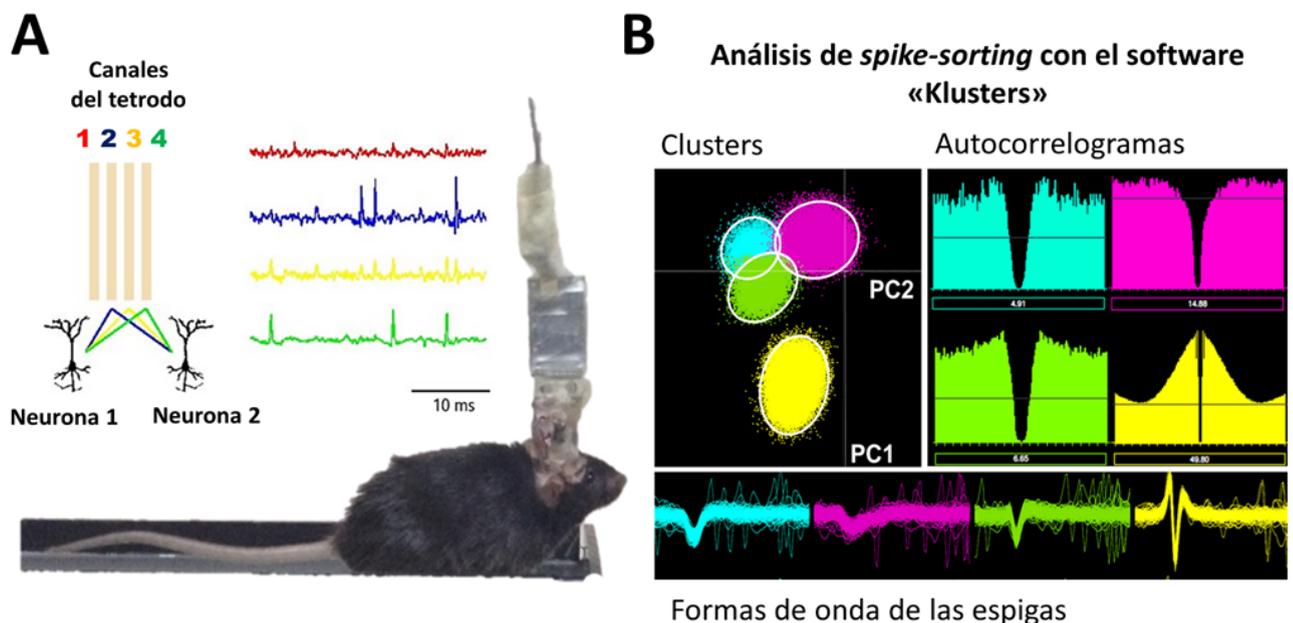


Figura M7. Registro de múltiples neuronas aisladas de la mPFC utilizando tetrodos. (A) Ratón implantado en forma crónica. Utilizamos la tecnología de tetrodos que nos permite separar la actividad de neuronas únicas (*spikes*) por comparación de amplitudes entre los 4 canales de un tetrodo. **(B)** Ejemplos de la separación de clusters de 4 neuronas de la mPFC obtenida en un mismo sitio de registro por medio de un software de clasificación de espigas (*Klusters*, Hazan et al., 2006).

Clasificación de unidades en interneuronas o células piramidales

Se ha visto que la forma de las espigas registradas puede utilizarse para clasificar a las neuronas en base a su tipo neuronal. Las neuronas de la mPFC se pueden clasificar en neuronas piramidales e interneuronas basándose en diferencias relativas de la duración y cinética de sus fases (Barthó et al., 2004). En este trabajo utilizamos 2 parámetros temporales de las espigas: la duración del ancho de la espiga al 50% de la amplitud y la duración desde el pico de la espiga hasta el máximo del valle. Los parámetros y la clasificación de las neuronas registradas se detallan más adelante en la sección de Resultados (en Figura R5). Si bien la clasificación resulta eficiente, tanto las interneuronas como las neuronas piramidales se encuentran definidas electrofisiológicamente y corresponde tener el recaudo de denominarlas “putativas”. A través de la técnica de tetrodos no es posible saber con exactitud qué subtipos de interneuronas son las que pueden identificarse por este método, si bien se acepta que se trataría mayoritariamente de interneuronas de tipo fast spiking dada la cinética de su potencial de acción observada en registros intracelulares y extracelulares in vivo. La frecuencia de disparo puede ser utilizada como parámetro de separación de las poblaciones neuronales pero debido al *bias* que presenta nuestro modelo animal de esquizofrenia (una actividad neuronal basal aumentada en la mPFC), decidimos no tener en cuenta este parámetro para la separación. A modo de simplificación, a lo largo del trabajo vamos a referirnos a las neuronas piramidales putativas como “neuronas piramidales” y a las interneuronas putativas como “interneuronas”.

Normalización de la actividad neuronal y criterios de selección

En las distintas tareas comportamentales, buscamos estudiar cómo fluctúa la actividad de las neuronas en puntos claves de las tareas que estén relacionados con la carga cognitiva asociada al contexto, Para esto examinamos los patrones de actividad de las neuronas con relación a la posición del animal sobre el corredor lineal y sobre el laberinto en forma de Y.

En el corredor lineal (pruebas LT y SO): Establecimos segmentos virtuales dividiendo el corredor de 78 cms de largo en 9 partes iguales (9 bins de 8,67 cm cada uno). El tamaño elegido para los segmentos corresponde a la ocupancia en promedio de un ratón adulto de las características utilizadas en nuestros experimentos. Así, calculamos la frecuencia disparo en cada bin como el

número de potenciales de acción en función del tiempo. Luego, computamos la media y desvío del disparo de las neuronas en todos los bines y utilizamos estos datos para normalizar. Así obtuvimos la frecuencia de disparo normalizada como Z-score para cada "BIN X" siguiendo la ecuación $[Z_{\text{BIN X}} = (\text{FD}_{\text{BIN X}} - \text{FD}_{\text{media BINES}}) / \text{DS}_{\text{BINES}}]$, donde FD es la frecuencia de disparo, DS es el desvío estándar y el subíndice "BINES" denota la conjunción de los 9 segmentos del corredor lineal. De esta forma obtenemos perfiles de actividad normalizada para cada neurona. Establecimos valores umbrales en $Z = 1$ y $Z = -1$, cuando la FD normalizada supera $Z = 1$ es considerada como activación y cuando está por debajo de $Z = -1$ es considerada como inhibición. Las neuronas fueron clasificadas según su patrón de actividad en los extremos del corredor lineal, como se detalla más adelante en la sección de resultados.

En el laberinto en forma de Y: Para cada brazo de 47 cm (o corredor) del YM establecimos segmentos de manera similar al aplicado sobre el corredor lineal (5 bines de 9,4 cm cada uno). Normalizamos la actividad de las neuronas en cada segmento según la ecuación $[Z_{\text{BIN X}} = (\text{FD}_{\text{BIN X}} - \text{FD}_{\text{media BINES}}) / \text{DS}_{\text{BINES}}]$, siguiendo la misma estrategia que para el corredor lineal pero siendo 5 bines por brazo. Como criterio de selección de neuronas que responden al centro o a la periferia, calculamos índices de respuesta restando la actividad promedio de los bines medios del brazo (Z en 2,3 y 4), a la actividad normalizada en el bin "centro" o en el bin "periferia" (Z en bin 1 o bin 5, respectivamente), según corresponda. Establecimos un umbral de índice de respuesta donde la actividad de los bines centro o periferia deben superar en al menos 3 desviaciones estándar a los bines del medio del brazo (2,3 y 4) para ser considerada como una activación significativa (valores de Z-score > 3).

Análisis del potencial de campo local y análisis de enganche de fase

Potencial de campo local: La señal electrofisiología cruda proveniente de cada sesión de registro fue procesada con el programa *NDManager* (del paquete antes mencionado, Hazan et al., 2006). Realizamos un submuestreo de la señal a 1250 Hz para obtener el potencial de campo local (LFP, *local field potential*) de la señal completa. De los 4 canales del vHP, seleccionamos uno para el análisis espectral de la señal. Calculamos la densidad de poder espectral (PSD, *power spectral*

density) utilizando el software *NeuroExplorer* (v4.135) para cada sesión de registro. Los PSD se promediaron por prueba y por intervalos de interés para comparar entre genotipos.

Enganche de fase: En este análisis se calculó el enganche de fase de las neuronas de la mPFC al ritmo theta del vHP. La señal obtenida de los registros fue sub-muestreada a 1250 Hz y aplicamos un filtro *butterworth* en el rango de theta entre 6 y 10 Hz. Posteriormente, aplicamos la transformada de *Hilbert* para estimar la fase instantánea de los potenciales de acción de cada neurona a dicha banda frecuencial. Para este análisis tuvimos en cuenta a las neuronas que presentaron más de 30 espigas en total en el tiempo de registro seleccionado (intervalos de interés), ya que las neuronas con pocas espigas pueden arrojar falsos positivos en este tipo de análisis estadísticos de distribución circular. Analizamos los histogramas circulares de las fases instantáneas de los potenciales de acción de cada neurona y aplicamos el test de *Rayleigh*. Este test presenta como hipótesis nula que la distribución circular es uniforme. Por lo tanto, clasificamos a las neuronas cuya distribución circular de fases se aleja de una distribución circular uniforme ($p < 0.05$) como neuronas “sincronizadas” o “enganchadas” al ritmo theta del vHP. Luego analizamos la proporción de neuronas enganchadas al ritmo theta hipocampal y comparamos entre genotipos (CTRL vs KO). Adicionalmente, como medida del grado o fuerza del enganche entre las espigas de las neuronas al ritmo theta hipocampal, se realizó una sumatoria vectorial del histograma de fases y se calculó el módulo del vector resultante. Se promediaron los módulos de vector resultante de todas las neuronas que cumplieron el criterio de al menos 30 espigas y que tuvieron un $p < 0.05$, y se comparó entre genotipos.

Estadística

Los análisis estadísticos y los gráficos fueron realizados utilizando *GraphPad Prism* (v8.0.1) y *MATLAB* (vR2017b). Para la comparación de dos grupos y una variable utilizamos *two tailed Unpaired Student's t-tests*. En las comparaciones entre grupos y los segmentos virtuales de los laberintos utilizamos *Two-Way Repeated-Measure ANOVA*. Para corroborar que los grupos cumplan con el criterio de normalidad utilizamos *Shapiro-Wilk test*. En el caso de la comparación del grado de enganche (módulo del vector) entre grupos e intervalos, ajustamos un modelo de efectos mixtos debido a que difiere el n de neuronas enganchadas en cada grupo de intervalos

(*Mixed Effects Model*, REML). En todos los casos, los resultados son expresados como la media \pm SEM. Para la comparación de proporciones de neuronas entre grupos: para tablas de 2x2 utilizamos *Fisher's exact test*, para tablas de 2x3 utilizamos *Chi-squared test* y para tablas de 2x2x2 o 2x5x2 utilizamos un análisis Log-linear para tablas de contingencia de tres vías.

Histología

Perfusión de animales: Luego de registrar a los animales a lo largo de 3 semanas (entre 10-15 sesiones de registro totales con las distintas tareas), los animales fueron sacrificados para realizar el análisis histológico de la localización de los electrodos en las zonas de registro. Para ello, los animales son anestesiados con una sobredosis de Uretano i.p. y posteriormente perfundidos con 4% de paraformaldehído (PFA) en buffer PBS a pH 7.4 y en baño de hielo. Los cerebros son extraídos cuidadosamente y colocados en solución PFA con PBS a pH 7.4 y 4°C, durante 24 hrs.

Corte de cerebros: Posteriormente los cerebros fueron lavados en PBS, criopreservados en 30% sacarosa en PBS y seccionados en rodajas de 50 μ m de espesor con un micrótopo *Leica SM2010R*. Los cortes son recogidos en *multiwells* y luego fueron montados sobre portaobjetos gelatinizados. Tinción con Safranina: Posteriormente son sometidos a un protocolo de tinción de Nissl con Safranina "O". Este tipo de tinciones generan un gran contraste lo que nos garantiza una mejor visualización de los trazos de los electrodos sobre las estructuras cerebrales. Finalmente, determinamos la posición de los electrodos en los cortes realizando una reconstrucción del recorrido realizado siguiendo el atlas de cerebro del ratón C57BL/6J (K. Franklin 2012) (Figura M8).

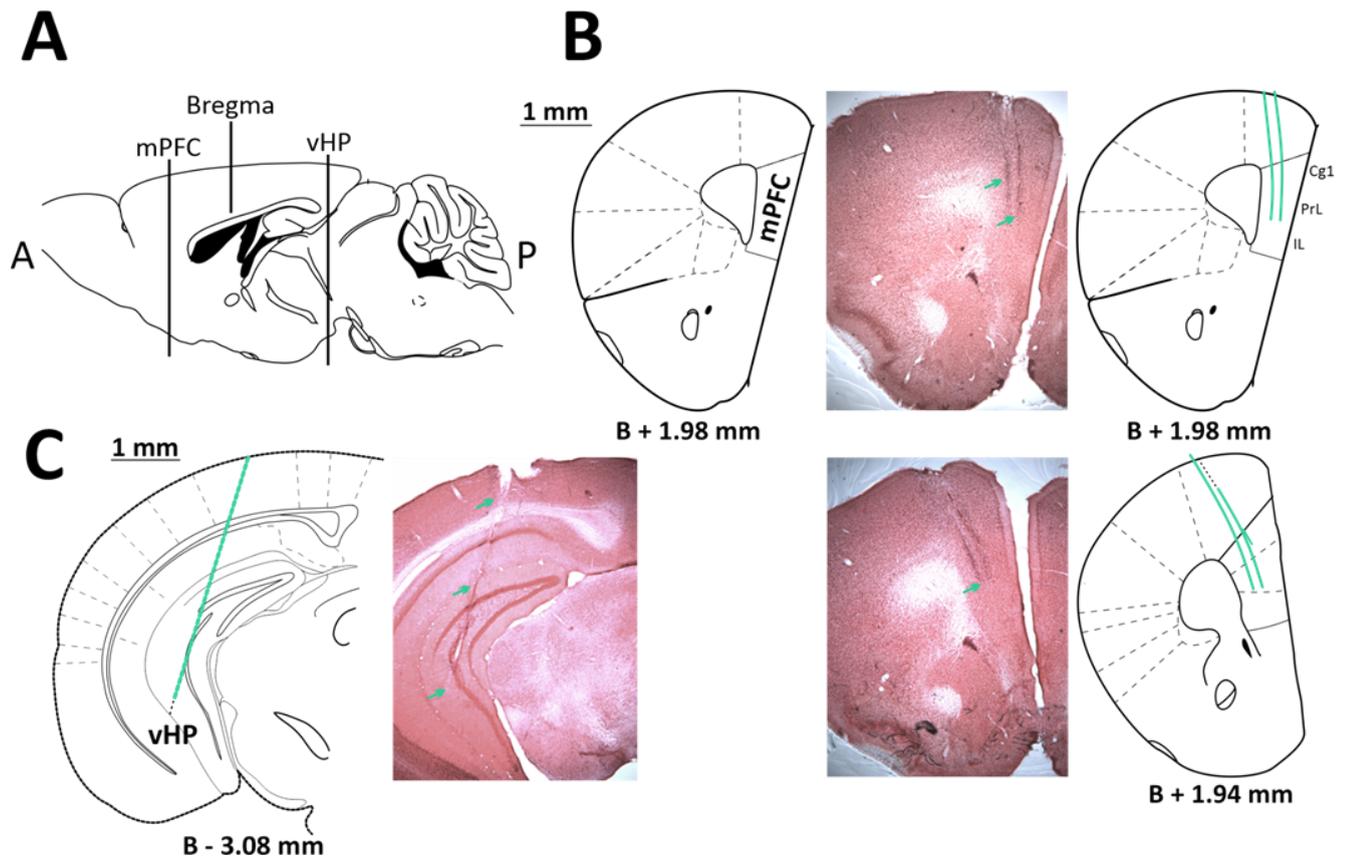


Figura M8. Ejemplos del análisis histológico llevado a cabo para determinar la ubicación de los electrodos en las áreas de registro. (A) Esquema del cerebro de ratón en un plano sagital mostrando la posición en el eje anteroposterior (A-P) que utilizamos para implantar los electrodos en mPFC y vHP. **(B)** Cortes coronales del cerebro de ratón a la altura del mPFC, teñidos con *Safranina "O"* y de 50 μm de espesor. Nótese que los electrodos quedan implantados a dos niveles antero-posteriores diferentes de la mPFC. Las flechas verdes indican los trazos de dos de los electrodos implantados. **(C)** Se observa el trazo de uno de los electrodos implantados en la región del vHP.

Tabla resumen de los datos analizados

En el desarrollo de este trabajo implantamos un total de 15 ratones (7 ratones controles-CTRL y 8 ratones mutantes-KO) con los microdrive de construcción propia (procedimiento explicado previamente en M-«Cirugía e implante de microdrives»). Solo dos animales KO fallecieron post-cirugía presuntamente por una interacción entre la anestesia y los analgésicos que utilizamos (KO #1 y #3). En el mejor de los casos, cada animal aporta información comportamental (tareas LT, SO y YM), de la actividad de neuronas únicas (clasificadas en piramidales e interneuronas) y señal del LFP del vHP. En la tabla M1 se muestra en detalle la contribución de cada animal registrado. Notar que hay animales que solo pudieron ser evaluados conductualmente sin haberse obtenido señal electrofisiológica de calidad suficiente para su inclusión en el estudio. De la misma forma, no consideramos tareas comportamentales que no cumplan con los criterios mínimos de admisión.

Animales		Sesiones analizadas comportamiento			Single-units		LFP
GENO	#	LT	SO	YM	Pyr	Inter	vHP
CTRL	1	5	3	5	67	27	Si
	2	4	5	5	59	60	Si
	3	5	5	7	0	0	No
	4	6	5	1	40	8	Si
	5	0	0	2	8	0	No
	6	6	6	3	30	16	Si
	7	1	0	2	2	0	Si
	Total	27	24	25	206	111	
KO	1	0	0	0	0	0	No
	2	3	4	5	67	13	Si
	3	0	0	0	0	0	No
	4	5	2	3	12	2	Si
	5	9	4	5	30	6	Si
	6	13	6	7	158	12	Si
	7	0	0	3	25	7	Si
	8	7	7	4	66	7	Si
	Total	37	23	27	358	47	

Tabla M1. Tabla de animales implantados en los estudios. Se muestra en detalle la contribución de cada animal implantado al análisis comportamental de las tareas, las neuronas únicas y la señal LFP del vHP.

RESULTADOS

Los ratones son animales con una alta capacidad de exploración. Presentan una tendencia natural a explorar ambientes novedosos, incorporando la información del contexto para tomar decisiones en pos de maximizar la exploración del ambiente. Durante la exploración, la mPFC desempeña un papel esencial al generar una representación compleja del contexto y participa en procesos de atención, toma de decisiones y en el control de comportamientos dirigidos hacia objetivos específicos (V. J. Brown & Bowman, 2002; Hok et al., 2005; Holroyd et al., 2002).

La representación contextual va más allá de una mera representación espacial del ambiente. A la información espacial puramente geométrica se embebe información sobre el estado interno de los individuos, por ejemplo integrando elementos emocionales como el miedo y la presencia de estímulos externos salientes, como la presencia de otros individuos (Frost et al., 2021; Hyman et al., 2012; Murugan et al., 2017; Sotres-Bayon et al., 2012). Además, está influenciada por la demanda cognitiva y la experiencia previa, siendo influenciada por la novedad y elementos evocados de la memoria (Zhao et al., 2022). Es así que para un desempeño comportamental correcto resulta fundamental poder establecer una representación contextual precisa, lo que permite valorar adecuadamente la situación actual y responder de manera óptima a la misma.

En este trabajo nos propusimos estudiar cómo la mPFC codifica la información contextual saliente durante la exploración del ambiente y qué alteraciones en dicha codificación están presentes en el modelo murino de esquizofrenia con ablación postnatal temprana de rNMDA asociados a interneuronas PV+ cortico-límbicas (Belforte et al., 2010). Para esto, registramos la actividad de neuronas únicas de la mPFC en ratones machos adultos, 6 animales mutantes (KO) y 7 animales controles (CTRL), mientras realizaban una serie de tareas de exploración espontánea en las cuales varía la carga cognitiva y emocional asociada al contexto: 1) exploración en un corredor lineal; 2) exploración en el corredor lineal con contexto enriquecido por la presencia de un estímulo social novedoso y un objeto inanimado; 3) exploración de un laberinto en forma de Y, compuesto por 3 brazos idénticos, que presenta una carga cognitiva adicional en el centro donde los animales deben elegir qué brazo visitar para maximizar la exploración. A continuación abordaremos los resultados de estas pruebas en orden presentando tanto los resultados comportamentales como los obtenidos de los registros electrofisiológicos in-vivo.

Actividad de neuronas piramidales de la mPFC en tareas de exploración sobre un corredor lineal con distintos niveles en la carga contextual: prueba de discriminación social-objeto.

Al igual que los seres humanos, los ratones presentan un alto componente de sociabilidad en su etología. Son capaces de desarrollar interacciones sociales complejas que dan lugar a conductas reproductivas, parentales, juego juvenil, dominancia social y agresión. Poseen tanto la capacidad de reconocer a un congénere como de expresar empatía por el mismo. Es entonces que la presencia de un congénere en un ambiente resulta ser un estímulo altamente relevante para un ratón. Entender de qué forma los circuitos neuronales procesan la información social y conocer cómo es la dinámica de dicha codificación resulta fundamental para comprender qué alteraciones afectan aspectos de la sociabilidad en trastornos neuropsiquiátricos, como ocurre en la esquizofrenia.

En el primer objetivo específico de este trabajo nos propusimos estudiar cómo las neuronas de la mPFC responden en una prueba de exploración espontánea sobre un corredor lineal en contextos donde se complejiza la carga cognitiva y emocional de la tarea. Para esto registramos en un contexto basal como lo es el corredor lineal vacío y posteriormente en una condición de contexto enriquecido por la presencia de un estímulo social novedoso y un objeto inanimado en los extremos. Como estímulo social consideramos a un demostrador macho adulto joven que no induce respuestas de agresividad en los animales observadores.

Para estas pruebas utilizamos una versión modificada de la tarea de discriminación social-objeto de Lee et al., (2016), la cual consiste en colocar un ratón adulto joven y un objeto inanimado en cada extremo de un corredor lineal de 78 x 7 x 15 cm (largo x ancho x alto) y con paredes bajas (1 cm de alto), en condiciones experimentales detalladas en la sección de MyM «Protocolos comportamentales».

La elección de un corredor lineal como prueba de exploración nos confiere ciertas ventajas metodológicas. Se trata de una prueba de exploración libre, sin restricción de agua o alimento, que evoca comportamientos estereotipados, evocando transiciones espontáneas de un extremo al otro para maximizar la exploración. Además, debido a las dimensiones del laberinto, el

comportamiento está principalmente restringido a la dimensión longitudinal lo que nos permite evaluar dos importantes cuestiones. En primer lugar, nos permite evaluar la preferencia social de forma similar al test tradicional de las tres cámaras planteado primeramente por Crawley (2004) pero presenta una exigencia adicional ya que los animales necesitan desplazarse 78 cm para llegar de un extremo al otro, una distancia considerable para un ratón aumentando la demanda cognitiva asociada a la toma de decisión. En segundo lugar, nos permite evaluar la sincronización entre neuronas de la mPFC y el ritmo theta del vHP (el cual abordaremos posteriormente en este trabajo) mientras los animales realizan comportamientos exploratorios (Siapas et al., 2005).

En la Figura R1A, se puede observar un esquema del curso temporal de una sesión de registro: luego de conectar al animal al amplificador, se comienza a adquirir la actividad neuronal con el animal en reposo en una arena neutral a la cual se encuentra previamente habituado (*holding cage*) durante 5 minutos. Sin detener el registro, el animal es colocado sobre el corredor lineal registrándose la actividad durante 10-15 minutos de exploración libre. Luego de repetir un descanso de 5 minutos en la arena neutral, se reintroduce a los animales por 10-15 minutos al corredor lineal ahora enriquecido con un estímulo social (ratón macho adulto C57Bl/6) en uno de los extremos y en el otro un objeto inanimado (frasco de vidrio de tamaño similar al de un ratón). Ambos estímulos se encuentran adosados a los extremos del corredor con jaulas de presentación, a las cuales los animales demostradores se encuentran previamente habituados. A modo de simplificación estas tareas serán denominadas como LT: corredor lineal vacío (siglas provenientes del término en inglés *linear track*), y SO: corredor lineal enriquecido por los estímulos social-objeto.

En este estudio, los ratones realizan una sesión diaria de LT y SO, la cual se repite entre 3 y 5 veces en días consecutivos o con períodos de descanso. También hay sesiones donde los animales solo realizan la prueba LT o solo la prueba SO. Evitamos hacer la prueba en sentido opuesto, donde la prueba SO precede a la LT, para evitar influir en la capacidad de exploración de los animales en la prueba LT al pasar de una tarea más compleja a una menos compleja.

A diferencia de otros experimentos donde se restringe el acceso de los animales a agua o comida para motivarlos y obtener una recompensa, en nuestros experimentos sin restricciones estamos evaluando la tendencia natural de exploración de los animales en estas tareas, sin alterar su motivación interna. Esto puede suponer un desafío, ya que si los animales no se sienten lo

suficientemente motivados internamente, podrían optar por no explorar el ambiente o hacerlo de manera parcial. Para asegurar que los animales se mantengan motivados a explorar durante la tarea SO, en cada repetición de la prueba utilizamos ratones novedosos como estímulos sociales. Así garantizamos que el estímulo social sea percibido como novedoso en cada sesión, independientemente de si la tarea en sí es nueva o repetida. Además, alternamos la ubicación de los estímulos social y objeto de manera pseudo-aleatoria entre sesiones.

Es relevante destacar que, aunque los animales están habituados a la sala de registro y al corredor lineal, cada sesión implica una nueva exposición al ambiente. Con esto en mente, clasificamos las sesiones de LT y SO en dos categorías: sesiones de alta "novedad", donde las tareas no se habían realizado en hasta dos días previos, y sesiones de baja novedad o "reexposición", donde se repite la tarea en días consecutivos. Esta clasificación nos permite evaluar cómo la familiaridad con las tareas en días consecutivos puede afectar el comportamiento de exploración de los animales.

Animales KO no logran establecer una preferencia social durante la reexposición a la tarea de discriminación social.

Durante la exploración en el corredor lineal, los animales exhiben conductas estereotipadas, realizando corridas o transiciones desde un extremo al otro del corredor. Además, destinan gran parte del tiempo a explorar los extremos del corredor lineal. En todo momento, los animales pueden orientarse en su ubicación espacial ya que la habitación de registro está diseñada con claves distales y fijas que proporcionan información espacial constante al animal.

Para poder estudiar la actividad de las neuronas de la mPFC durante la exploración del corredor lineal y, más específicamente, durante la exploración del estímulo social o del objeto, primero fue necesario establecer las zonas de interacción. Para esto, establecimos segmentos idénticos sobre el corredor lineal que denominamos “bines”, en total 9 bins de 8,7 cm cada uno, como se puede observar en los esquemas de la Figura R1A. El tamaño elegido de los segmentos corresponde aproximadamente al espacio que ocupa un ratón. De esta forma, podemos estudiar cómo cambia la actividad de las neuronas en función de la posición en el corredor lineal, lo que abordaremos con detalle en las próximas secciones.

En la Figura R1B se presentan ejemplos representativos del comportamiento de los animales durante una sesión típica de las pruebas LT y SO. En estos ejemplos, se puede observar que el animal CTRL realiza transiciones con pequeñas pausas en los extremos, en las cuales mayoritariamente se dedica a explorar visualmente el entorno. Esto ocurre tanto en el contexto del LT como en el SO, en donde la exploración de los extremos (ahora con valencias distintas) se refuerza por la presencia del congénere o el objeto. Un análisis cualitativo de la conducta muestra que el animal KO es capaz de realizar transiciones de manera similar a los animales CTRL, lo que indica que el animal mutante puede llevar a cabo comportamientos exploratorios en este tipo de tareas.

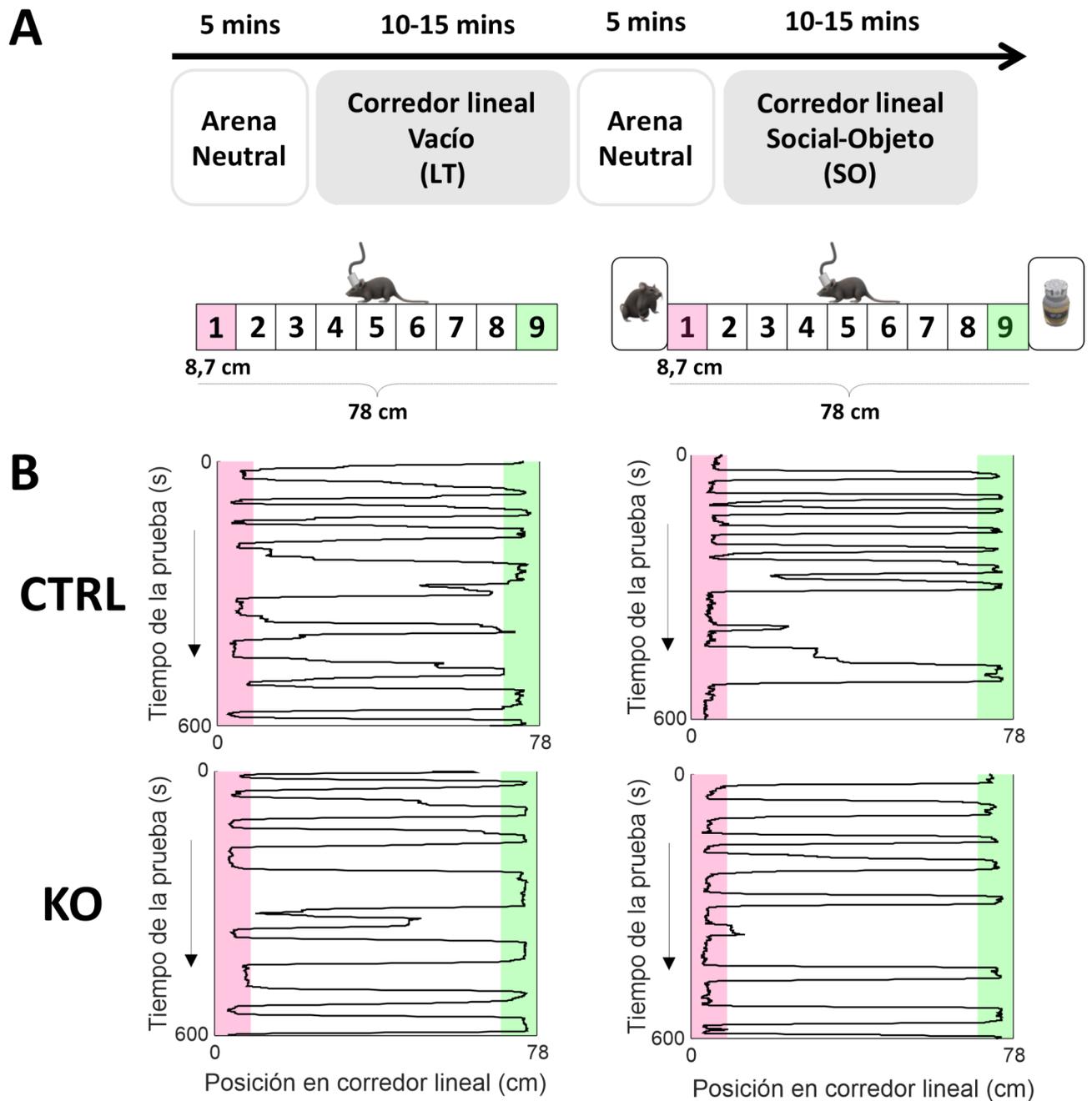


Figura R1. Registros electrofisiológicos *in-vivo* en ratones KO y CTRL mientras realizan una tarea de discriminación social-objeto sobre un corredor lineal. (A) Curso temporal de una sesión completa de registro. Se muestra un esquema del corredor lineal en ausencia (LT) y en presencia (SO) de los estímulos novedosos. Se puede observar el corredor lineal utilizado de 78 x 7 x 15 cm (largo x ancho x alto) y con paredes bajas (1 cm de alto). Segmentamos el corredor lineal en 9 bins de 8,6 cm, de los cuales se encuentran resaltadas las regiones de interacción (lado social en rosa y lado objeto en verde). (B) Ejemplos representativos del comportamiento de los animales durante el transcurso de las pruebas LT y SO. Se observa el recorrido de un animal (arriba: CTRL y abajo: KO) sobre el corredor lineal en función del tiempo. Los animales realizan una conducta estereotipada, realizando transiciones espontáneas desde un extremo al otro del corredor lineal.

Para cuantificar el comportamiento exploratorio en las tareas LT y SO, calculamos el tiempo de permanencia en cada bin. Así determinamos la preferencia de exploración basada en la ubicación a lo largo del corredor lineal y si se dedica más tiempo a los segmentos extremos donde están los estímulos (social en el bin 1 y objeto en el bin 9). Tanto para el grupo CTRL como el grupo KO, observamos diferencias significativas al comparar los tiempos de permanencia en cada bin entre ambas pruebas. Durante la prueba SO, observamos que el tiempo en el bin 1 aumenta significativamente para el grupo CTRL (Figura R2, CTRL bin 1: LT 29.3 ± 3.1 % vs SO 51.0 ± 3.6 %; bin 9: LT 26.2 ± 3.5 % vs SO 27.8 ± 3.3 %). De manera similar, en el grupo KO, observamos un aumento significativo en el tiempo invertido tanto en el bin 1 como en el bin 9 (Figura R2, KO bin 1: LT 27.7 ± 3.7 % vs SO 47.0 ± 4.5 %; bin 9: LT 23.8 ± 2.4 % vs SO 40.4 ± 5.1 %). Estos resultados indican que la exploración a lo largo del corredor lineal cambia según la carga contextual de la tarea, priorizando la exploración de los extremos en el caso de la prueba SO. En línea con los ejemplos en la Figura R1, en el contexto enriquecido los animales tienden a realizar transiciones más estereotipadas para maximizar la exploración de los extremos, ahora con distinta valencia. En particular, los animales CTRL muestran preferencia por el estímulo social, mientras que el grupo KO aumenta la exploración de ambos extremos (tanto social como objeto).

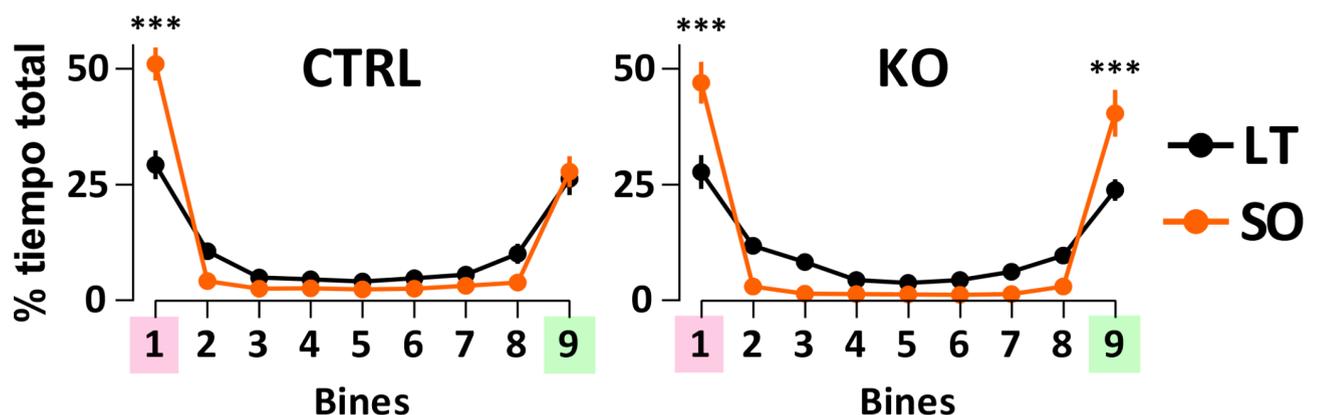


Figura R2. En el contexto enriquecido por el estímulo social y el objeto (prueba SO), se exagera la exploración de los extremos del corredor lineal en comparación con la prueba LT. Se muestran los tiempos de permanencia en cada bin expresados como porcentaje del tiempo total de exploración, realizando la comparación entre las tareas LT y SO para cada grupo experimental. En color rosa se denota el lado del estímulo social y en verde el lado del estímulo objeto. Se puede observar que en el grupo CTRL, el patrón de exploración cambia destinando un mayor tiempo de exploración al bin social (*two-way RM ANOVA*; interacción $F(8, 352) = 10,4$, $p < 0,001$; bin 1: LT 29.3 ± 3.1 % vs SO 51.0 ± 3.6 %, *post-hoc* Bonferroni's test

*** $p < 0.001$). De forma similar, en SO el grupo KO invierte más tiempo en la exploración de los extremos, tanto del bin social como del bin objeto (two-way RM ANOVA; interacción $F(8, 464) = 11.4$, $p < 0.001$; bin 1: LT $27.7 \pm 3.7\%$ vs SO $47.0 \pm 4.5\%$; bin 9: LT $23.8 \pm 2.4\%$ vs SO $40.4 \pm 5.1\%$; post-hoc Bonferroni's test *** $p < 0.001$). N de sesiones: 27 de LT y 24 de SO de 6 animales CTRL, y 37 de LT y 23 de SO de 5 animales KO.

Considerando que los animales tienen una tendencia innata a explorar más al estímulo social que a un objeto inanimado durante las tareas de discriminación social-objeto (Crawley, 2004), el aumento en la exploración de ambos extremos por parte del grupo mutante sugiere posibles alteraciones en la discriminación de los estímulos. Para investigar esta idea, evaluamos si existen diferencias en el comportamiento exploratorio entre los genotipos durante las pruebas LT y SO. En la prueba LT, no encontramos diferencias significativas en los tiempos de permanencia por bin entre CTRL y KO (comparando las curvas negras en la Figura R2, two-way RM ANOVA; interacción $F(8, 456) = 0.31$, $p = 0.97$; factor bin $F(8, 456) = 41.1$, $p < 0.001$; factor genotipo $F(1, 57) = 1.1$, $p = 0.31$, n de sesiones = 22 de CTRL y 37 de KO). Sin embargo, en la prueba SO, observamos una interacción significativa entre el genotipo y los bins del corredor lineal (comparando las curvas naranjas en la Figura R2, two-way RM ANOVA; interacción genotipo x bin $F(8, 360) = 2.6$, $p = 0.01$; n de sesiones = 24 de CTRL y 23 de KO). Estas diferencias se centran principalmente en la exploración del bin 9 (lado objeto, CTRL $27.8 \pm 3.3\%$ vs KO $40.4 \pm 5.1\%$ post-hoc Bonferroni's test $p < 0.001$), mientras que no encontramos diferencias en la exploración del bin 1 (lado social, CTRL $51.0 \pm 3.6\%$ vs KO $46.9 \pm 4.5\%$).

Es importante tener en cuenta que en estos análisis consideramos todas las sesiones de registro sin considerar el efecto que podría tener la novedad de la tarea en el comportamiento exploratorio de los animales. Como mencionamos previamente, diferenciamos las sesiones en 'Novedad' y 'Reexposición'. En la Figura R3, presentamos los tiempos de permanencia por bin para las tareas LT y SO, discriminando las sesiones de novedad y de reexposición. En las sesiones de mayor novedad, durante la prueba LT, el grupo KO no muestra diferencias significativas en los tiempos de permanencia por bin en comparación con los animales CTRL (ver Figura R3A, prueba LT). De manera similar, en la prueba SO, no observamos diferencias significativas entre genotipos en los tiempos de permanencia por bin (ver Figura R3A, prueba SO). Los patrones de exploración se mantienen sin diferencias significativas entre genotipos en las sesiones de reexposición a la prueba LT (ver Figura R3B, prueba LT). Sin embargo, durante la reexposición a la tarea SO, observamos una

interacción significativa entre el genotipo y los bins (ver Figura R3B, prueba SO). En el bin donde los animales interactúan con el estímulo social, el grupo KO exhibe un menor tiempo de permanencia en comparación con el grupo CTRL (Figura R3B, en bin 1 CTRL $56.0 \pm 4.7\%$ vs KO $45.1 \pm 6.3\%$). De igual manera, los mutantes destinan más tiempo a la exploración del lado objeto (en bin 9 CTRL $24.8 \pm 4.3\%$ vs KO $40.8 \pm 7.8\%$). En su conjunto, estos resultados indican la presencia de un componente de novedad que puede influir en la exploración de los animales, especialmente notable en el grupo KO, donde las diferencias en el patrón de exploración en la prueba SO emergen con la reexposición a la tarea.

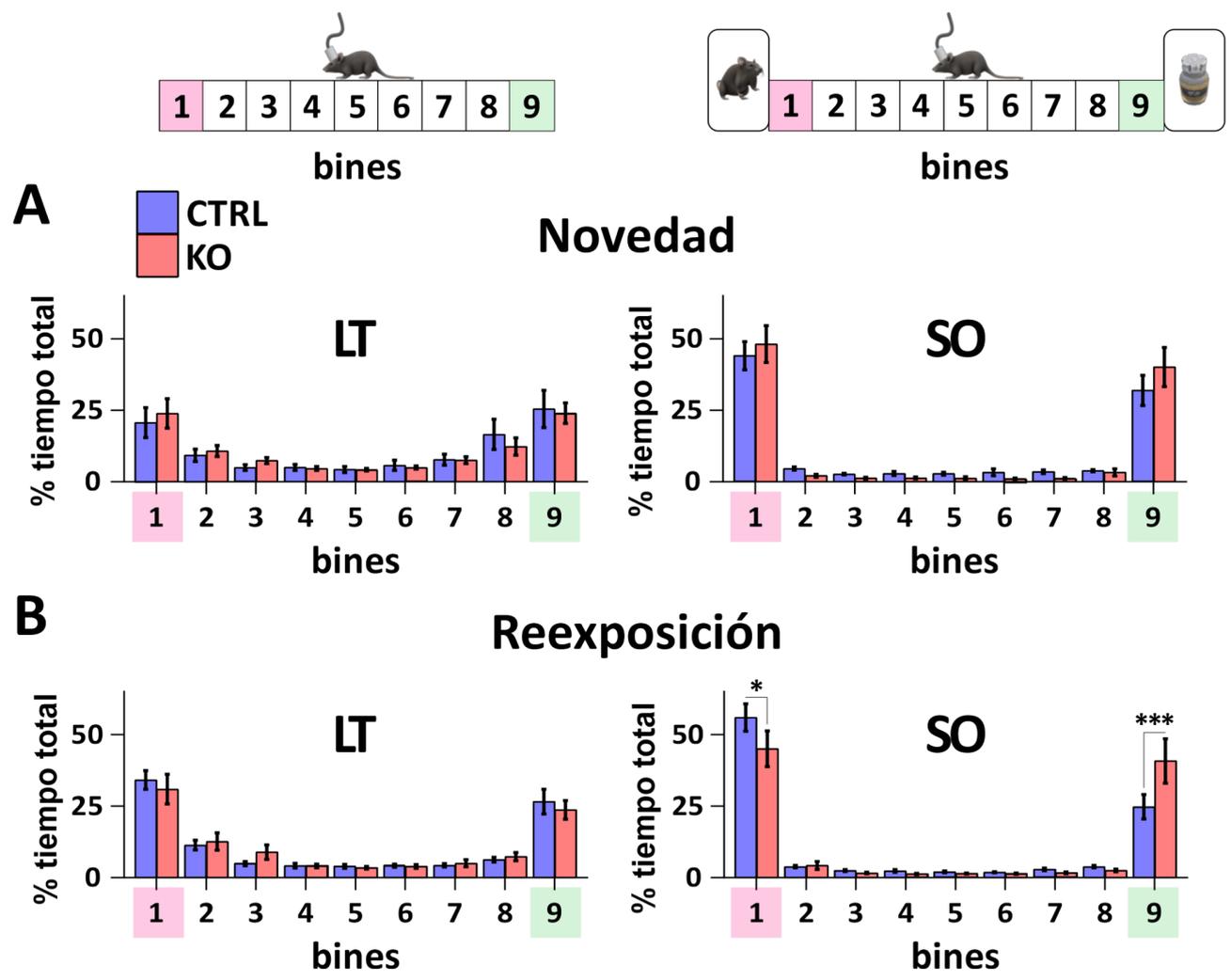


Figura R3. El grupo KO muestra un patrón de exploración diferente al grupo CTRL en las sesiones de reexposición a la tarea SO. En cada gráfico se muestra el porcentaje del tiempo total de exploración en función de cada segmento (bin) del corredor lineal para las tareas LT y SO. En (A) se muestran sesiones de novedad. No se observan diferencias significativas entre genotipos respecto de los tiempos de exploración en LT y SO (two-way RM ANOVA; prueba LT: interacción $F(8, 184) = 0.23$, $p = 0.99$; factor bin $F(8, 184) =$

11.1, $p < 0.001$; factor genotipo $F(1, 23) = 0.76$, $p = 0.39$; prueba SO: interacción $F(8, 176) = 0.64$, $p = 0.74$; factor bin $F(8, 176) = 56.2$, $p < 0.001$; factor genotipo $F(1, 22) = 2.5$, $p = 0.13$). En **(B)** se muestran sesiones de reexposición. Durante la tarea LT no se observan diferencias entre genotipos, mientras que en la prueba SO emergen diferencias en los tiempos de exploración de los extremos social y objeto (two-way RM ANOVA; prueba LT: interacción $F(8, 256) = 0.36$, $p = 0.94$; factor bin $F(8, 256) = 33.0$, $p < 0.001$; factor genotipo $F(1, 32) = 0.8$, $p = 0.38$; SO: interacción genotipo x bins $F(8, 168) = 2.9$, $p = 0.004$; media \pm SEM: Bin 1 CTRL $56.0 \pm 4.7\%$ vs KO $45.1 \pm 6.3\%$; Bin 9 CTRL $24.8 \pm 4.3\%$ vs KO $40.8 \pm 7.8\%$; post-hoc Bonferroni's test $*p < 0.05$, $***p < 0.001$). N de sesiones: En (A) prueba LT: 13 CTRL y 17 KO, prueba SO: 10 CTRL y 14 KO; En (B) prueba LT: 14 CTRL y 20 KO, prueba SO 14 CTRL y 9 KO. Los datos provienen de 6 animales CTRL y 5 animales KO.

Los tiempos de exploración similares entre el lado social y el objeto en el grupo KO podrían deberse a una falta de capacidad de discriminar al objeto del congénere, o bien por una preferencia determinada por uno u el otro la cual podría atribuirse de manera azarosa. Para poner a prueba esta idea analizamos los tiempos de permanencia en el lado social y en el lado objeto para cada sesión de cada animal registrado. En la Figura R4 se puede observar cómo es la preferencia social-objeto en cada una de las sesiones de la prueba SO, discriminando en días de novedad y de reexposición. Los ratones CTRL discriminan ambos extremos y manifiestan una clara preferencia por el lado social (con excepción de un ratón en dos sesiones independientes). Esta preferencia resulta ser significativa con la reexposición a la tarea SO (Figura R4 CTRL reexposición: lado social $56.0 \pm 4.7\%$ vs lado objeto $24.8 \pm 4.3\%$). Así, podemos ver que los ratones CTRL logran establecer la preferencia social esperada en una tarea de interacción social de estas características. En cambio, en el grupo KO, tanto en sesiones de novedad como de reexposición, no se observan diferencias significativas en los tiempos de exploración entre los lados social y objeto (Figura R4 KO novedad: lado social $48.2 \pm 6.5\%$ vs lado objeto $40.1 \pm 6.9\%$, reexposición: $45.1 \pm 6.3\%$ vs lado objeto $40.8 \pm 7.8\%$). Sin embargo, al analizar individualmente las sesiones, observamos que los ratones KO son capaces de discriminar ambos extremos, explorandolos diferencialmente. No obstante, a diferencia del grupo CTRL, en promedio no establecen una preferencia definida por el estímulo social. Estos resultados sugieren que los ratones KO no tienen problemas en la discriminación entre los estímulos social-objeto, sino que presentan un comportamiento preferencial errático, con sesiones donde prefieren el estímulo social y otras donde lo evitan. Este patrón es persistente con la reexposición y es compatible con un comportamiento social alterado en donde el ratón KO no puede establecer adecuadamente la valencia del estímulo social.

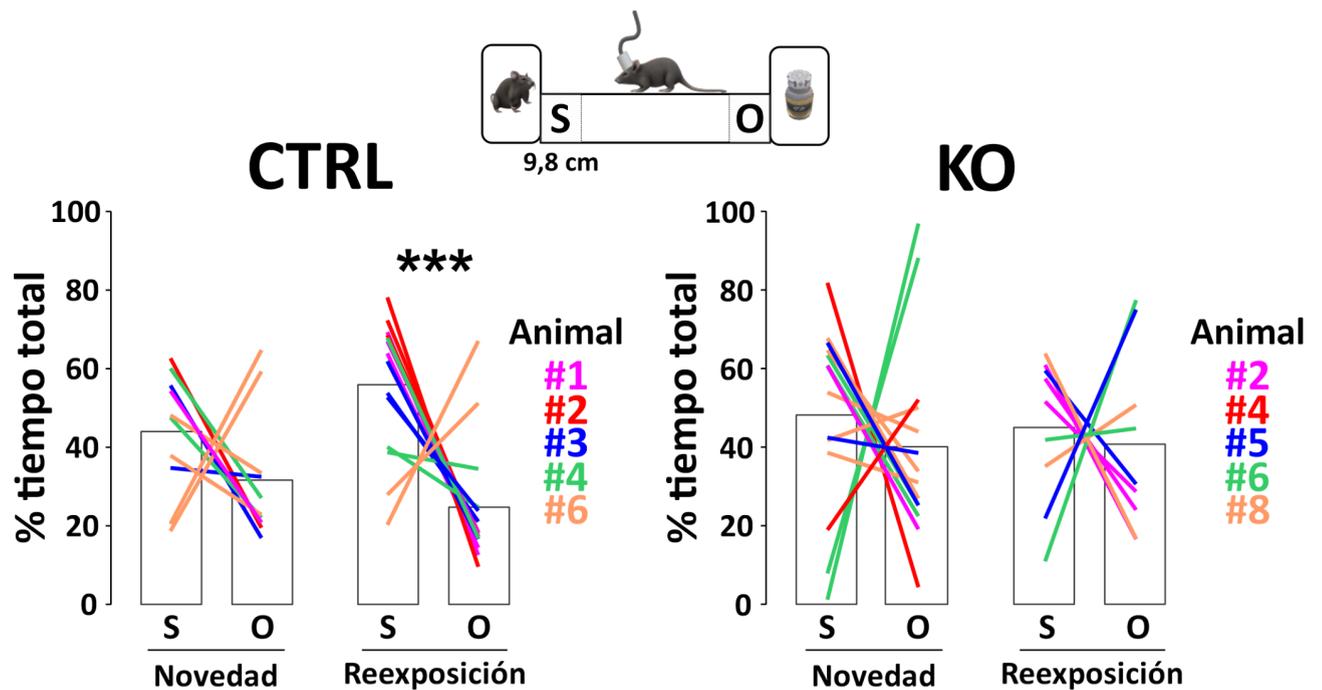


Figura R4. La preferencia social se consolida con la reexposición a la tarea SO en los CTRL, mientras que los KO mantienen un comportamiento social errático. Comparación del tiempo de permanencia en el extremo social (bin 1) y objeto (bin 9) en función del tipo de sesión (novedad y reexposición). Cada línea corresponde a los datos pareados de una sesión. Los colores diferencian las sesiones provenientes de cada animal registrado y la identificación se condice con la tabla M1. Se observa que el grupo CTRL establece una preferencia social significativa que emerge con la reexposición a la tarea SO (media \pm SEM: lado social 56.0 ± 4.7 % vs lado objeto 24.8 ± 4.3 %, post-hoc Bonferroni's test *** $p < 0.001$). El grupo KO presenta sesiones con preferencia al social y otras de evitación. No se observan diferencias significativas en los tiempos de exploración del lado social y del objeto. N de sesiones: en CTRL novedad 10 y reexposición 14, en KO novedad 14 y reexposición 9. Los datos provienen de 5 animales CTRL y 5 animales KO.

La codificación de información contextual a nivel de neurona única en la mPFC está conservada en los KO. Los ratones mutantes presentan un déficit en el reclutamiento de neuronas codificantes en la mPFC exclusivamente en un contexto de alta carga cognitiva.

La técnica de tetrodos nos permite registrar la actividad de múltiples neuronas en una región de la mPFC mientras los animales realizan las distintas tareas de exploración (Buzsáki, 2004; Gray et al., 1995; O'Keefe & Recce, 1993). Si bien este tipo de registros ya habían sido realizados por nuestro grupo (Alvarez et al., 2020; Belforte et al., 2010), parte de mi trabajo consistió en la puesta a punto tanto de la confección de los *microdrives* que implantamos (detallado en MyM «Microdispositivo de registro») como de los registros crónicos con tetrodos en animales despiertos. De los animales registrados, 6 CTRL y 6 KO cumplieron con una buena calidad de señal y una correcta ubicación de los tetrodos de registros en la mPFC. Cada animal contribuye de manera distinta al número de neuronas aisladas, por lo que para algunos análisis consideramos 5-6 animales y esta información se puede ver en detalle en la tabla M1 de materiales y métodos.

A modo de resumen de la metodología utilizada, se utilizó un software desarrollado por el laboratorio de Buzsáki (Hazan et al., 2006), para extraer y analizar las espigas (potenciales de acción extracelular) registradas por los tetrodos y asignarlas a un cluster determinado. Posteriormente, se clasificó a las neuronas según su tipo neuronal (interneuronas o piramidales putativas), en base a parámetros temporales de la forma de las espigas, descrito previamente por Barthó et al., (2004) y ya utilizados en trabajos previos de nuestro grupo de trabajo (Alvarez et al., 2020).

Como se puede observar en la Figura R5A, calculamos los parámetros A y B relacionados con la forma temporal de las espigas. Así, identificamos de manera efectiva aquellas neuronas que presentan una forma de onda compatible tanto con piramidales como interneuronas. También se presentan ejemplos de espigas para ambos grupos experimentales, notando que las neuronas del grupo KO conservan formas de onda similares al CTRL. La Figura R5B muestra la existencia de dos subpoblaciones (*clusters*) claramente definidas correspondiendo a interneuronas y neuronas piramidales. Las unidades en la interfaz entre los grupos se verificaron caso a caso para asegurar su pertenencia. De los 6 animales CTRL, obtuvimos un total de 317 neuronas, de las cuales 111 son

interneuronas y 206 son piramidales. En el grupo KO, de los 6 animales, clasificamos un total de 405 neuronas, de las cuales 47 son interneuronas y 358 son piramidales. En este trabajo, decidimos centrarnos exclusivamente en el estudio de las neuronas piramidales. Aunque este grupo podría incluir otros tipos de neuronas con formas de espiga similares, como las interneuronas SOM+, asumimos que se encuentra enriquecido con neuronas piramidales putativas. En lo que resta del trabajo, a modo de simplificación, nos referiremos a este grupo de neuronas clasificadas como simplemente "neuronas piramidales". Por otro lado, es importante notar que logramos aislar un escaso número de interneuronas en el grupo KO. Solo el 10% de las neuronas totales registradas corresponden a interneuronas de tipo *fast-spiking*, lo que dificulta el análisis de este grupo neuronal durante las pruebas SO.

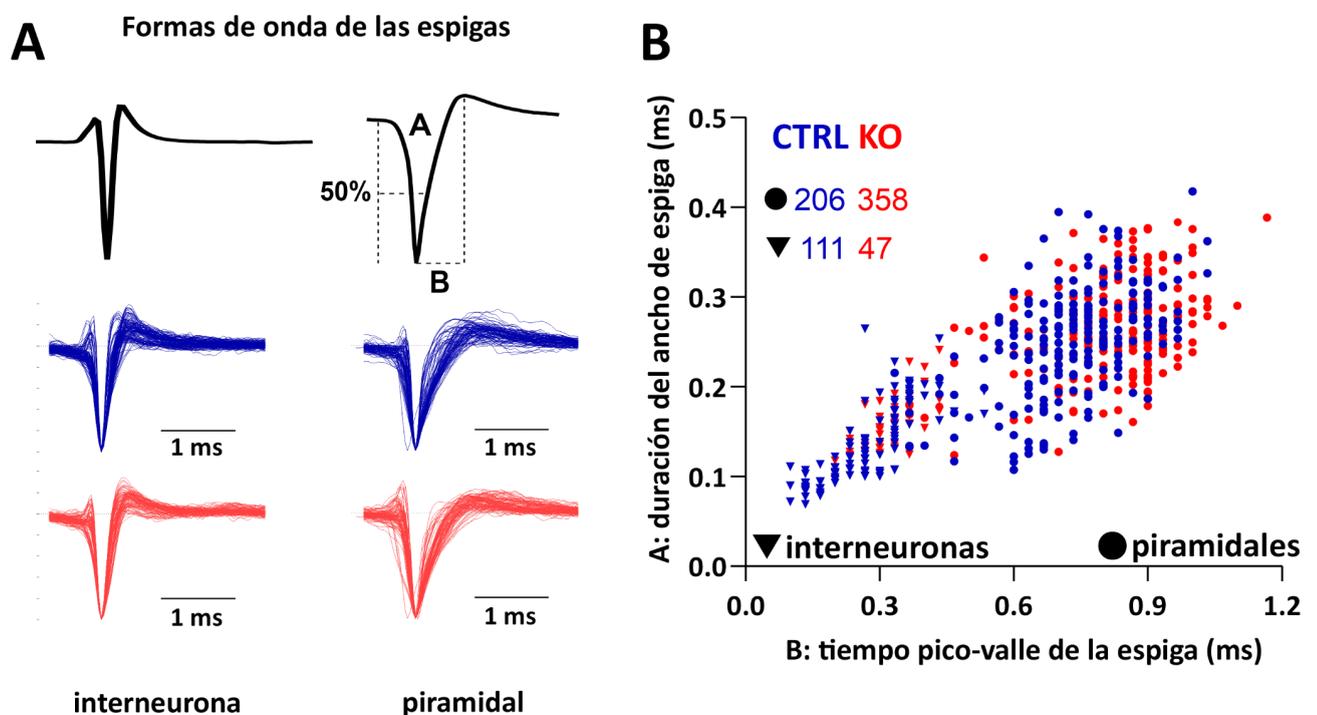


Figura R5. Clasificación de las unidades aisladas en interneuronas o piramidales, basada en parámetros temporales de las formas de las espigas. (A) Se muestran las formas de onda representativas de interneurona y de piramidal. Cada espiga representa un potencial de acción extracelular registrado. Se indican los parámetros temporales utilizados (A: duración del ancho de la espiga al 50% de su amplitud, B: tiempo pico-valle desde el mínimo hasta el máximo de la onda). Se pueden observar trazos de 100 espigas clasificadas como interneuronas y piramidales para el grupo control (azul) y mutante (rojo). Las espigas están normalizadas por amplitud pico-valle. No se observan diferencias en las formas de onda entre grupos. **(B)** Gráfico representando la parametrización de la forma de onda promedio de cada una de las neuronas registradas, utilizando los parámetros A y B. Nótese la clara separación de los clusters correspondientes a las interneuronas y las piramidales. No se observaron diferencias entre los grupos CTRL y KO. Los puntos intermedios fueron clasificados de forma individual. N de neuronas: 111 interneuronas y 206 piramidales provenientes de 6 animales CTRL; 47 interneuronas y 358 piramidales provenientes de 6 animales KO.

Para explorar la codificación de la información social por parte de las neuronas piramidales en la mPFC durante la prueba SO, examinamos sus patrones de actividad en relación a la posición del animal en el corredor lineal. Para esto, calculamos la frecuencia media de disparo de las neuronas en cada uno de los 9 bins del corredor. Dado que las neuronas pueden variar su actividad en distintas fases de la tarea, normalizamos los datos en función de la varianza total de la actividad en los 9 segmentos del laberinto. Entonces, para cada neurona calculamos la frecuencia de disparo normalizada como Z-score para cada "BIN X" siguiendo la ecuación $[Z_{\text{BIN X}} = (\text{FD}_{\text{BIN X}} - \text{FD}_{\text{media}_{\text{BINES}}}) / \text{DS}_{\text{BINES}}]$, donde FD es la frecuencia de disparo y DS es el desvío estándar. El subíndice "BINES" denota la conjunción de los 9 segmentos del corredor lineal. De esta manera calculamos los perfiles de actividad normalizada de cada neurona, como se muestra en la Figura R6. Por último, establecimos nuestro criterio de actividad considerando que las neuronas se activan significativamente en valores de $Z > 1$ y se inhiben en valores de $Z < -1$ (su actividad dista al menos por 1 desvío estándar respecto de la media).

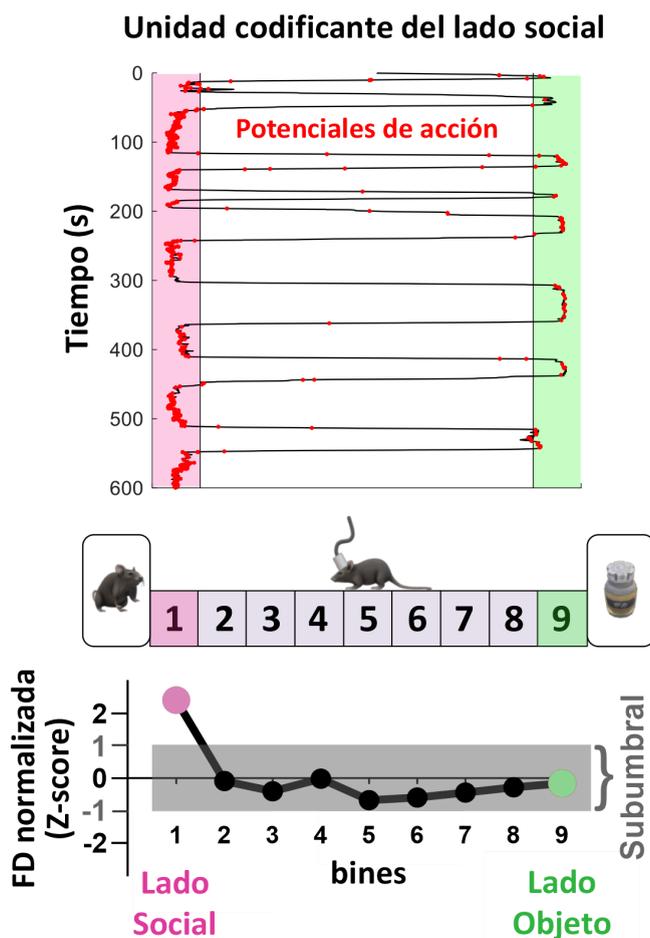
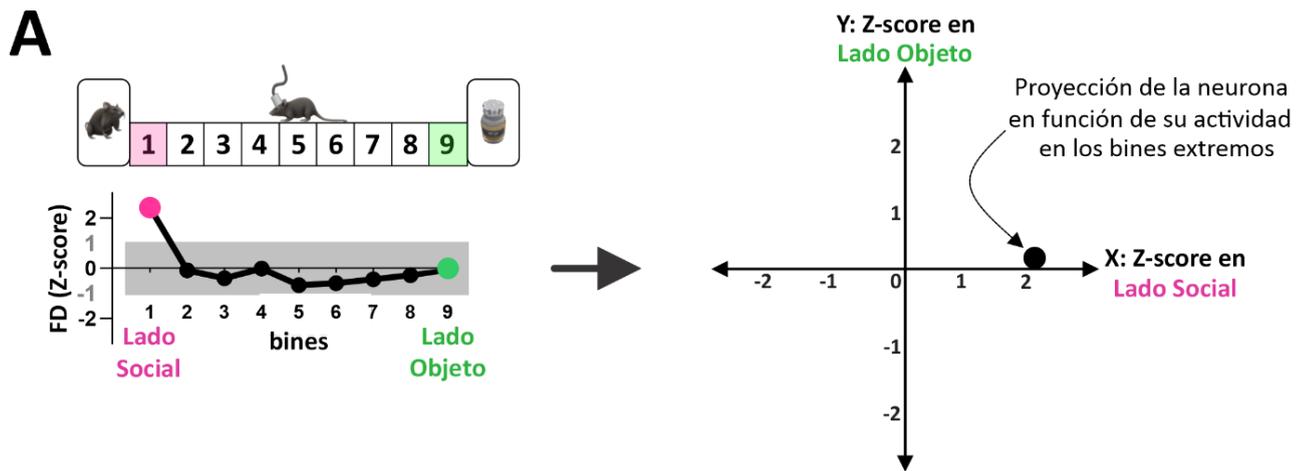


Figura R6. Método utilizado para calcular la actividad de las neuronas en los 9 bins del corredor lineal.

Panel superior: Ejemplo de la actividad de una neurona (cada punto rojo representa un potencial de acción) durante el comportamiento del animal (trazo negro) en una sesión SO.

Panel inferior: "Perfil de actividad normalizada" que calculamos para la neurona ejemplo. Este corresponde al perfil de actividad sobre el corredor lineal en escala de Z-score, y consideramos que la neurona se activa en valores de $Z > 1$ y se inhibe en valores de $Z < -1$. En este ejemplo se muestra una neurona que se activa significativamente en el lado social (supera el umbral en el bin 1).

En los últimos años, ha surgido un creciente interés en el estudio de los procesos cognitivos involucrados en las conductas sociales. Se ha observado que las neuronas piramidales en la mPFC pueden responder de manera específica a la ubicación de un estímulo social, incluso mostrando respuestas a la ubicación de un objeto inanimado (Murugan et al., 2017). Con esta premisa en mente, desarrollamos un sistema de clasificación de neuronas basado principalmente en sus patrones de actividad en relación a los segmentos extremos del corredor lineal. Al analizar la actividad normalizada en el lado social (definido arbitrariamente como el bin 1, pero la ubicación real fue pseudo-randomizada) y en el lado objeto (bin 9), las neuronas pueden mostrar respuestas significativas, ya sea activándose ($Z > 1$) o inhibiéndose ($Z < -1$); o por otro lado, mostrar una actividad subumbral (valores de Z entre 1 y -1). Como se puede observar en la Figura R7A, analizamos la frecuencia de disparo normalizada en los segmentos extremos para cada neurona. Establecimos umbrales de actividad en $Z = -1$ y $Z = 1$ para ambos lados, lo que resultó en 9 posibles perfiles de actividad (ver los 9 cuadrantes que se forman delimitados por los umbrales en la Figura R7B). Las neuronas que mostraron activación o inhibición exclusivamente en el lado social las denominamos "neuronas codificadoras del lado social". De manera similar, a las que lo hicieron en el lado objeto las denominamos "neuronas codificadoras del lado objeto". Aquellas que presentaron respuestas opuestas en los extremos las clasificamos como "neuronas hiperdiscriminantes", sugiriendo que podrían estar integrando información de ambos lados. Además, encontramos neuronas que respondieron de manera similar en ambos extremos, a las que llamamos "neuronas no específicas". Por último, aquellas neuronas que no mostraron cambios significativos en ningún extremo corresponden al grupo subumbral. En la Figura R7C se detalla la clasificación en las distintas categorías resultantes. Es importante señalar que utilizamos este mismo método de clasificación para analizar las sesiones LT, considerando a los bin 1 y bin 9 respecto de la ubicación de los estímulos social y objeto en la tarea SO. Para aquellas sesiones donde solo se realizó la tarea LT, realizamos una aleatorización de los extremos respecto de las claves distales presentes en la habitación de registro.



Clasificación de neuronas registradas según su respuesta al lado social y al lado objeto

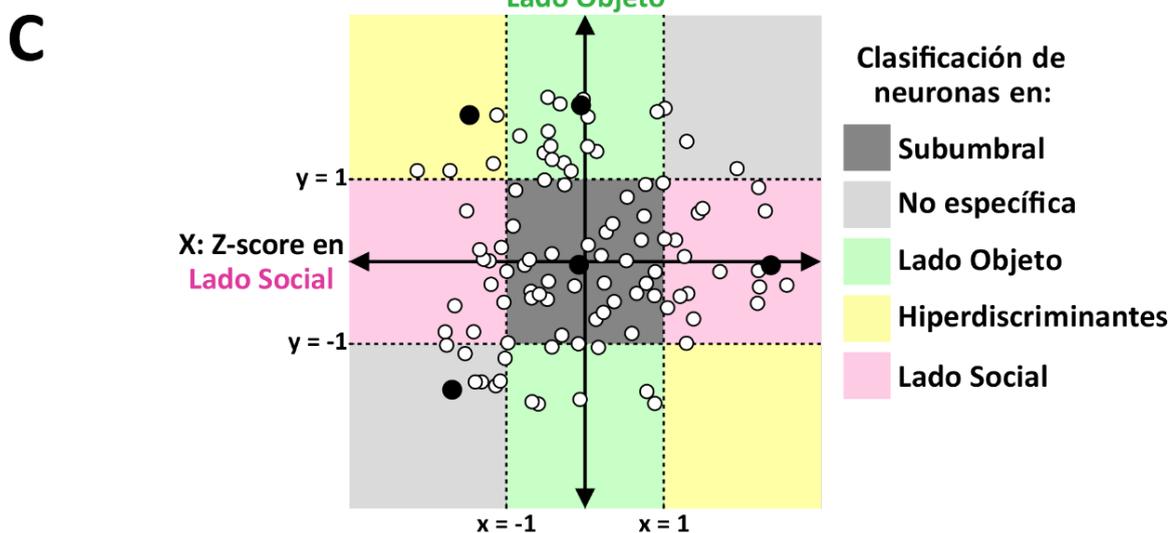
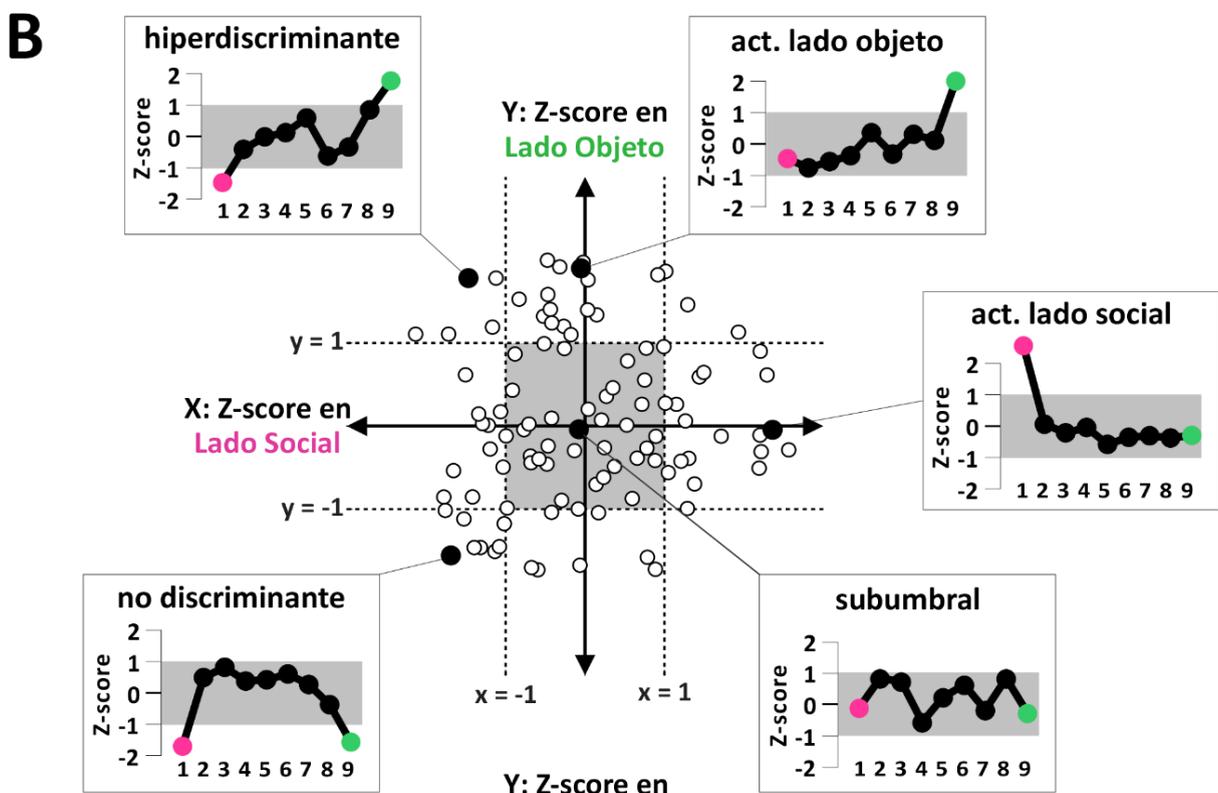


Figura R7. Clasificación de las neuronas piramidales según su actividad en los extremos del corredor lineal. Se presenta el método de clasificación de las neuronas piramidales basado en la frecuencia de disparo normalizada en los extremos del corredor lineal (bin 1 para el lado social y bin 9 para el lado objeto). **(A)** Ejemplo de una neurona: si consideramos una neurona que muestra una activación significativa en el lado social ($Z > 1$), pero permanece subumbral en el lado objeto, la clasificamos como "neurona codificante del lado social". **(B)** Gráfico de la actividad normalizada: a modo de explicación del método representamos las neuronas registradas en el grupo CTRL para la tarea SO con puntos blancos. Observamos cómo se ubican en función del z-score en los extremos. Los puntos negros destacan ejemplos representativos de neuronas clasificadas y los perfiles de actividad normalizada. **(C)** Clasificación en "cuadrantes": Utilizando umbrales de $Z = 1$ y $Z = -1$ para ambas dimensiones, surgieron 9 cuadrantes que agrupan los 9 perfiles posibles. Estas posibilidades se resumen en 5 categorías, resaltadas en colores para la clasificación de las neuronas: "neuronas codificantes del lado social", "neuronas codificantes del lado objeto", "neuronas hiperdiscriminantes", "neuronas no específicas", y "neuronas subumbral".

Al clasificar las neuronas según su actividad en los extremos del corredor lineal, notamos que tanto el grupo CTRL como el KO poseían neuronas que respetaban perfiles de actividad compatibles con cada una de las categorías definidas en la Figura R7C. Este enfoque destaca la diversidad de respuestas que pueden manifestar las neuronas piramidales en la mPFC. Además, al examinar los perfiles de actividad normalizada, podemos inferir no solo el tipo de respuesta que puede tener la neurona, sino también la calidad de dicha respuesta. Por ejemplo, una neurona con actividad significativa en el bin 1 se clasifica como "codificante del lado social", pero la especificidad de esta respuesta depende de si la actividad significativa es exclusiva de ese segmento o si muestra múltiples picos de actividad supraumbral a lo largo del corredor lineal.

Para determinar si las neuronas del grupo KO presentan alteraciones en la capacidad de codificación, comparamos entre genotipos los perfiles de actividad de las neuronas clasificadas para las tareas LT y SO. En la tarea de menor carga cognitiva, la tarea LT, observamos que los perfiles de actividad no presentan diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguno de los perfiles (ver Figura R8). Para nuestra sorpresa, durante la prueba con una mayor carga contextual (prueba SO) los perfiles de actividad tampoco difieren entre los dos grupos experimentales (ver Figura R9). Esto indica que los animales mutantes tienen un grado de codificación a nivel de neurona individual conservado. En otras palabras, los animales mutantes cuentan con neuronas capaces de codificar de manera precisa tanto a la presencia del estímulo social como del objeto, y lo hacen manteniendo un nivel de calidad similar al observado en el grupo CTRL.

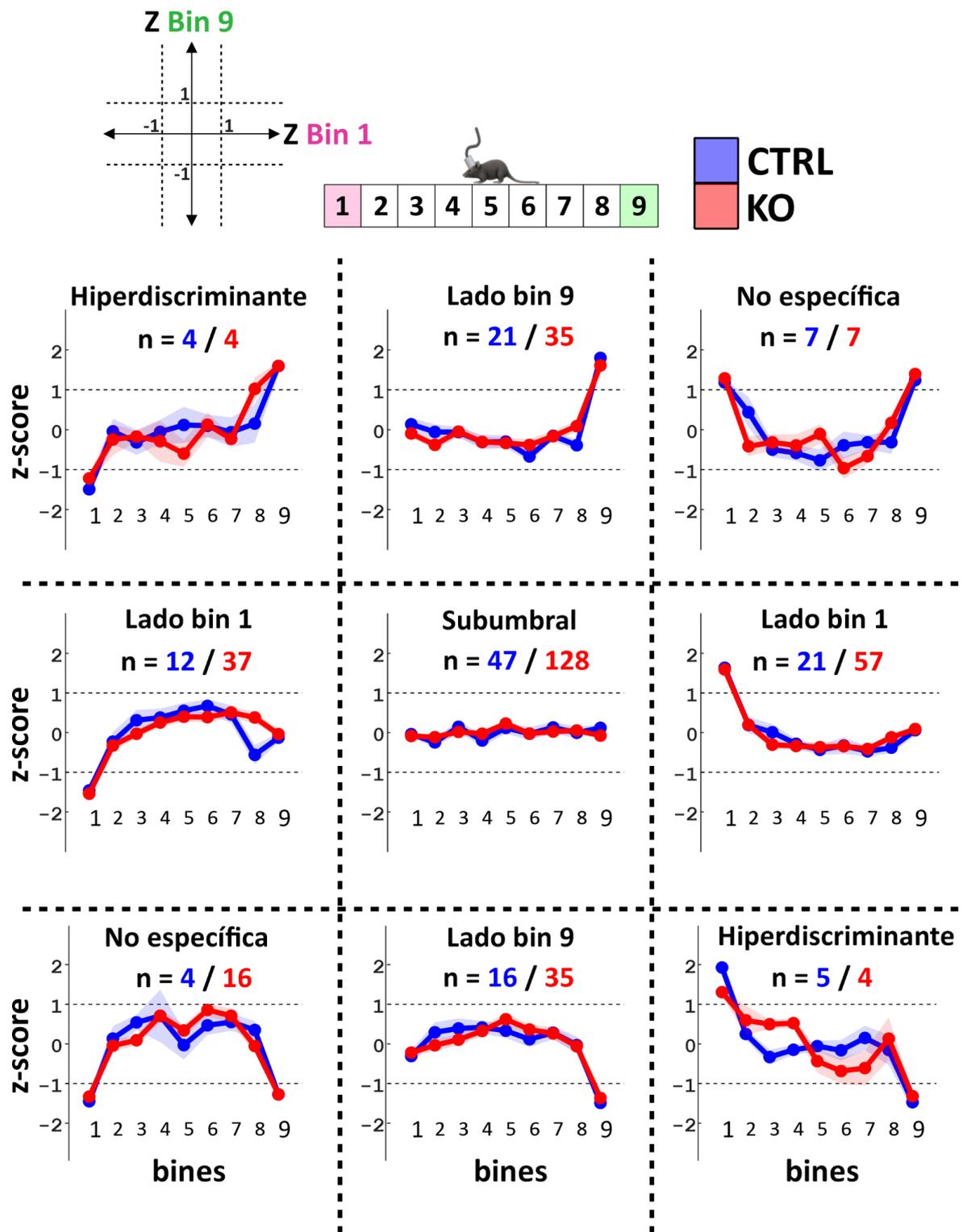


Figura R8. Perfiles de actividad de neuronas piramidales registradas en la tarea LT. Comparación entre genotipos para los 9 perfiles de actividad posibles basados en la respuesta normalizada en los extremos del corredor. *Data:* los puntos denotan la media y la sombra denota SEM. El intervalo de significancia ($z = 1$ y $z = -1$) se indica en línea punteada. N: número de neuronas clasificadas en cada categoría.

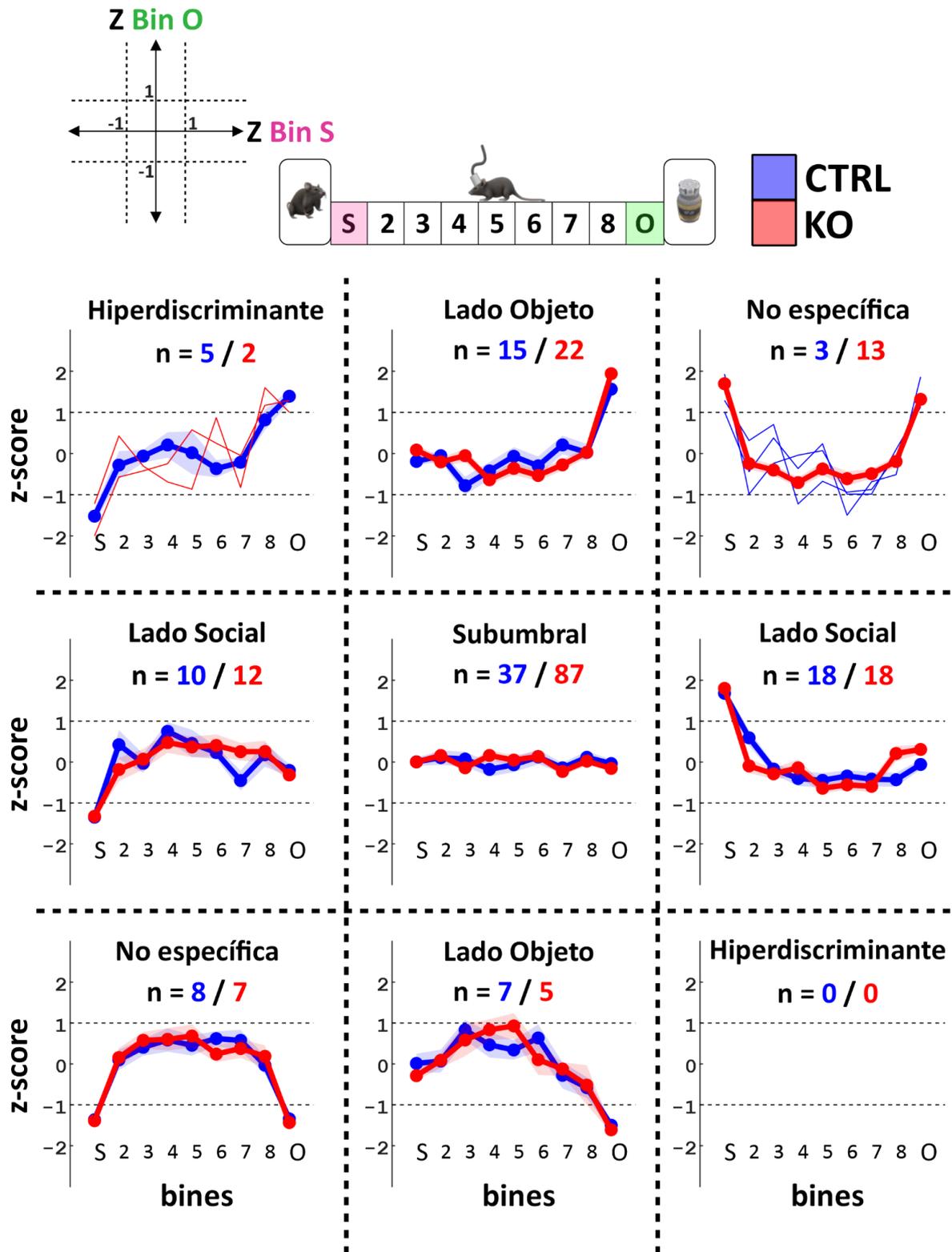


Figura R9. Perfiles de actividad de neuronas piramidales registradas en la tarea SO. Comparación entre genotipos para los 9 perfiles de actividad posibles. Data: los puntos denotan la media y la sombra denota SEM. El intervalo de significancia ($z = 1$ y $z = -1$) se indica en línea punteada. N: número de neuronas clasificadas en cada categoría. Para los grupos que poseen menos de 4 neuronas se graficaron los perfiles individuales de las neuronas como líneas.

Es importante destacar que consideramos todas las sesiones registradas, sin tener en cuenta la novedad de la tarea. Al analizar las sesiones de novedad y reexposición por separado, tampoco encontramos diferencias significativas en los perfiles de actividad entre genotipos (datos no mostrados a modo de simplificación). Basándonos en estos resultados, podemos concluir que la calidad de respuesta de las neuronas codificantes se mantiene en los animales mutantes, a pesar de las diferencias en la preferencia de exploración por el estímulo social. Si los mutantes tienen neuronas codificantes de la información social y esta codificación se conserva en comparación con los animales CTRL, surge la hipótesis de que las alteraciones en la codificación podrían ocurrir a nivel del reclutamiento poblacional de las neuronas involucradas en dicha codificación.

Para evaluar esta idea examinamos cuál es el porcentaje de neuronas a nivel de la mPFC que pueden discriminar entre los estímulos. Teniendo en cuenta las categorías utilizadas en la Figura R7C, las neuronas discriminantes de los estímulos incluyen a las neuronas codificantes del lado social, a las del lado objeto y a las “hiperdiscriminantes”. En contraste, el grupo de neuronas que no discrimina entre estímulos abarca a las neuronas “no específicas” y a las “subumbrales”.

Al analizar la prueba LT no se observaron diferencias entre los grupos CTRL y KO respecto de los porcentajes de neuronas discriminantes (ver Figura R10, barras blancas y negras). Este resultado se evidencia tanto en las sesiones de novedad como en las de reexposición (neuronas discriminantes en sesiones de novedad 56% CTRL vs 57% KO y en reexposición 59% CTRL vs 50% KO). Asimismo, al comparar las distribuciones de los grupos neuronales, desglosados por tipo de respuesta, no observamos diferencias significativas entre genotipos a lo largo de las sesiones (ver Figura R10, barras de colores). Estos resultados indican que en la tarea LT la proporción de neuronas codificantes a nivel poblacional en la mPFC se encuentra conservada en los animales mutantes.

Por el contrario, en la prueba SO los animales KO exhiben una disminución significativa en el porcentaje de neuronas discriminantes en comparación con los CTRL (ver Figura R11, barras blancas y negras), siendo este déficit independiente de la novedad (neuronas discriminantes en sesiones de novedad 54% CTRL vs 37% KO y en reexposición 53% CTRL vs 34% KO). Al comparar la distribución de los grupos neuronales por tipo de respuesta, observamos diferencias significativas únicamente asociadas al genotipo sin una influencia de la novedad de la sesión (ver Figura R11, barras de colores). Resulta interesante que, junto a una reducción de neuronas discriminantes, los animales KO presentan una sobrerrepresentación de neuronas no codificantes (subumbrales). En

las sesiones de novedad, el grupo KO muestra un 51% de neuronas subumbrales, mientras que en la reexposición este grupo aumenta a 55%. Estos resultados sugieren que frente a una prueba de mayor carga contextual, y por ende de mayor demanda cognitiva, los animales KO presentan una dinámica de ensamble empobrecida, con una mayor proporción de neuronas no discriminantes que el grupo control debido fundamentalmente al incremento en unidades no codificantes.

Por otro lado, al observar la evolución de las neuronas discriminantes en el grupo CTRL entre las sesiones de novedad y reexposición (en Figura R11), notamos una tendencia no significativa hacia un aumento de las neuronas codificantes del lado social (del 24% al 30%), junto con una disminución de las neuronas codificantes del lado objeto (del 28% al 16%), incluyendo a las neuronas hiperdiscriminantes (del 2% al 7%). Estos resultados sugieren que podría existir una tendencia hacia una sobrerrepresentación de los estímulos sociales con la reexposición, aunque esta tendencia no llega a ser estadísticamente significativa. No obstante, su relevancia podría estar relacionada con los resultados de comportamiento, donde observamos la aparición de una preferencia social junto con la reexposición a la tarea SO.

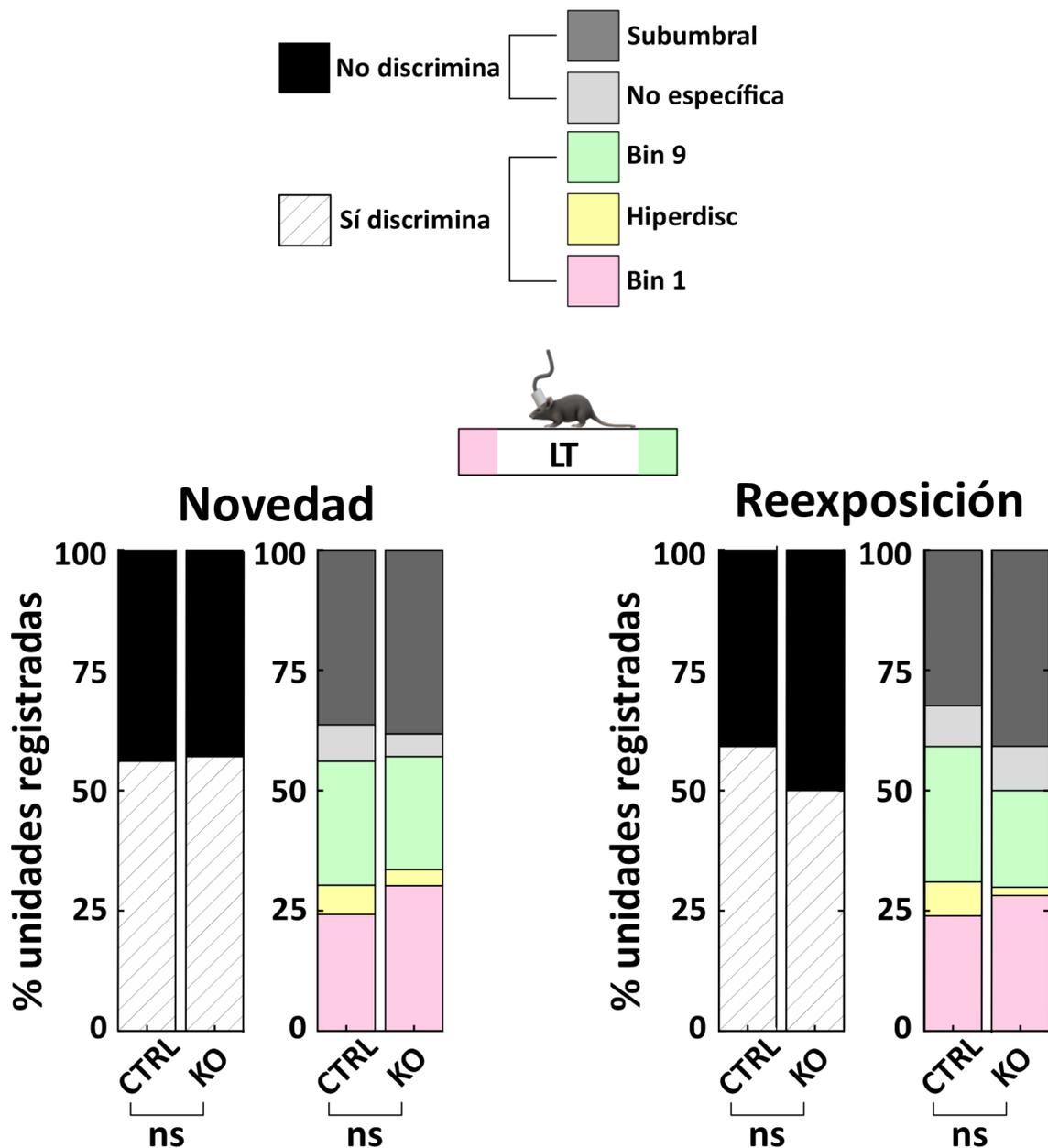


Figura R10. En la prueba LT, la representación de neuronas discriminantes a nivel poblacional en mPFC permanece conservada en los animales KO. En la parte superior se detallan las categorías utilizadas para clasificar a las neuronas en base a los perfiles de actividad normalizada sobre el corredor lineal (explicado en Figura R7). Los gráficos de barras apiladas corresponden a las proporciones de neuronas clasificadas respecto del total de neuronas piramidales registradas. Se compara entre genotipos para las sesiones de novedad y de reexposición. No observamos diferencias significativas respecto de las distribuciones de los grupos neuronales. Para las comparaciones utilizamos un análisis *Log-Linear* para tablas de contingencia de 3 vías. **Clasificación de neuronas discriminantes:** $G^2(\text{categoría} \times \text{genotipo} \times \text{sesión}) = 2.6$, $df = 4$, $p = 0.62$; $G^2(\text{categoría} \times \text{genotipo}) = 0.7$, $df = 1$, $p = 0.39$; $G^2(\text{genotipo} \times \text{sesión}) = 0.7$, $df = 1$, $p = 0.39$; $G^2(\text{categoría} \times \text{sesión}) = 0.14$, $df = 1$, $p = 0.71$. **Clasificación por tipo de respuesta:** $G^2(\text{categoría} \times \text{genotipo} \times \text{sesión}) = 11.2$, $df = 13$, $p = 0.60$; $G^2(\text{categoría} \times \text{genotipo}) = 6.9$, $df = 4$, $p = 0.15$; $G^2(\text{genotipo} \times \text{sesión}) = 0.14$, $df = 1$, $p = 0.71$; $G^2(\text{categoría} \times \text{sesión}) = 2.32$, $df = 4$, $p = 0.68$. *Data:* Los n de neuronas se puede observar en la Tabla R1 y los datos provienen de animales 6 CTRL y 5 KO.

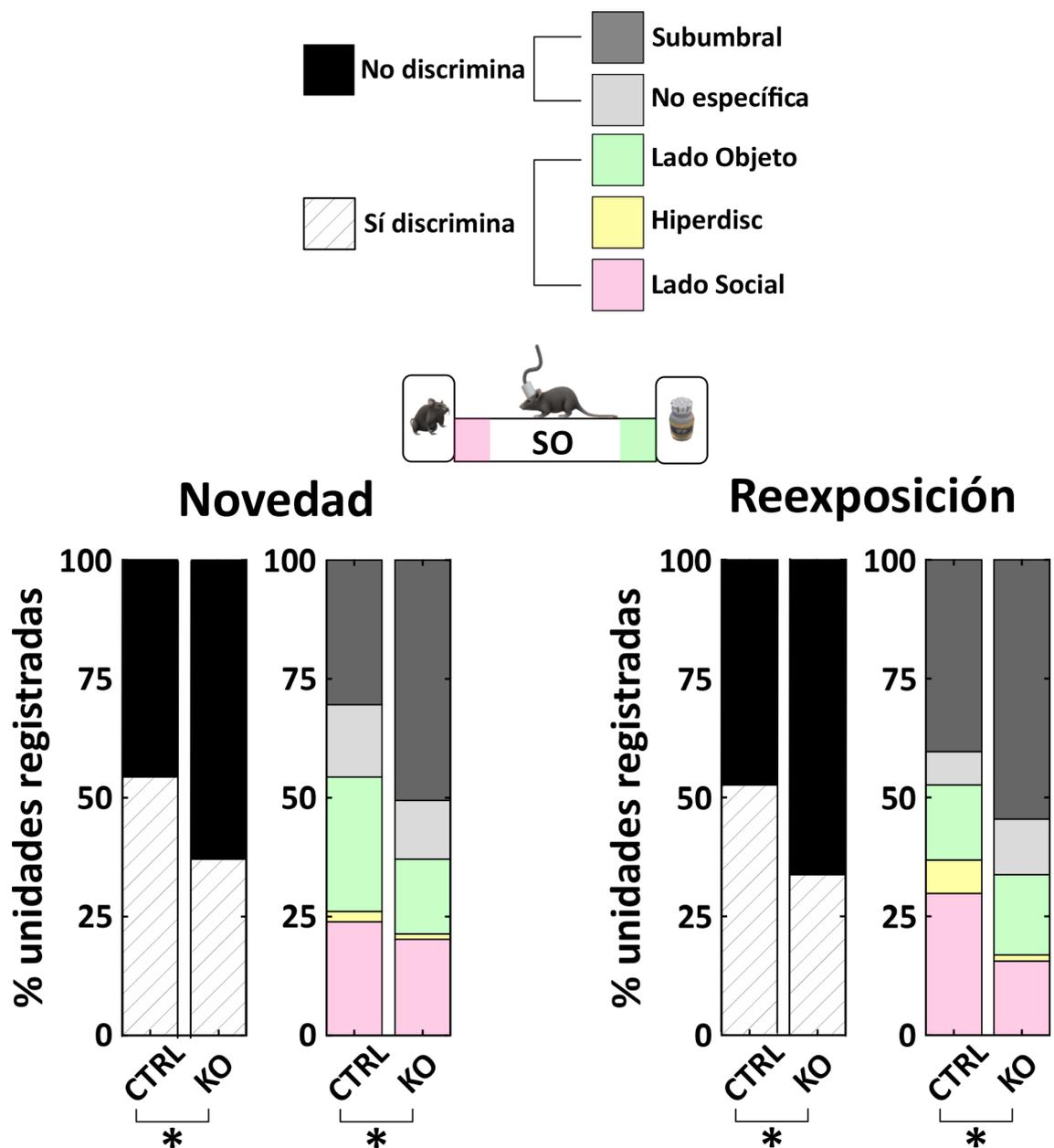


Figura R11. En la tarea con mayor carga contextual, la prueba SO, los ratones mutantes consiguen reclutar una menor proporción de neuronas discriminantes tanto en sesiones de novedad como de reexposición. En la parte superior se detallan las categorías utilizadas para clasificar a las neuronas en base a los perfiles de actividad normalizada sobre el corredor lineal (explicado en Figura R7). Los gráficos de barras apiladas corresponden a las proporciones de neuronas clasificadas respecto del total de neuronas piramidales registradas. Se compara entre genotipos para las sesiones de novedad y de reexposición. En el grupo KO se observa una reducción en el porcentaje de neuronas discriminantes que se mantiene entre sesiones. Para las comparaciones utilizamos un análisis *Log-Linear* para tablas de contingencia de 3 vías. **Clasificación de neuronas discriminantes:** $G^2(\text{categoría} \times \text{genotipo}) = 8.3$, $df = 1$, $p = 0.004$. * < 0.05 . **Clasificación por tipo de respuesta:** $G^2(\text{categoría} \times \text{genotipo}) = 10.4$, $df = 4$, $p = 0.03$. * < 0.05 . *Data:* Los n de neuronas se puede observar en la Tabla R1 y los datos provienen de animales 5 CTRL y 5 KO.

LT				SO					
Novedad		Reexpo		Novedad		Reexpo			
CTRL	KO	CTRL	KO	CTRL	KO	CTRL	KO		
24	57	23	71	14	45	23	42	Subumbral	
5	7	6	16	7	11	4	9	No específica	
17	35	20	35	13	14	9	13	Lado Objeto / Bin 9	
4	5	5	3	1	1	4	1	Hiperdisc	
16	45	17	49	11	18	17	12	Lado Social / Bin 1	
TOT	66	149	71	174	TOT	46	89	57	77

Tabla R1. Número de neuronas clasificadas para la prueba LT y la prueba SO. Los valores corresponden al número de neuronas que se grafican de forma porcentual en las figuras R10 y R11.

A modo de resumen, a lo largo de este capítulo de la presente tesis presentamos los resultados de cómo codifican información las neuronas piramidales de la mPFC durante la exploración espacial de dos contextos similares pero con diferente carga cognitiva/emocional y cómo esta codificación se ve afectada en nuestro modelo animal de esquizofrenia. Para aumentar la carga contextual de la tarea agregamos un estímulo social y un objeto en los extremos del corredor lineal. Pusimos a prueba la hipótesis de que las neuronas corticales responden de manera diferencial a un contexto enriquecido con estímulos y que esta respuesta está alterada en los animales KO. Detectamos que en la mPFC existen neuronas que responden a diferentes aspectos de las tareas, incluyendo neuronas capaces de codificar el lado social, el lado objeto o ambos a la vez. Los animales CTRL mantienen a nivel poblacional una fracción estable de las neuronas discriminantes ante cambios en la novedad o la carga cognitiva. Por otro lado, los animales KO muestran un comportamiento social aberrante, con sesiones de preferencia aleatoria por el estímulo social. A nivel de la respuesta neuronal, presentan neuronas discriminantes con una calidad de codificación conservada. Sin embargo, presentan un déficit en el reclutamiento de neuronas discriminantes exclusivamente durante la exploración de un ambiente con mayor complejidad, lo que sugiere dificultades en la asignación de recursos cognitivos en la mPFC frente al aumento de la demanda cognitiva. En su conjunto, estos resultados subrayan la importancia de la mPFC en los procesos cognitivos vinculados a la codificación contextual incluyendo el procesamiento de información social y respaldando la relevancia de nuestro modelo animal como objeto de estudio de los mecanismos subyacentes a la esquizofrenia.

La mPFC de los ratones mutantes presenta un déficit en la codificación a nivel poblacional exclusivamente cuando enfrenta una decisión compleja en la exploración espontánea de un laberinto en Y.

En vistas de los resultados obtenidos en el primer objetivo de esta tesis, nos preguntamos si el déficit en la codificación a nivel población observado en contextos de alta demanda cognitiva era exclusivo de la interacción social o si se trataba de un déficit más general. Para ello nos enfocamos en el estudio de los ratones mutantes en la prueba de exploración espontánea en un laberinto en forma de Y. Como mencionamos anteriormente los ratones poseen una tendencia natural a maximizar la exploración del ambiente en su búsqueda por refugio y recursos naturales. La prueba de alternancia espontánea en un laberinto en forma de Y desafía a los animales a decidir en cada momento qué brazo visitar en pos de maximizar la superficie explorada y mantener la información contextual actualizada. Se sabe que la mPFC participa en los procesos de memoria de trabajo espacial y en la toma de decisiones (Goldman-Rakic, 1995), y que dichos procesos se han visto alterados en esquizofrenia (Galletly et al., 2007; Piskulic et al., 2007). Nuestro grupo de trabajo ya ha reportado que el modelo animal que estamos utilizando presenta un déficit en la memoria de trabajo espacial durante el desarrollo de esta prueba (Belforte et al., 2010). En este objetivo, nos planteamos si la capacidad de codificación de la mPFC durante esta tarea de exploración libre, sin estímulos sociales o novedosos, podría verse afectada en los mutantes durante la toma de decisiones que se requiere para explorar el laberinto maximizando la información obtenida.

Para esto, los mismos animales que utilizamos en las pruebas sobre el corredor lineal fueron registrados en la prueba de laberinto en Y. Este laberinto posee 3 brazos idénticos de 47 cm de largo cada uno, separados entre sí por 120°. Las características del laberinto son similares a las utilizadas en el corredor lineal. A modo de simplificación, a partir de este momento nos referiremos a la prueba de laberinto en Y como "YM".

Durante una sesión típica de YM, los animales fueron primero colocados en una arena neutral durante 5 minutos donde fueron habituados al ambiente, para luego ser transferidos al laberinto donde realizaron tareas de exploración libre y espontánea durante 16 minutos. Este protocolo se repitió en promedio 4 veces por animal en días no consecutivos. Como se puede observar en la Figura R12 A y B, un animal deambula por los brazos, generalmente explorando cada brazo de un

extremo al otro y realizando transiciones de uno a otro en la región del centro. Al regresar a la región central luego de visitar alguno de los brazos, el animal se enfrenta con una decisión debiendo optar por regresar a un brazo previamente visitado (por ejemplo ABA o CBC) o maximizar la exploración realizando una alternancia (por ejemplo ABC o CBA). Se considera que el animal realiza una alternancia (también llamada triplete) cuando visita tres brazos diferentes de manera consecutiva, sin repetir ninguno de ellos, sin que importe el orden de visita. Los ratones CTRL poseen una alternancia superior al azar (por encima del 50% de alternancia) reflejando la tendencia innata de los roedores a mantener actualizada la información contextual disponible. En contraste, los animales KO realizan menos alternancias comparado con el grupo CTRL (ver Figura R12C, alternancia CTRL $63,5 \pm 2,2\%$ vs KO $55,7 \pm 2,5\%$). Esta disminución en el porcentaje de alternancia que observamos no está influenciada por un comportamiento exploratorio disminuido en los KO, ya que no encontramos diferencias significativas en el número de visitas totales a los brazos (ver Figura R12D). Estos resultados se condicen con los resultados previos reportados por nuestro grupo (Belforte et al., 2010).

A continuación examinaremos cómo las neuronas piramidales de la mPFC responden a demandas cognitivas crecientes durante la tarea YM, particularmente en los momentos previos a la toma de decisiones, y qué alteraciones en la codificación de las neuronas se observan en nuestro modelo animal de esquizofrenia.

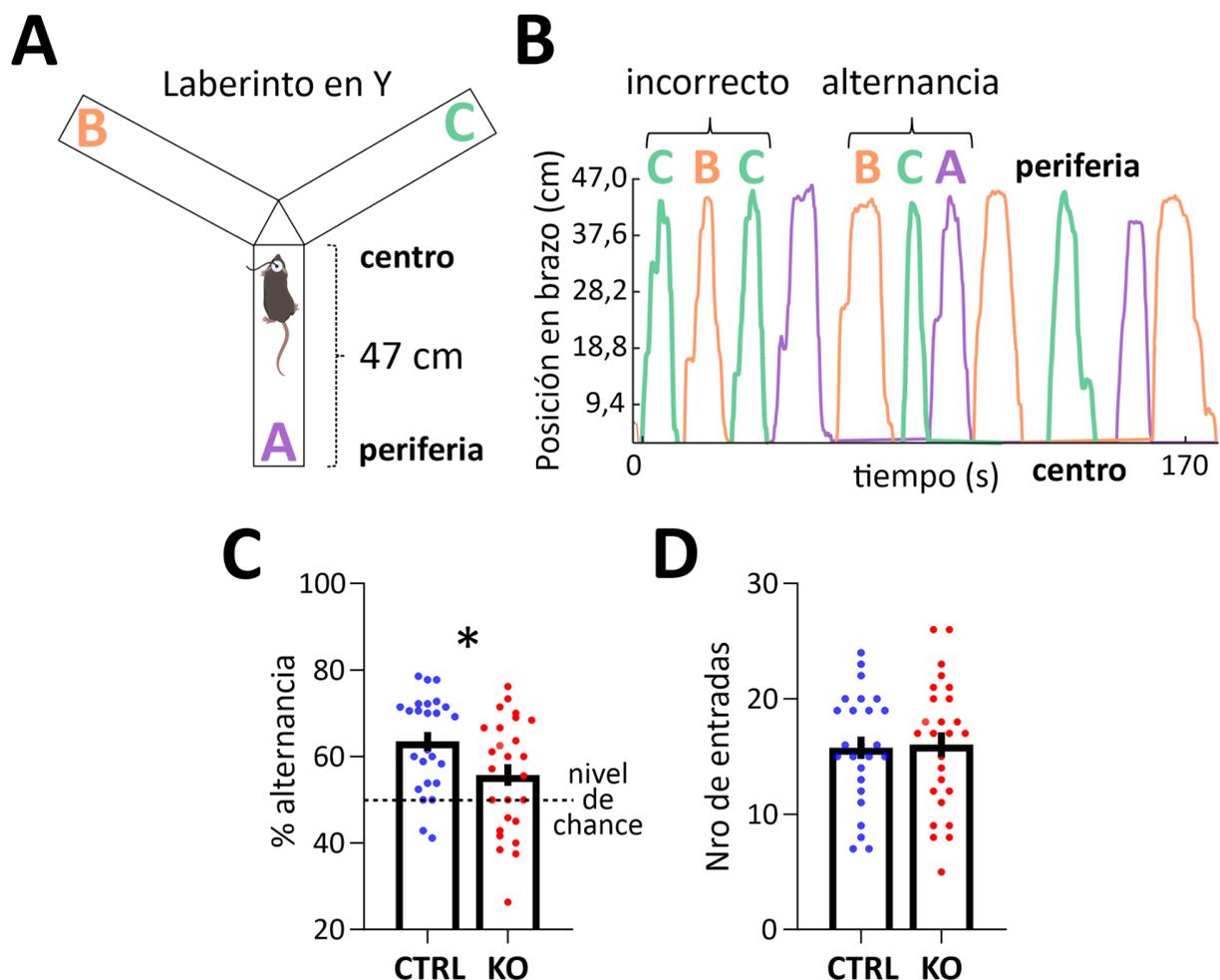


Figura R12. Los animales mutantes muestran una reducción en la alternancia de brazos en el laberinto en forma de Y, compatible con alteraciones en la memoria de trabajo espacial. (A) Esquema del laberinto en forma de Y (YM) utilizado. Cada brazo del laberinto posee un extremo en la periferia y otro que dirige hacia el centro del laberinto. **(B)** Los animales exploran libremente el laberinto y tienden a visitar los brazos de forma secuencial realizando alternancias (visitar 3 brazos distintos) maximizando la exploración del ambiente. En el gráfico se observa un ejemplo de la exploración de un animal sobre el YM y cómo patrulla por los distintos brazos del laberinto de manera secuencial realizando alternancias. **(C)** Porcentaje de alternancia, calculado como las alternancias reales respecto de las posibles $[(\# \text{ alternancias}) / (\# \text{ entradas} - 2) \times 100]$. El grupo KO exhibe una reducción en el porcentaje de alternancia media respecto del grupo CTRL (*Unpaired t-test*, $t = 2.3$, $df = 50$, $*p = 0.02$). **(D)** El número de entradas o visitas a los brazos no difiere en promedio entre genotipos (*Unpaired t-test*, $t = 0.2$, $df = 50$, $ns p = 0.85$). N de sesiones: 25 de 7 animales CTRL y 27 de 6 animales KO.

Los animales KO presentan una subrepresentación de neuronas que responden significativamente al punto de toma de decisión en dirección al centro del YM.

Se ha propuesto que las neuronas piramidales de la mPFC desempeñan un papel fundamental en los procesos de memoria de trabajo espacial (Jones & Wilson, 2005; Shin et al., 2019; Spellman et al., 2015). Estas neuronas no solo participan en la retención de la memoria generada (Liu et al., 2014), sino que también contribuyen a la codificación y la evocación de la información espacial (Vogel et al., 2022). Además, se ha visto que la actividad de estas neuronas puede variar frente a cambios en el contexto (Hyman et al., 2012), y más aún, pueden responder de manera diferencial a la posición del animal y la dirección del movimiento (Vogel et al., 2022). Es así que las neuronas corticales no solo contribuyen a la ubicación espacial del individuo sino que además codifican la saliencia motivacional de los lugares (Hok et al., 2005) respondiendo a metas y dirigiendo la exploración.

Con estas ideas en mente, nos propusimos estudiar cómo responden las neuronas piramidales de la mPFC durante la tarea YM, dando particular importancia a la asimetría en la carga cognitiva que confiere el centro del laberinto en relación a los extremos finales de los brazos (la periferia de los mismos). Cada brazo del YM analizado de manera independiente del resto presenta características similares a un corredor lineal. Al dirigirse hacia el centro de YM desde la periferia de uno de los corredores, el animal debe optar por permanecer en el lugar, retornar por donde vino o elegir uno de los 2 posibles corredores que tiene delante (uno visitado más recientemente que otro). Por el contrario, al llegar al final de un corredor (periferia) el ratón debe decidir entre dos posibles acciones, permanecer o retornar. Por lo tanto, la complejidad en la toma de decisión que enfrenta el animal en el centro del laberinto es mayor que en la periferia.

Para evaluar la actividad neuronal en estos dos puntos críticos del YM utilizamos un análisis similar al empleado para el corredor lineal en la sección anterior (como explicamos en la Figura R6). Cada brazo o corredor del YM fue fragmentado en 5 segmentos de 9,4 cm de largo cada uno. Para cada segmento "BIN X" calculamos la frecuencia de disparo media normalizada [$Z_{\text{BIN X}} = (\text{FD}_{\text{BIN X}} - \text{FD}_{\text{media}_{\text{BINES}}}) / \text{DS}_{\text{BINES}}$], donde FD es la frecuencia de disparo y DS es el desvío estándar. Los BINES corresponden a los 5 segmentos en los que fue dividido cada brazo del YM. De esta forma podemos conocer los perfiles de actividad de las neuronas (en escala de Z-score) para cada uno de

los brazos del YM, diferenciando los segmentos “extremos” correspondientes al bin centro y al bin periferia (Figura R13A). De esta forma, asumimos que las decisiones tomadas en estos segmentos presentan diferente carga cognitiva.

En un análisis preliminar, analizamos los 3 brazos de manera conjunta, superponiéndolos virtualmente para generar un único corredor lineal de cinco segmentos cuyos extremos presentan distinta carga cognitiva. Mediante esta estrategia, identificamos neuronas que pueden responder en el bin centro o en el bin periferia a través de cambios en su frecuencia de disparo. El porcentaje de neuronas con capacidad discriminativa fue de 64.3% en el grupo CTRL (45 de 70 neuronas totales) y del 65.2% en el grupo KO (101 de 155 neuronas totales). Estos valores se asemejan a los observados en las pruebas LT y SO en los animales CTRL, donde alrededor del 55% de las neuronas muestran respuestas discriminantes respecto de los extremos. Sin embargo, en este análisis preliminar no encontramos diferencias significativas en la distribución entre los dos genotipos (datos no mostrados). Dicho análisis preliminar consideraba que la actividad neuronal era uniforme en los tres brazos del laberinto, y que una misma neurona se podía activar de forma generalizada en un dado segmento en los tres brazos de manera similar. Sin embargo, un análisis rápido de la actividad neuronal mostró que este no era el caso de la mayor parte de las neuronas que registramos en la mPFC.

Considerando estas limitaciones, buscamos profundizar nuestro análisis y nos enfocamos en las neuronas capaces de codificar la toma de decisiones en puntos críticos del YM en cada brazo de manera individual. Primeramente analizamos la respuesta de las neuronas frente a la decisión, al llegar al bin centro, en donde los animales optan por permanecer, retornar o visitar uno de los dos brazos disponibles. De manera interesante, observamos que las neuronas piramidales de la mPFC no muestran una respuesta en todos los brazos por igual. En su gran mayoría, las neuronas que registramos presentan un perfil de actividad poco “generalista” respecto de los brazos, presentando una activación preferencial en alguno de ellos. Un subgrupo interesante de neuronas constituyen aquellas que se activan al llegar al bin centro de un brazo determinado (previo a la toma de decisión mencionada anteriormente) y lo hacen sólo cuando el animal ingresa al mismo desde la periferia (pero no cuando lo hace viniendo desde otro brazo), como se ejemplifica en la Figura R13B. Esta subpoblación integraría en su respuesta la información espacial actual y la previa, junto a la toma de decisiones. Para su análisis decidimos clasificar jerárquicamente a los 3

brazos según el grado de activación de cada neurona en el bin centro durante la exploración de los mismos, de modo de establecer la “preferencia” de la neurona por cada brazo.

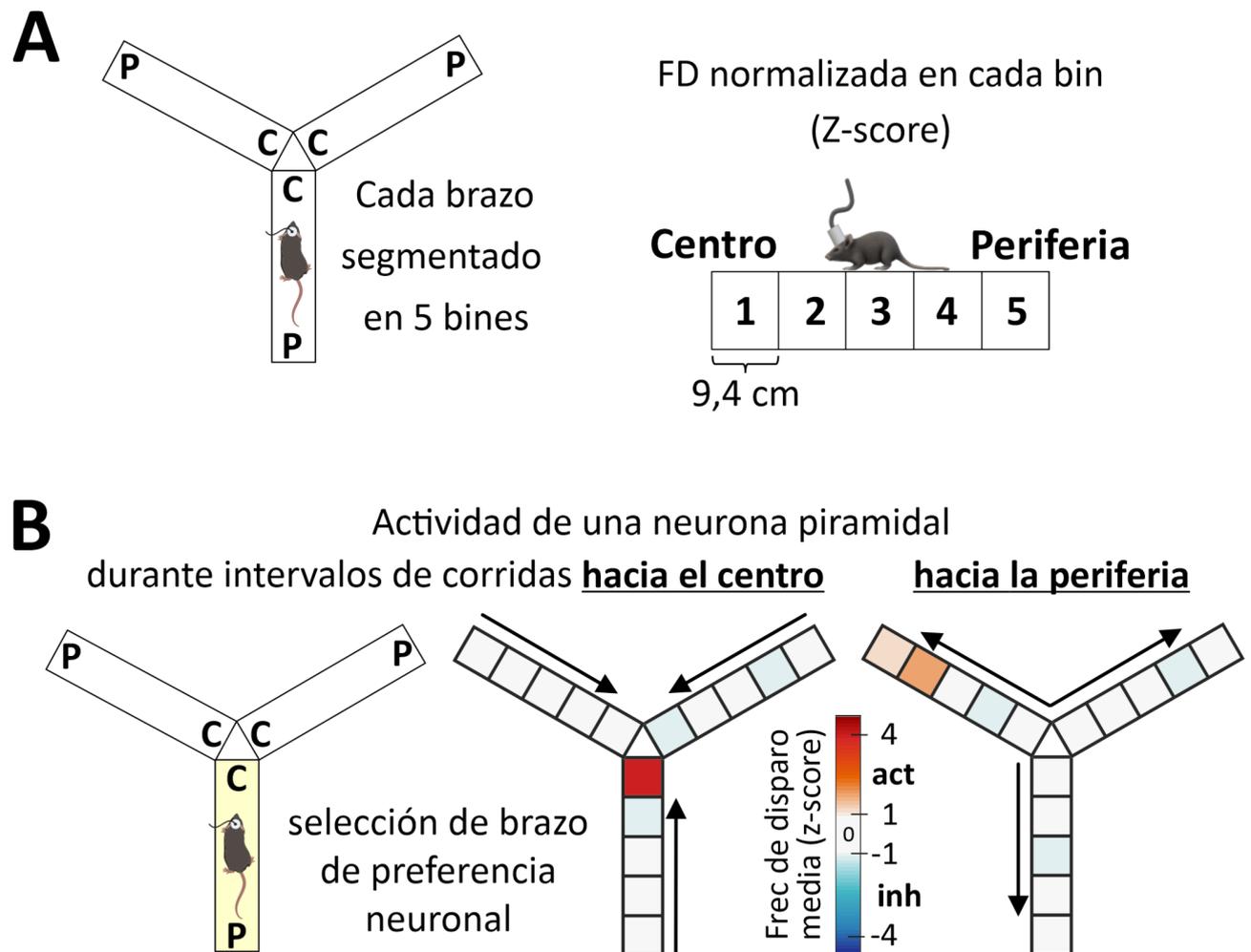


Figura R13. Las neuronas piramidales de la mPFC responden de manera diferencial en cada uno de los brazos del laberinto en forma de Y. (A) Para estudiar la actividad de las neuronas cada brazo fue segmentado en 5 bins (9,4 cm cada uno), y calculamos la frecuencia de disparo normalizada para cada bin (estrategia similar a la utilizada en la prueba SO y explicada en la Figura R6). **(B)** Ejemplo de la actividad de una neurona en la tarea de YM expresada en escala de colores (en z-score, cálidos denotan activación y fríos denotan inhibición de la actividad). Durante los periodos de corridas hacia el centro se observa que la neurona se activa en un brazo específico, mostrando una codificación preferencial en el brazo al que denominamos “preferido” (resaltado en amarillo, brazo inferior). De forma interesante, la actividad de la misma neurona difiere cuando el animal corre hacia la periferia del laberinto sugiriendo que la neurona no responde únicamente a la ubicación espacial.

Con el objetivo de cuantificar la respuesta de esta subpoblación de neuronas, calculamos un índice de respuesta (explicado en más detalle en MyM «Normalización de la actividad neuronal y criterios de selección») incluyendo en este grupo a las neuronas que presentan índices de respuesta superiores a 3 (ver Figura R14A). De esta forma, identificamos a 17 neuronas en el grupo CTRL y 18 en el grupo KO que cumplen con el criterio de selección. A este subgrupo de neuronas las denominaremos “neuronas centro”.

Primeramente, estudiamos los perfiles de actividad (calidad de respuesta) de las neuronas centro y las comparamos entre genotipos. Para esto analizamos los perfiles de Z-score de las neuronas a lo largo de los 3 brazos del laberinto (ver Figura R14B), ordenados de acuerdo a la preferencia que presentan respecto de los brazos. La preferencia se estableció comparando la actividad normalizada en el bin centro de cada brazo y ordenándolos de manera decreciente. De forma interesante, encontramos que para ambos grupos experimentales, las neuronas centro responden únicamente al brazo preferido y confirmamos que lo hacen de forma sentido-específica. Cuando los animales corren hacia el centro se observa un aumento significativo de la FD normalizada únicamente en el brazo preferido (Figura R14B). Esta respuesta no se observa en el mismo lugar (en el bin centro) cuando los animales corren en el sentido opuesto, hacia la periferia (Figura R14C). La especificidad en esta respuesta resulta compatible con una integración de la información contextual asociada a la toma de decisión y no estaría exclusivamente relacionada con una mera respuesta a la ubicación espacial del animal en el laberinto.

Al comparar los perfiles de respuesta de las neuronas centro, no observamos diferencias significativas entre los grupos experimentales (ver Figura R14B). Este resultado muestra que la capacidad de codificación a nivel de neurona individual permanece conservada en los animales mutantes, de forma similar a lo que reportamos en el capítulo anterior durante la prueba de discriminación social-objeto.

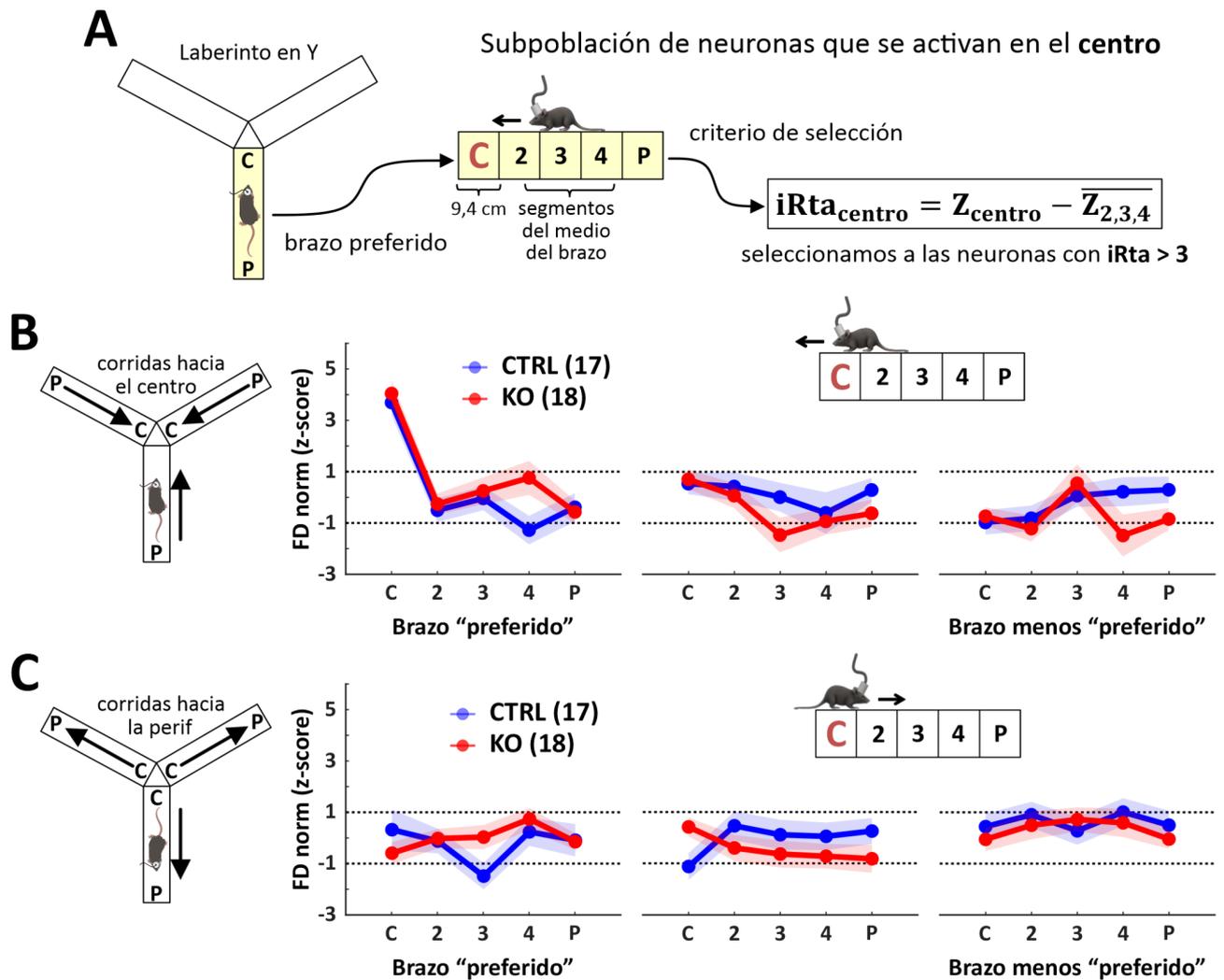


Figura R14. Subpoblación de neuronas "centro" con una calidad de respuesta conservada en los mutantes. (A) Método de selección de las neuronas según cómo cambia la actividad en el bin centro del brazo "preferido" respecto de los segmentos del medio del brazo (2, 3 y 4). En el esquema se resalta en amarillo al brazo preferido. Calculamos un índice de respuesta ($iRta$) que nos permite identificar cuales son las neuronas que cambian su actividad al llegar al centro del YM. Finalmente, seleccionamos a las neuronas que presentan índices de Rta por encima de 3. **(B)** Cuando los animales se dirigen hacia el centro, las neuronas aumentan significativamente su actividad en el bin centro del brazo preferido. El grupo KO muestra perfiles de respuesta conservados respecto del grupo CTRL (Brazo preferido: two-way RM ANOVA, interacción bins x genotipo $F(4, 132) = 1.7, p = 0.16$, factor principal genotipo $F(1, 33) = 1.7, p = 0.12$). **(C)** Manteniendo el mismo orden de las neuronas pero restringiendo el análisis a los eventos de corridas hacia la periferia, no se observa el mismo perfil de activación en el bin centro. Data: los puntos denotan la media y la sombra denota SEM. Las líneas punteadas marcan los umbrales de referencia $Z = 1$ y $Z = -1$. N de neuronas: 17 de 6 animales CTRL y 18 de 6 animales KO.

Posteriormente, estudiamos cómo es la representación de las neuronas centro a nivel poblacional en la mPFC. El grupo KO exhibe una subrepresentación significativa de estas neuronas en comparación con el grupo CTRL (Figura R15).

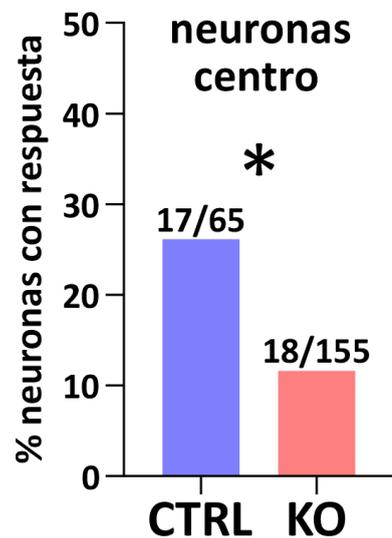


Figura R15. Los animales KO exhiben una reducción en la proporción de neuronas centro. Las neuronas que responden en el centro se encuentran subrepresentadas en el grupo KO (Fisher's exact test, CTRL 26.15% vs KO 11.61%, *p = 0.032). N de neuronas: se especifica en cada barra provenientes de 6 animales CTRL y 6 animales KO.

Estos resultados son ampliamente interesantes ya que presentan un correlato con los resultados obtenidos para la prueba de discriminación social-objeto sobre el corredor lineal. Estos resultados podrían sugerir que nuestro modelo animal presenta alteraciones en el reclutamiento de neuronas codificantes a nivel poblacional frente a la carga cognitiva asociada al contexto, particularmente frente a una alta demanda cognitiva.

Para poner a prueba esta idea nos propusimos evaluar el impacto de la carga cognitiva en la codificación de esta tarea. Para esto analizamos otra subpoblación de neuronas (que llamaremos neuronas periferia) que también se activan diferencialmente durante una toma de decisión pero en una etapa de la tarea con menor carga cognitiva. Estas neuronas se activan significativamente cuando los animales llegan al segmento periferia del brazo preferido (Figura R16A). En este subgrupo encontramos 7 neuronas en CTRL y 18 neuronas en KO que cumplen con el criterio de selección. De forma interesante, este subgrupo de neuronas que responden en la periferia no presentan el mismo patrón de especificidad respecto de la dirección de movimiento que vimos con las neuronas centro. Estas neuronas presentan una respuesta más generalistas respecto de los brazos, mostrando valores de FD normalizada por encima de $Z > 1$ en el bin periferia en más de un

brazo (ver Figura R16B). Observamos además que este subgrupo de neuronas muestra una activación en el bin centro del brazo preferido cuando los animales se desplazan hacia la periferia, lo cual podría ser indicativo de procesos de memoria de trabajo espacial involucrados en la integración del camino. De manera interesante, esta respuesta no se observa en los animales mutantes (ver Figura R16B, en brazo preferido, Z en bin C: CTRL 2.7 ± 0.8 vs KO -0.6 ± 0.4), consistente con la idea de que nuestro modelo presenta alteraciones en los procesos vinculados a la memoria de trabajo espacial. Al observar la actividad de estas neuronas, cuando los animales se dirigen en sentido del centro, encontramos valores de FD normalizada por encima del umbral $Z = 1$ en el bin periferia del primer y el segundo brazo (siguiendo con la escala de preferencia, Figura R16C). Es importante notar que en el grupo CTRL la actividad muestra una gran variabilidad, ya que el subgrupo de neuronas que cumplieron criterio de selección es pequeño (solo 7 de 65 neuronas registradas). A pesar de algunas de estas limitaciones, los resultados muestran que el subgrupo de neuronas periferia presenta una respuesta generalista respecto de los brazos del laberinto y parece ser inespecífica respecto del sentido de movimiento de los animales. Nuestro modelo animal dispone de esta subpoblación de neuronas, las cuales asumimos que responden a un punto de toma de decisión que presenta una carga cognitiva menor (en comparación con las neuronas centro) y, en términos generales, la calidad de respuestas de estas neuronas permanece conservada respecto del grupo CTRL.

Ahora bien, cuando analizamos a nivel poblacional como se encuentran representadas las neuronas periferia en la mPFC, no observamos diferencias significativas entre genotipos respecto de los porcentajes de neuronas (ver Figura R17, CTRL 10.78% vs. KO 11.61%). Estos resultados respaldan la idea de que los mutantes presentan alteraciones en el reclutamiento de neuronas codificantes en respuesta a una mayor carga cognitiva asociada al contexto (durante la toma de decisiones en el centro del YM) y no en otros instantes de la tarea donde la carga cognitiva es menor (como ocurre en la periferia).

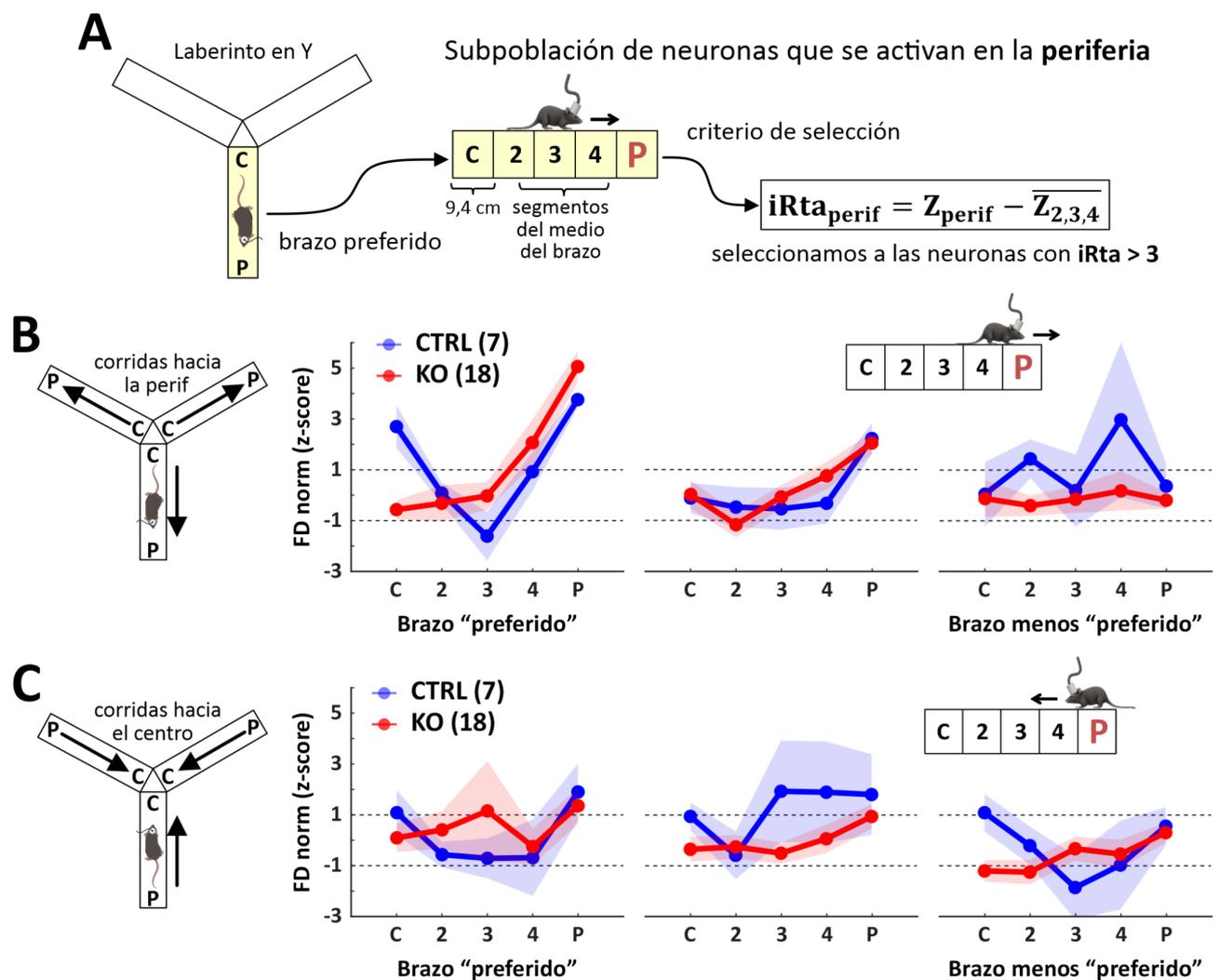


Figura R16. Selección de neuronas que se activan durante una toma de decisión con menor carga cognitiva: neuronas "periferia". (A) Seleccionamos a las neuronas por su actividad en la periferia del brazo preferencial (respecto de los segmentos medios). Nos quedamos con las neuronas que cumplen $iRta > 3$. (B) El grupo CTRL exhibe una activación en el segmento centro del brazo preferido cuando los animales se mueven hacia la periferia, compatible con procesos de memoria de trabajo espacial. Esta activación no se observa en el grupo mutante (Figura R13B, brazo "preferido", two-way RM ANOVA; interacción bins x genotipo $F(2.9, 65.5) = 3.65, p = 0.008$; post-hoc Bonferroni bin C: CTRL 2.7 ± 0.8 vs KO $-0.6 \pm 0.4, p = 0.035$). En términos generales, las neuronas del grupo KO presentan perfiles de codificación conservados respecto de CTRL. (C) Las neuronas de la periferia se activan incluso cuando los animales se dirigen hacia el centro del YM. Data: los puntos denotan la media por bin y la sombra denota SEM. Las líneas punteadas marcan los umbrales de referencia $Z = 1$ y $Z = -1$. N de neuronas: 7 de 6 animales CTRL y 18 de 6 animales KO.

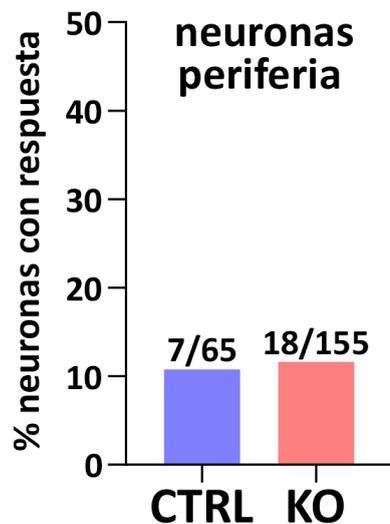


Figura R17. No observamos diferencias significativas entre genotipos respecto del reclutamiento de neuronas periferia a nivel poblacional. Fisher's exact test, CTRL 10.78% vs KO 11.61%, $p > 0.999$). N de neuronas: especificado en cada barra provenientes de 6 animales CTRL y 6 animales KO.

Recapitulando los resultados obtenidos hasta ahora, identificamos dos poblaciones de neuronas: un subgrupo de neuronas piramidales en la mPFC que se activan de manera específica en los segmentos centro del brazo preferido y lo hacen solo cuando los animales corren hacia el centro del laberinto, mientras que otro subgrupo de neuronas responde a la periferia, mostrando una respuesta más generalista respecto de los brazos y activándose en ambos sentidos de movimiento. Creemos que las diferencias entre ambas poblaciones tienen que ver con el grado de respuesta frente a la carga cognitiva diferencial que presentan ambos puntos del YM (centro y periferia), respecto de la toma de decisiones. Este hallazgo es coherente con la idea de que nuestro modelo presenta alteraciones en la asignación de recursos cognitivos en la mPFC en respuesta a la demanda cognitiva que presenta la tarea.

Por último, considerando al subgrupo de las neuronas con actividad en el centro, nos planteamos investigar cómo cambia la actividad de estas neuronas durante la elección del brazo a visitar. En particular, cómo cambia la actividad previo a realizar una secuencia de alternancia o una repetición de brazos (no alternar). Recordemos que una secuencia de brazos en la prueba de YM es compatible con procesos de memoria de trabajo espacial. Para esto, comparamos los perfiles de respuesta de las neuronas en el brazo preferido durante las corridas hacia el centro previas a la elección de "alternar" o "no alternar" (Figura R18A). En ambos casos, no observamos diferencias significativas en los perfiles de respuesta de las neuronas entre genotipos (ver Figura R18B). De

forma interesante, en ambos grupos detectamos neuronas que cambian su actividad en el bin centro durante el tipo de elección. Hay neuronas que aumentan su FD normalizada al momento de alternar y otras que lo hacen al no alternar (ver Figura R18C). Comparando la actividad de cada neurona durante la elección, de las 17 neuronas del grupo CTRL: 9 aumentan su FD al alternar, 7 lo hacen de manera opuesta y 1 no cambia. De igual forma, en las 18 neuronas del grupo KO: 8 aumentan al alternar, 8 al no alternar y 2 no cambian. No observamos cambios en las proporciones de estas neuronas entre genotipos. De igual manera, observamos que la calidad de respuesta de las neuronas codificantes se conserva en el grupo KO. Por lo tanto, estos hallazgos respaldan la idea de que una subrepresentación de estas neuronas a nivel poblacional en la mPFC podrían ser responsable de las alteraciones en la memoria de trabajo espacial observadas en la tarea YM.

En su conjunto, los resultados obtenidos en la tarea YM muestran la notable capacidad de las neuronas piramidales de la mPFC para responder de manera precisa a la demanda cognitiva asociada a los distintos instantes que presenta la tarea YM. Existen grupos de neuronas que responden a la periferia y otras que responden al centro del laberinto. Estas últimas muestran una especificidad de respuesta respecto de la dirección de exploración y se activan específicamente en el segmento de mayor demanda cognitiva (bin centro). El perfil de actividad de las neuronas codificantes se encuentra conservada en los animales mutantes pero detectamos una subrepresentación de estas neuronas a nivel poblacional, consistente con las alteraciones en la memoria de trabajo espacial observadas en la tarea YM y coincidentes con los reportes previos. Estos resultados sugieren alteraciones a nivel del procesamiento de la carga cognitiva adicional de la tarea como parte del contexto en nuestro modelo animal de esquizofrenia.

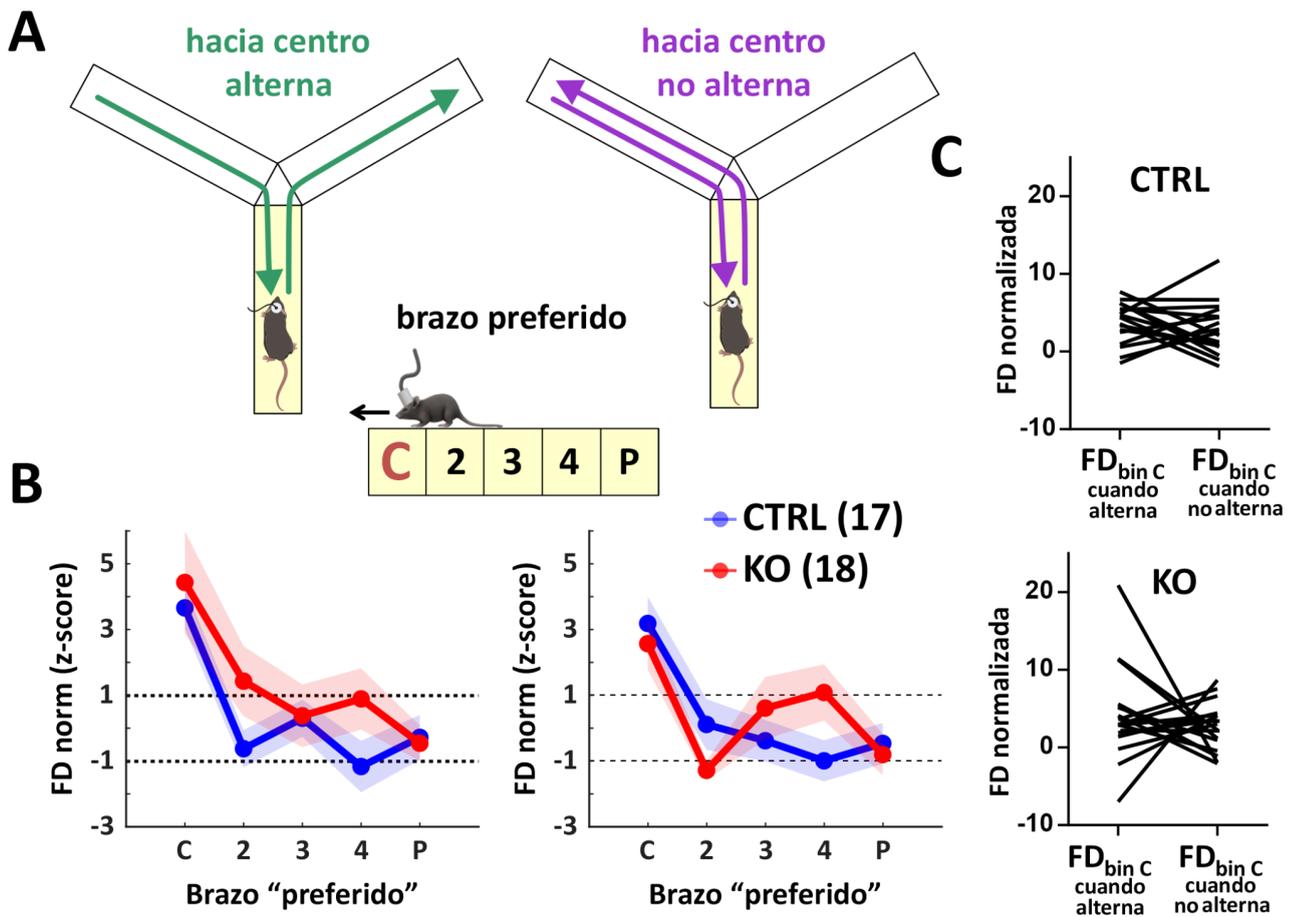


Figura R18. Las neuronas con respuesta al centro en el brazo preferido cambian su actividad durante la elección de alternar o no alternar entre brazos. **(A)** Esquemas del laberinto en Y representando un ensayo donde el animal alterna y no alterna entre brazos. En amarillo se marca el brazo de preferencia neuronal e indica que las neuronas analizadas corresponden al grupo de neuronas con respuesta al centro (mismas neuronas que en Figura R14 y R15). **(B)** Perfiles de actividad de las neuronas en el brazo preferido durante las corridas hacia el centro discriminando si se realiza una alternancia completa (izquierda) o no (derecha). No se observan diferencias significativas en los perfiles de actividad de las neuronas entre genotipos (Alterna: *two-way RM ANOVA*; interacción bins x genotipo $F(4, 124) = 0.8, p = 0.53$; factor genotipo $F(1, 31) = 2.33, p = 0.14$; No alterna: interacción bins x genotipo $F(4, 124) = 2.32, p = 0.06$; factor genotipo $F(1, 31) = 0.05, p = 0.82$). *Data*: los puntos denotan la media por bin y la sombra denota SEM. Las líneas punteadas marcan los umbrales de referencia $Z = 1$ y $Z = -1$. **(C)** Cambio en la FD normalizada en el bin C durante la elección. No se observan diferencias significativas entre las proporciones en ambos genotipos [*Chi-squared test*, 17 neuronas de CTRL (9 de alterna, 7 de no alterna, 1 no cambia) vs 18 neuronas de KO (8 de correcta, 8 de incorrecta, 2 ambas), $X^2 = 0.43, df = 2, ns p = 0.81$].

Análisis de la sincronización hipocampo-prefrontal en pruebas de exploración con distinta carga contextual en un modelo murino de esquizofrenia.

El hipocampo (HP) y la mPFC se comunican mediante varias vías polisinápticas y, en particular, por una vía monosináptica unidireccional que proyecta desde el hipocampo ventral (vHP) a la mPFC (Barbas & Blatt, 1995; Condé et al., 1995; Hoover & Vertes, 2007). La vía vHP-mPFC directa desempeña un papel crucial en procesos cognitivos complejos como la memoria de trabajo espacial (Bähner et al., 2015; O'Neill et al., 2013; Spellman et al., 2015), así como en la regulación de comportamientos emocionales, incluyendo el miedo y la ansiedad (Adhikari et al., 2010; Padilla-Coreano et al., 2016; Sotres-Bayon et al., 2012). Es importante destacar la relevancia de esta vía en relación a la fisiopatología de la esquizofrenia, habiéndose reportado alteraciones tanto en pacientes como en modelos animales de la enfermedad (Meyer-Lindenberg et al., 2005; Sigurdsson et al., 2010; Tost et al., 2012; Zhou et al., 2008). En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo se reportó en animales anestesiados que los mutantes presentan una hipoconectividad funcional de la vía vHP-mPFC, comparado con animales control (Alvarez et al., 2020).

Por otro lado, se sabe que el HP presenta una actividad de campo local (LFP, del inglés *local field potential*), caracterizada por oscilaciones de tipo theta (entre 4 y 12 Hz). Estas oscilaciones emergen fundamentalmente durante comportamientos exploratorios y el sueño REM (Buzsáki, 2002; Fujisawa & Buzsáki, 2011). A su vez, se ha descrito que la actividad de las neuronas de la mPFC puede ser modulada por el ritmo theta del HP (Siapas et al., 2005), es decir, que las neuronas disparan preferencialmente en alguna fase de la oscilación (lo que se conoce como “enganche de fase”, del inglés *phase-locking*). El análisis de enganche de fases es una de las medidas utilizadas para estudiar la interacción entre regiones cerebrales. Cuando las neuronas de la mPFC están sincronizadas o activadas en fase con las oscilaciones provenientes del LFP hipocámpal, se puede considerar como evidencia de una comunicación efectiva entre estas regiones. Se ha reportado que la modulación de la vía vHP-mPFC es dinámica y surge en diferentes fases de tareas conductuales (Sigurdsson & Duvarci, 2016; Soltani Zangbar et al., 2020). Sin embargo, aún no se conoce cuál es el rol de la vía HP-PFC en la realización de conductas exploratorias, y más aún, cómo la vía responde frente a la carga contextual de la tarea.

En el tercer objetivo de esta tesis nos planteamos analizar la coordinación entre la actividad de las neuronas piramidales de mPFC y el ritmo theta del vHP durante las tareas de exploración (LT, SO y YM), y describir las alteraciones que se presentan en dicha coordinación en nuestro modelo animal de esquizofrenia. Para esto, el microdispositivo de implante contaba con 2 electrodos bipolares, que se dirigieron al vHP (para más detalle ver MyM «Microdispositivo de registro»). Estos electrodos nos permitieron registrar el LFP del vHP al mismo tiempo que registramos la actividad de las neuronas de la mPFC. Este tipo de registros *in vivo* simultáneamente en ambas estructuras y en animales despiertos, resulta novedoso en nuestro grupo y fue parte de mi trabajo la puesta a punto de estos experimentos.

Los registros de LFP fueron procesados siguiendo protocolos ya estandarizados en reportes previos de nuestro grupo (Alvarez et al., 2020). A modo de resumen de la metodología utilizada: la señal obtenida fue submuestreada a 1250 Hz y aplicamos un filtro *butterworth* en el rango de theta entre 6 y 10 Hz. Luego, utilizamos la transformada de *Hilbert* para calcular la fase instantánea de los potenciales de acción de las neuronas de la mPFC a dicha banda frecuencial. En la Figura R19A se puede observar un ejemplo representativo de la señal cruda, la señal filtrada en la banda theta (en el rango de 6 a 10 Hz) y la ocurrencia de los potenciales de acción de una neurona piramidal de mPFC. Para estudiar la sincronización vHP-mPFC, para cada neurona analizamos la distribución de fases instantáneas calculadas. Evaluamos las distribuciones circulares con el *test de Rayleigh*, que permite poner a prueba si la distribución de fases es circularmente uniforme. Si se trata de una distribución que no es uniforme ($p < 0.05$), entonces la distribución presenta una fase preferencial de disparo consistente con una actividad sincronizada a la oscilación del vHP. Adicionalmente, calculamos el módulo del vector resultante (r) de cada distribución circular, lo cual proporciona información sobre la magnitud de la sincronización de las neuronas con el ritmo theta. Así, un mayor grado de sincronización se evidenciaría en un vector resultante de mayor módulo. En la Figura R19B se presentan ejemplos representativos de histogramas circulares de fases para las espigas de dos neuronas ejemplo, a la izquierda una neurona significativamente enganchada al ritmo theta del vHP y a la derecha otra que no se encuentra enganchada al ritmo. De esta forma, para cada una de las tareas de exploración realizadas (LT, SO y YM), cuantificamos la proporción de neuronas de la mPFC sincronizadas al ritmo theta del vHP y la magnitud de la sincronización (módulo del vector resultante) para los grupos CTRL y KO. Para llevar a cabo estos análisis, sólo

consideramos a las neuronas piramidales provenientes de los animales que presentaron una buena señal de LFP en el vHP (según se detalla en la tabla M1 de materiales y métodos).

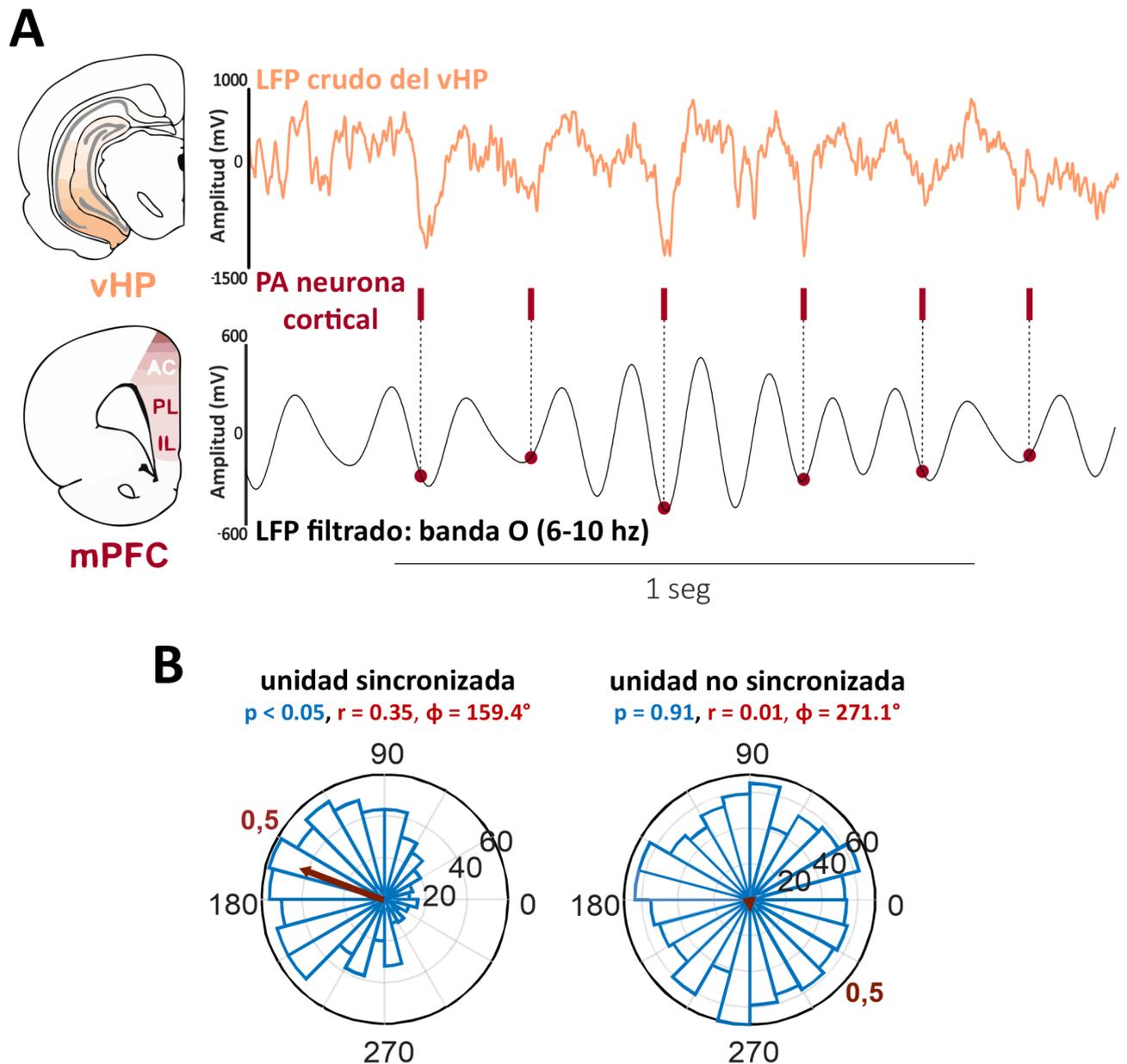


Figura R19. Análisis de sincronización entre la actividad de neuronas piramidales de la mPFC y el ritmo theta del vHP. (A) Los esquemas de la izquierda corresponden a cortes sagitales de un hemisferio del cerebro de ratón en las regiones de interés estudiadas, el hipocampo ventral (vHP, naranja) y la corteza prefrontal medial (mPFC, rojo), ambos esquemas tomados y modificados de Sigurdsson & Duvarci (2016). A la derecha se puede ver un fragmento de la señal cruda del potencial de campo local del vHP (LFP, naranja), registrado en simultáneo con la actividad de una neurona piramidal de la mPFC (potenciales de acción o PA en rojo). En la parte inferior se puede ver el fragmento de señal del LFP filtrado en el rango theta (negro, 6-10 Hz). Se puede observar como los PA se encuentran enganchados a una fase preferencial de la onda theta del vHP (alrededor de los valles). **(B)** Ejemplos representativos de histogramas circulares mostrando

una neurona piramidal de mPFC que se encuentra sincronizada (distribución circular no uniforme, *Rayleigh test*, $p < 0.05$) y una no sincronizada al ritmo theta del vHP (*Rayleigh test*, ns $p = 0.91$). Se muestra el vector resultante de cada histograma (flecha marrón). La dirección del vector muestra la fase preferencial de cada neurona (Φ) y su módulo (r) denota el grado de sincronización.

En primer lugar, examinamos el grado de sincronización de las neuronas corticales con el ritmo theta del vHP durante las tareas de exploración en el corredor lineal con diferentes niveles de carga contextual (LT y SO). En ambas pruebas, los registros del LFP del vHP mostraron una potencia de la banda theta similar, con un pico de actividad alrededor de 8 Hz, tanto en los animales KO como en CTRL (Figura R20A). Debido a que existe amplia evidencia de que la potencia del ritmo theta hipocampal se incrementa con la locomoción (Buzsáki & Moser, 2013; McFarland et al., 1975; Sławińska & Kasicki, 1998), calculamos el enganche de fase de las neuronas piramidales de mPFC durante las transiciones que realizan los animales sobre el corredor lineal para las pruebas LT y SO. Observamos que durante ambas pruebas los animales KO exhiben una reducción significativa en la proporción de neuronas sincronizadas al ritmo theta hipocampal (ver Figura R20B, corridas en la prueba LT: CTRL 31,6% vs KO 18,6%; corridas en la prueba SO: CTRL 28,3% vs KO 10,1%). Además, este mismo fenómeno se puede observar durante los intervalos donde los animales permanecen del lado social y del lado objeto (donde también observamos oscilaciones theta prominentes). Estos resultados son compatibles con una entrada hipocampal disminuida en los animales KO, presentando una subrepresentación basal de neuronas corticales moduladas por el ritmo theta del vHP. Este hallazgo es consistente con las alteraciones previamente reportadas en la conectividad funcional de la vía HP-PFC en animales anestesiados (Alvarez et al., 2020). Además, observamos que el grupo mutante presenta un aumento significativo en la magnitud del enganche al ritmo theta durante los períodos de corridas en el contexto enriquecido, la prueba SO (Figura R20B). Estos hallazgos sugieren que, ante una mayor demanda cognitiva, como la que se presenta en la prueba SO en comparación con LT, el sistema tiende a compensar la subrepresentación de las neuronas sincronizadas a nivel poblacional mediante un aumento en el grado de sincronización.

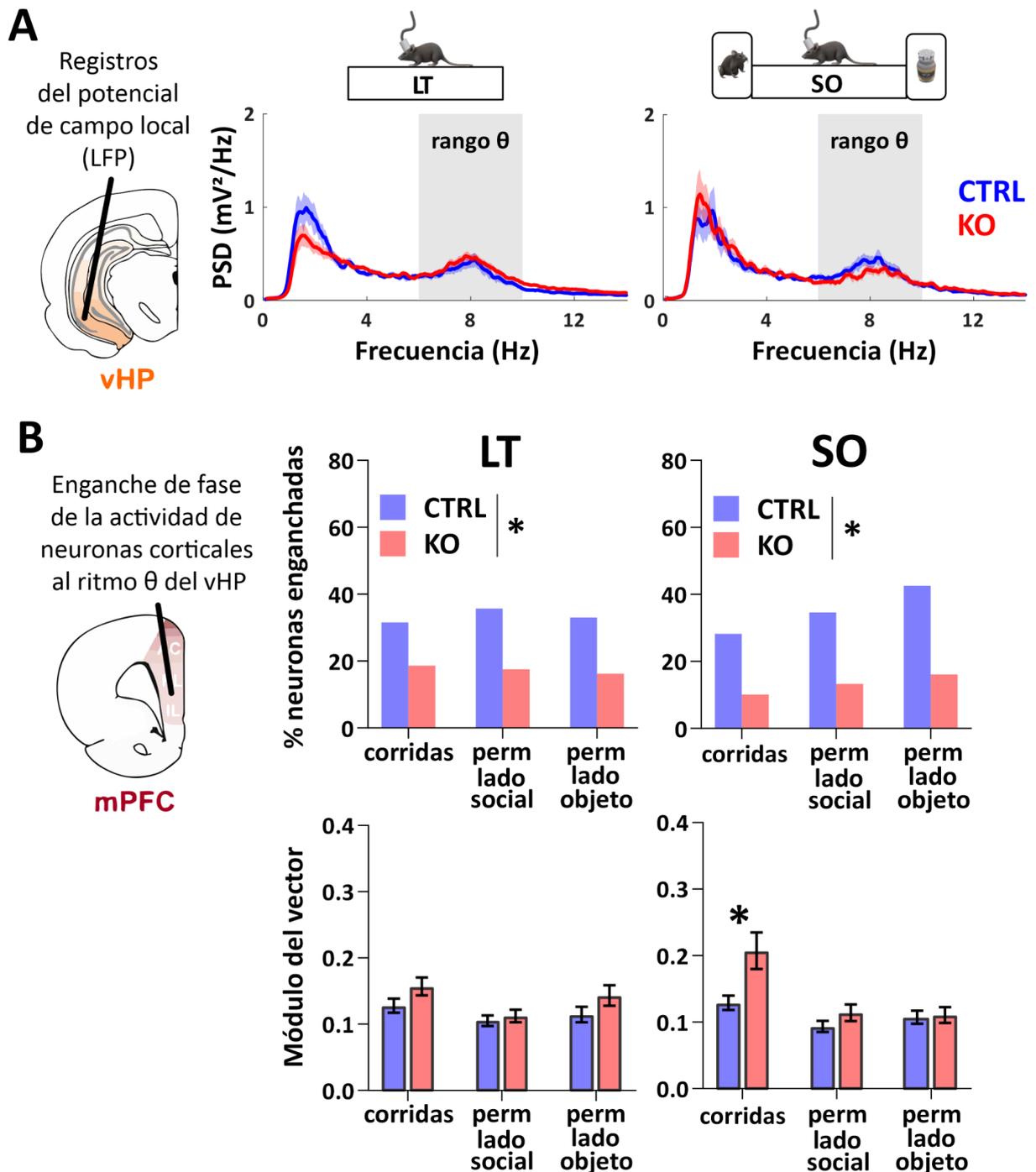


Figura R20. Los animales mutantes exhiben una reducción en el porcentaje de neuronas enganchadas al ritmo theta del vHP durante las tareas sobre el corredor lineal. **(A)** Espectros de potencia (PSD, de *power spectral density*) de los LFP registrados en el vHP durante las tareas LT y SO. En cada gráfico se muestra el promedio de los espectros individuales para todas las sesiones registradas (línea) y el error estándar (sombra). El rectángulo gris denota el rango de theta analizado (6-10 Hz). No se encontraron diferencias significativas en la amplitud de la señal de theta registrada en el vHP, tanto entre genotipos como entre las tareas evaluadas. **(B)** Análisis del enganche de fase de la actividad de las neuronas piramidales al ritmo theta del vHP. En los gráficos superiores se muestra el porcentaje de neuronas piramidales sincronizadas durante los intervalos de corridas totales y los intervalos de permanencia en los extremos. Los animales mutantes exhiben una menor proporción de neuronas sincronizadas respecto de CTRL, tanto en LT (Fisher's

exact test, corridas: CTRL 31.6% vs KO 18.6%, $p = 0.007$; perm. lado social: CTRL 35.7% vs KO 17.6%, $p < 0.001$; perm. lado objeto: CTRL 33.0% vs KO 16.2%, $p < 0.001$), como en la prueba SO (Fisher's exact test, corridas: CTRL 28.3% vs KO 10.1%, $p = 0.01$; perm. lado social: CTRL 34.6% vs KO 13.3%, $p = 0.003$; perm. lado objeto: CTRL 42.6% vs KO 16.1%, $p < 0.001$). En los gráficos inferiores se muestra el módulo o la fuerza de enganche de las neuronas sincronizadas al ritmo hipocampal. No se observan diferencias significativas entre genotipos durante la tarea LT (Mixed-effects model REML, interacción intervalos x genotipo $F(2, 162) = 1.45$, $p = 0.24$). En la tarea SO, el grupo KO muestra un aumento en el grado de enganche durante los intervalos de corridas (Mixed-effects model REML, interacción intervalos x genotipo $F(2, 95) = 5.83$, $p = 0.004$; Bonferroni $*p < 0.001$). N de neuronas, tarea LT 137 CTRL y 323 KO; tarea SO 103 CTRL y 166 KO. Provenientes de 4 animales CTRL y 5 animales KO.

En segundo lugar, examinamos la sincronización de las neuronas corticales con el ritmo theta del vHP durante la prueba de alternancia espontánea en el laberinto en forma de Y (YM). Para ambos grupos experimentales, KO y CTRL, observamos oscilaciones theta en la región del vHP (Figura R20A). Estas oscilaciones presentaron un pico de potencia en la banda theta alrededor de 8 Hz, similar a lo observado en las pruebas LT y SO (comparación no significativa, datos no mostrados). Dado que la vía HP-PFC se ha implicado en los procesos de memoria de trabajo espacial (Bähner et al., 2015; O'Neill et al., 2013; Spellman et al., 2015; Xia et al., 2019), estudiamos el grado de sincronización de las neuronas corticales con el ritmo theta del vHP durante los intervalos de corridas hacia el centro y hacia la periferia. Observamos que los animales KO exhiben una reducción significativa en el porcentaje de neuronas sincronizadas en comparación con CTRL, durante las corridas hacia el centro (ver Figura R21B, hacia el centro: CTRL 31.8% vs KO 11.5%), y que este mismo fenómeno se observa también en los intervalos de corridas hacia la periferia (hacia la periferia: CTRL 34.4% vs KO 20.7%). Estos resultados concuerdan con los observados para las pruebas LT y SO, consistente con una reducción generalizada en el número de neuronas corticales sincronizadas con el ritmo theta del vHP a nivel poblacional en la mPFC. Es interesante destacar que el grupo KO mostró una disminución significativa en el porcentaje de neuronas sincronizadas respecto de la dirección de movimiento de los animales (hacia centro 11,5% vs hacia periferia 20,7%), lo que podría sugerir que la coordinación entre el vHP y las neuronas corticales disminuye aún más durante eventos de mayor exigencia cognitiva.

En su conjunto, estos resultados evidencian que en nuestro modelo animal de esquizofrenia existe una alteración generalizada en el reclutamiento de neuronas corticales por los ritmos hipocampales, lo cual se condice con los hallazgos previos sobre una disminución en la

conectividad funcional de la vía HP-mPFC en animales anestesiados (Alvarez et al., 2020). Estos resultados aportan evidencia importante sobre las alteraciones en vía vHP-mPFC presentes en animales mutantes despiertos. Más aún, estos hallazgos pueden contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes a las alteraciones observadas en la esquizofrenia, enfatizando la importancia de la interacción entre estas regiones cerebrales en los procesos cognitivos.

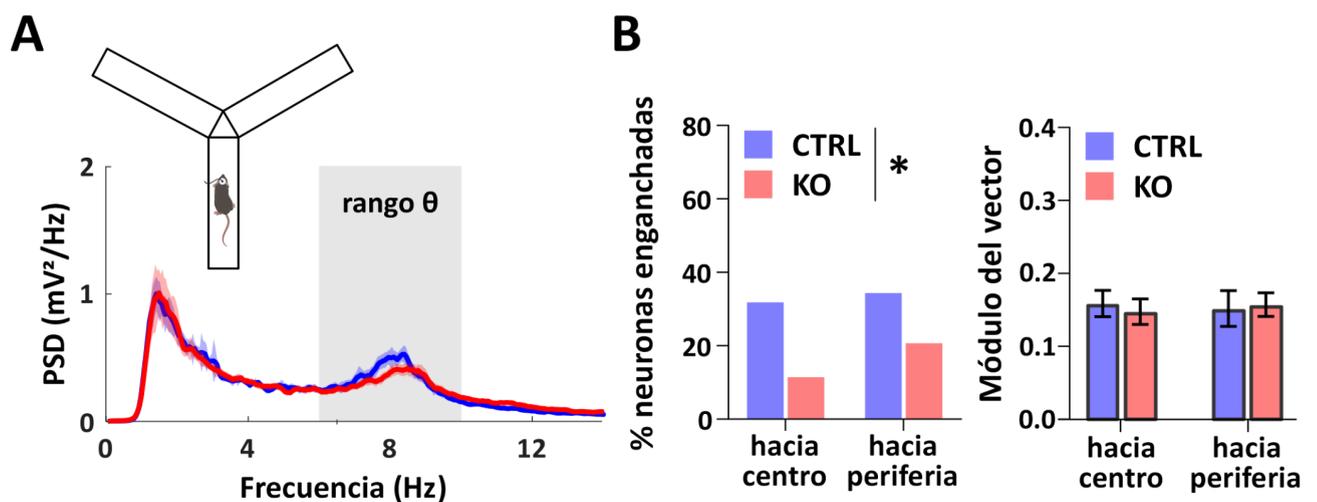


Figura R21. El grupo mutante exhibe una disminución en el porcentaje de neuronas corticales enganchadas al ritmo theta hipocampal durante los períodos de corridas en la prueba YM. **(A)** Espectros de potencia del LFP del vHP durante la prueba YM. Se muestra el promedio de los espectros individuales de las sesiones (línea) y el error estándar (sombra). El rectángulo gris denota el rango de theta analizado (6-10 Hz). No se encontraron diferencias significativas en la amplitud de la señal de theta registrada en el vHP entre genotipos. **(B)** Izquierda: Análisis del enganche de fase de neuronas piramidales al ritmo theta del vHP. Se muestra el porcentaje de neuronas piramidales enganchadas durante los intervalos de corridas hacia el centro y hacia la periferia de los brazos del YM. Los animales mutantes exhiben una menor proporción de neuronas enganchadas respecto de CTRL (*Fisher's exact test*, hacia el centro: CTRL 31.8% vs KO 11.5%, $p < 0.001$; hacia la periferia: CTRL 34.4% vs KO 20.7%, $p = 0.04$). Derecha: Módulo o la fuerza de enganche de las neuronas sincronizadas al ritmo hipocampal. No observamos diferencias significativas entre genotipos durante los intervalos de corridas hacia el centro y hacia la periferia (*Mixed-effects model REML*, interacción intervalos x genotipo $F(1, 37) = 1.8$, $p = 0.19$). N de neuronas: 65 CTRL y 155 KO, provenientes de 5 animales CTRL y 6 animales KO.

DISCUSIÓN

La mPFC es una estructura fundamental en la dirección de comportamientos exploratorios a través de representaciones complejas del contexto. La información espacial es integrada en conjunción con elementos emocionales y con información sobre el estado interno de los individuos, lo que le permite formar representaciones dinámicas que pueden adaptarse frente a demandas cognitivas crecientes (Anastasiades & Carter, 2021; Euston et al., 2012; Hok et al., 2005; Hyman et al., 2012; Murugan et al., 2017; Vogel et al., 2022). Alteraciones en la dinámica de los ensambles corticales provocan graves trastornos cognitivos, como los que se observan en patologías neuropsiquiátricas (Green et al., 2015; Uddin, 2011; Unschuld et al., 2014). En este sentido, abordamos el estudio de la fisiopatología de la esquizofrenia a través de un modelo murino que presenta una ablación post-natal temprana de receptores NMDA asociados a interneuronas GABAérgicas cortico-límbicas (en su mayoría PV+). Este modelo animal presenta un fenotipo compatible con la esquizofrenia llegada la etapa adulta (Nakazawa et al., 2012). En el presente trabajo doctoral abordamos dos problemáticas importantes dentro del campo de estudio: **Cómo las neuronas de la mPFC participan en la codificación de la información contextual saliente durante la exploración ambiental y cómo dichas representaciones se encuentran alteradas en el modelo animal de esquizofrenia.** Para esto, registramos la actividad unitaria de las neuronas corticales de la mPFC mientras ratones mutantes y controles realizaban tareas de exploración con diferentes niveles de carga cognitiva y emocional.

Durante las pruebas de exploración en el corredor lineal, evaluamos el grado de codificación de las neuronas frente a dos situaciones que presentan distinta carga contextual. Por un lado, el corredor lineal vacío (LT) y por el otro una situación de mayor complejidad (prueba SO) con la presencia de un congénere (ratón macho adulto) y un objeto inanimado, ambos novedosos. Restringimos nuestro análisis a la población de neuronas piramidales registradas (ver Figura R5). En la prueba LT, encontramos neuronas corticales que responden de manera diferencial a los extremos del corredor lineal, mostrando que los animales KO presentan una respuesta conservada a nivel de neurona única (Figura R8) y un nivel de reclutamiento poblacional de estas neuronas comparable con los CTRL (Figura R10). Sin embargo, en la tarea SO, la cual comprende un aumento en la carga contextual, los animales KO exhiben una alteración en el reclutamiento de neuronas codificantes a

nivel poblacional (Figura R11), a pesar de mantener una calidad de respuesta a nivel de neurona única (Figura R9). Esta reducción en el reclutamiento incluye a las neuronas que responden a la saliencia de los estímulos presentes en la prueba, las cuales discriminan el lado social del lado objeto y viceversa. Estos resultados son altamente relevantes para comprender cómo es la dinámica de codificación de las neuronas de la mPFC frente a cambios en la información contextual de la tarea, y en particular, respecto de la codificación de estímulos sociales. Existe evidencia previa que sugiere que las neuronas de la mPFC pueden responder a la ubicación de estímulos sociales integrando su posición en el espacio. En tareas de discriminación social-objeto similar a la que utilizamos, Lee et al., (2016) identificó neuronas que se activan durante la interacción del individuo con el estímulo social. Murugan et al., (2017) por su parte, midió selectivamente la actividad de neuronas de la mPFC que proyectan al núcleo accumbens, detectando unidades capaces de codificar información social y espacial de forma integrada. En ambos trabajos, logran distinguir a las neuronas que codifican al estímulo social de las que responden meramente a la ubicación espacial. Para esto, extienden la tarea social-objeto invirtiendo la ubicación del estímulo social y el objeto con la idea de determinar si las neuronas responden a la ubicación espacial o si pueden seguir al estímulo social. En estudios piloto realizados durante la puesta punto de los experimentos realizados en esta tesis, detectamos que aproximadamente un 6% de las neuronas registradas muestran una respuesta durante la interacción con el estímulo social independientemente de su ubicación espacial (3 neuronas de 46). Si bien las neuronas que responden al estímulo social independientemente de su posición en el espacio podrían tener un valor significativo en cuanto a la codificación de la experiencia social, son una fracción muy pequeña del total de las neuronas registradas en la mPFC (15 de 830 registradas por Murugan et al., 2017) y por lo tanto no podrían ser las únicas responsables de señalar una interacción tan compleja como lo es la exploración de un congénere. En este sentido, incluso los mutantes presentan neuronas codificantes del lado social con perfiles de respuesta conservados (Figura R9), junto a una conducta de exploración social alterada (Figura R4). Esto sugiere que buena parte de la experiencia social no se representa a nivel de neurona individual y que el concepto de “neurona social” debería ser reemplazado por el concepto de ensamble codificante de la experiencia social. Surge la posibilidad de que la codificación de la información saliente durante la exploración se esté llevando a cabo a nivel de un código poblacional de reclutamiento neuronal en la mPFC. Por ejemplo, Levy et al., (2019) reveló que las neuronas en la mPFC pueden distinguir entre olores sociales y no sociales a través de su patrón de activación a nivel poblacional. Lo más interesante es

que establecieron que la eliminación del gen *Cntnap2* (asociado al autismo) resulta en una disminución de la interacción social, al mismo tiempo que interrumpe la formación de ensamblajes capaces de codificar el estímulo olfativo social sin afectar la percepción general del olfato. En el presente trabajo detectamos que nuestro modelo animal de esquizofrenia presenta una disminución de neuronas discriminantes a nivel poblacional, que incluyen a las neuronas codificantes del lado social, durante la tarea SO. Esta disminución resulta ser específica del contexto, ya que si comparamos el reclutamiento en la tarea LT y SO, la representación de neuronas discriminantes decae de un 53% a un 36% (considerando todas las sesiones en el mutante). De forma interesante, los CTRL presentan un nivel de reclutamiento que ronda el 55-60% y que se mantiene frente a un aumento de la carga contextual de la tarea (si comparamos LT y SO en el grupo CTRL). Incluso, este nivel de reclutamiento se observa en los mutantes durante la prueba LT, lo que podría tratarse del grado de reclutamiento de neuronas codificantes que presenta la mPFC en cualquier tipo de tarea de exploración. En este sentido, un trabajo reciente, que utiliza otros criterios de clasificación y umbrales, muestra que durante una prueba de sociabilidad, los ensamblajes que responden (tanto activándose como inhibiéndose) comprenden alrededor de un 60% de las neuronas registradas en la región prelímbica de mPFC (Zhao et al., 2022). De esta forma, proponemos que los mutantes consiguen reclutar niveles basales de actividad en la mPFC durante la prueba LT, pero frente a la carga contextual adicional que presenta la tarea SO, emergen alteraciones en el reclutamiento de las neuronas discriminantes que deviene en una subrepresentación a nivel poblacional de la información contextual. En definitiva, este fenómeno impacta en la conducta del animal. Previamente y mediante experimentos de *whole-cell patch clamp* in vivo, nuestro grupo identificó en los mutantes alteraciones en el balance E/I a nivel de las entradas sinápticas sobre neuronas piramidales de la mPFC (Pafundo et al., 2021). Este desbalance emerge durante estados de desincronización cortical (Alvarez et al., 2020), con predominancia de ritmos theta y gamma en el EEG, típicamente relacionados con alta carga cognitiva, como podría serlo la toma de decisiones durante un encuentro social. Con este antecedente podemos plantear como hipótesis que durante la tarea SO las alteraciones en el reclutamiento neuronal se deben a una falta de selectividad en la codificación neuronal producto de la actividad espuria generada por fallas en el balance de los niveles E/I. Dicho de otra manera, una mPFC “más ruidosa” carece de especificidad en su respuesta y explica la preponderancia de unidades no codificantes en nuestros experimentos (>50% de neuronas subumbrales).

Con el objetivo de determinar la capacidad de codificación de las neuronas de la mPFC durante otra prueba de exploración que presente una alta carga cognitiva, utilizamos una tarea de alternancia espontánea sobre el YM. Esta tarea es comúnmente utilizada para evaluar memoria de trabajo y de corto plazo (Lalonde, 2002; Rice et al., 2019). Varios estudios han propuesto que la actividad de neuronas corticales de la mPFC puede ser modulada durante la realización de tareas que requieran de memoria de trabajo espacial (Jones & Wilson, 2005; Shin et al., 2019; Spellman et al., 2015). La memoria de trabajo hace referencia a un sistema limitado que almacena temporalmente y manipula información. En general las tareas que evalúan memoria de trabajo espacial se caracterizan por ser recompensadas y presentan una etapa característica de “*delay*”, donde los animales deben retener el camino que realizaron para obtener la recompensa (Constantinidis et al., 2018; Lundqvist et al., 2018). Si aprendieron la contingencia de dónde deben ir a buscar la siguiente recompensa, en el ensayo siguiente la buscarán en base a la experiencia previa. Vogel et al., (2022) a través del silenciamiento selectivo de las neuronas piramidales de la mPFC durante las distintas fases de la tarea en un laberinto en forma de “T” (*T-maze*), encuentran que estas neuronas participan en la generación y retención de la memoria de trabajo espacial. Más aún, las neuronas piramidales aumentan su actividad al aproximarse al punto de toma de decisión y pueden integrar en su respuesta la posición y la dirección de movimiento de los animales. En nuestra tarea de YM, encontramos que el 26.2% de las neuronas piramidales registradas aumentan su actividad significativamente al acercarse al segmento centro del brazo “preferido” (grupo CTRL en Figura R15). Este patrón de activación neuronal es selectivo de la dirección de movimiento de los animales y solo responden cuando se dirigen hacia el punto de mayor carga cognitiva asociada a la toma de decisiones, el centro (ambos grupos en Figura R14). Sin embargo, no podemos asegurar que la población de neuronas que detectamos esté participando en los procesos de memoria de trabajo espacial per se. Nuestra tarea YM tiene ciertas limitaciones, ya que nuestros experimentos se caracterizan por un comportamiento exploratorio espontáneo sin restricciones, por lo que el tiempo que tardan los animales en volver al centro del laberinto desde la periferia está autorregulado por el mismo animal y no podemos controlar el intervalo que toman en realizar una elección. Cuando los animales destinan un tiempo considerable a la exploración de la periferia y luego deciden volver al punto de elección de brazo, es difícil pensar que procesos de memoria de trabajo espacial se están llevando a cabo. A pesar de esto, los resultados obtenidos son ampliamente relevantes en el marco de estudio de esta tesis ya que refuerzan y extienden a lo reportado en la tarea de interacción social. Así, detectamos diferentes subgrupos de neuronas

piramidales de la mPFC capaces de responder de manera diferencial a momentos críticos de la tarea, incluyendo aquellos relacionados con la elección del brazo a visitar y la selección de la conducta exploratoria a adoptar. Y aún más relevante para este trabajo, nuestro modelo animal de esquizofrenia presenta neuronas que responden al centro donde ocurre la elección de brazos, con perfiles de respuesta conservadas a nivel de neurona única (Figura 14), pero presentando una alteración a nivel del reclutamiento poblacional de estas neuronas (Figura 15). Estos resultados concuerdan con lo observado durante la prueba SO, apoyando nuestra hipótesis que la codificación de la información saliente en la mPFC durante la exploración ocurre a nivel de un código poblacional y esto se encontraría alterado en los mutantes, principalmente durante los momentos de alta demanda cognitiva.

Considerando los resultados obtenidos en las tres pruebas exploratorias realizadas ¿Es posible pensar que las alteraciones en el reclutamiento neuronal en la mPFC explican las alteraciones comportamentales observadas en nuestro modelo animal? Por un lado, en la tarea SO, los controles establecen una preferencia social con la reexposición a la tarea y los mutantes se mantienen con una preferencia errática entre el estímulo social y el objeto (Figura R4). Sin embargo, la representación de neuronas discriminantes a nivel poblacional se mantiene estable en CTRL (cerca del 55% de las neuronas en ambos tipo de sesiones) con un aumento no significativo de neuronas codificantes del lado social (del 24% al 30% de las neuronas registradas, Figura R11). Mientras que en el grupo KO se mantiene una subrepresentación de neuronas discriminantes (cerca del 35% en ambas sesiones), y se observa una disminución no significativa de neuronas codificantes del lado social (del 20% al 16%, Figura R11). En cuanto a la tarea YM, los mutantes exhiben una reducción en el porcentaje de alternancias completas (Figura R12C) sin que se manifiesten cambios en la locomoción (Figura R12D). Valores de alternancia cercanos al 50% (lo esperado frente a una elección al azar de los brazos) son compatibles con alteraciones en la memoria de trabajo espacial y podríamos relacionar estos resultados con las alteraciones en el reclutamiento de neuronas corticales asociadas al punto de toma de decisiones de mayor carga cognitiva (el centro). Sin embargo, los resultados obtenidos no son suficientes para establecer una causalidad entre el comportamiento alterado y las alteraciones en el reclutamiento neuronal en la mPFC. Es posible que la representación generada en la mPFC sirva como fuente de información para regiones subcorticales, como la amígdala basolateral, el núcleo accumbens, el hipocampo dorsal y núcleos del tálamo, entre otros. Estas regiones subcorticales podrían desempeñar un

papel importante en la ejecución de comportamientos adaptativos y podrían estar involucradas en la traducción de la información contextual en comportamientos observables.

Ahora bien, es necesario tener en cuenta las limitaciones que presentan nuestros análisis comportamentales. Como es habitual en registros en ratones ambulantes y con el fin de maximizar el número de unidades registradas limitando el número de animales implantados, se realizaron múltiples sesiones de registro en cada animal. La repetición de pruebas es poco común en experimentos conductuales, donde un gran número de animales suele ser testado en simultáneo en una determinada prueba. En el caso de los registros electrofisiológicos se privilegia el diseño experimental en función de estos, relegando en parte aspectos metodológicos de la medición conductual. Así, por ejemplo, los animales se evalúan de manera contrabalanceda según genotipos pero no de manera simultánea, como es tradicional hacerlo en experimentos conductuales “puros”. Aún en estas condiciones los parámetros conductuales obtenidos se asemejan a lo esperado a partir de experimentos independientes, los cuales se realizan privilegiando el análisis comportamental. Por ejemplo, la alternancia promedio del grupo CTRL en la prueba YM arrojó valores (63%) significativamente diferentes de lo esperado por azar (50%) aunque algo menores a lo obtenido previamente en ratones no implantados (70%). Además la caracterización comportamental de nuestro modelo animal ya ha sido reportada, mostrando que llegada la etapa adulta presentan alteraciones en: la memoria de trabajo espacial (niveles de alternancia comparables con chance), la memoria social de corto plazo y otros comportamientos sociales como comportamientos reproductivos y fallas en la construcción de nido (Belforte et al., 2010). Teniendo en cuenta lo hasta aquí planteado, consideramos que los resultados presentados en esta tesis aportan importante evidencia sobre alteraciones en la asignación de recursos cognitivos en la mPFC en el modelo animal de esquizofrenia, principalmente bajo condiciones de alta carga cognitiva que podría dar sustento funcional a las alteraciones conductuales recién mencionadas.

Por último, estudiamos el grado de sincronización entre las neuronas corticales y el ritmo theta del hipocampo ventral (vHP) durante las tareas de exploración con distinta carga contextual. La vía vHP-mPFC participa de procesos cognitivos complejos como la memoria de trabajo espacial (Bähner et al., 2015; O’Neill et al., 2013; Spellman et al., 2015), así como en la regulación de comportamientos emocionales (Adhikari et al., 2010; Padilla-Coreano et al., 2016; Sotres-Bayon et al., 2012), incluyendo aspectos de la cognición social (Phillips et al., 2018). En base a los

resultados obtenidos en este trabajo, encontramos que existe una reducción generalizada del porcentaje de las neuronas piramidales sincronizadas con el ritmo theta del vHP en los animales mutantes. Esta reducción se observa para todas las tareas de exploración realizadas, comparando los porcentajes de neuronas sincronizadas al ritmo del vHP respecto del grupo CTRL (LT y SO en Figura R20B; YM en Figura R21B). Parte de nuestro análisis se centra en los eventos de corridas que realizan los animales durante la exploración ya que existe evidencia de que la actividad theta del vHP correlaciona con la actividad locomotora de los animales (Bender et al., 2015; L. Lu et al., 2020). Es interesante destacar en que las diferentes pruebas analizadas, incluso en diferentes segmentos temporales de las mismas, no observamos grandes fluctuaciones en el número de unidades sincronizadas al theta hipocampal en los ratones CTRL. Esto sugiere que aún en las pruebas de baja carga cognitiva (LT) la señal proveniente del hipocampo desempeña un rol central en la organización funcional de la mPFC. Hubiera sido interesante analizar períodos de descanso, con poca o nula estimulación ambiental, como por ejemplo, mientras los animales descansan en la arena neutral (*holding cage*). Esto nos permitiría comparar con las sesiones de exploración activa incluidas en nuestra tesis. La disminución significativa del número de unidades sincronizadas al ritmo theta del vHP en los ratones KO también se presentó de manera generalizada, casi constante en todas las condiciones. Junto con los resultados de conectividad funcional disminuida obtenidos previamente en ratones mutantes anestesiados, podemos proponer que existe una base anatómica para dicha disfunción en los mutantes. Típicamente, durante la adolescencia la densidad de espinas dendríticas y de sinapsis excitatorias declina producto del podado sináptico que ocurre durante esta etapa. La disminución observada en la conectividad podría deberse a un podado sináptico exacerbado de la vía vHP-mPFC (van Eden & Uylings, 1985). Resulta importante mencionar la evidencia previa de que la lesión postnatal del vHP resulta en un modelo válido de esquizofrenia asociado al neurodesarrollo con alteraciones en comportamientos sociales (Sams-Dodd et al., 1997) y en tareas de memoria de trabajo espacial (Brady et al., 2010; Chambers et al., 1996). También es interesante destacar el trabajo de Phillips et al., (2018), que a través de la manipulación específica de la vía vHP-PFC logran revertir alteraciones en la memoria social de un modelo animal de autismo (*knock-out* del gen *Mecp2*, modelo de síndrome de Rett). Esto denota la importante influencia que ejercen los ritmos provenientes del vHP sobre las neuronas de la mPFC. Más aún, se ha visto en nuestro modelo que la mPFC es más susceptible a procesos plásticos de LTD luego de estimular el vHP.

En base a los resultados obtenidos en nuestros experimentos podemos proponer que en condiciones no patológicas, donde el circuito cortical de la mPFC y la vía vHP-mPFC se encuentran conservados, las neuronas corticales se reclutan de manera dinámica cubriendo una cantidad de recursos disponibles en pos de codificar el contexto. El vHP proveería de información espacial y emocional a la mPFC (Sigurdsson & Duvarci, 2016), lo que permite la elaboración de una representación compleja del contexto. Con esta idea en mente, nos proponemos realizar a futuro experimentos reduciendo la conectividad funcional de la vía HP-mPFC en animales CTRL, mediante la inducción de un protocolo de LTD, y evaluar cómo se ve afectada la sincronización entre ambas estructuras durante la realización de conductas exploratorias. Esperamos que los animales CTRL exhiban una disminución en el reclutamiento de neuronas corticales moduladas por el ritmo vHP durante las tareas de exploración con distinta carga contextual, similar al reclutamiento observado en los animales KO. Además, proponemos extender nuestro análisis estudiando cómo se modulan las neuronas GABAérgicas corticales (interneuronas) con los ritmos hipocampales y cómo estos se acoplan a los ritmos locales theta y gamma en la mPFC.

Finalmente, podemos regresar a las preguntas que planteamos al inicio de la discusión de esta tesis: **¿Cómo las neuronas de la mPFC participan en la codificación de la información contextual saliente durante la exploración?** En este sentido, proponemos que la mPFC es capaz de codificar la información contextual mediante la gestión de recursos neuronales limitados. Estos recursos se utilizan de manera dinámica para establecer una representación adecuada del contexto. Los elementos salientes que conforman este contexto son codificados por grupos neuronales específicos, manteniendo un reclutamiento poblacional estable. A su vez, el vHP proporciona información esencial a la mPFC, tanto en términos de información espacial como emocional, al modular la actividad de las neuronas corticales a través de los ritmos hipocampales. No obstante, la dinámica de codificación del contexto en la mPFC por sí sola no es suficiente para explicar una relación causal en el comportamiento observado. Es posible que la representación generada en la mPFC sustente de información a regiones subcorticales y participen en la ejecución de los comportamientos adaptativos. Por otro lado, nuestros resultados muestran que la representación de la información contextual se encuentra alterada en nuestro modelo animal de esquizofrenia. Frente a un aumento en la carga cognitiva asociada al contexto, los mutantes muestran un déficit en el reclutamiento de neuronas codificantes a nivel poblacional. Proponemos que dichas

alteraciones podrían deberse a la aparición de actividad espuria en la mPFC frente a la alta demanda cognitiva, posiblemente por alteraciones en el balance E/I a nivel celular.

CONCLUSIÓN general

Encontramos que la ablación selectiva de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA en las interneuronas GABAérgicas de la corteza e hipocampo, durante etapas tempranas del desarrollo, resulta en una pérdida del reclutamiento de neuronas piramidales de la mPFC capaces de codificar estímulos salientes, sin que se vea afectada la capacidad de codificación a nivel de las neuronas individuales. Esto tendría lugar exclusivamente en ocasiones donde la demanda cognitiva es relativamente alta. Esta alteración funcional de la red cortical podría explicar algunos de los fenotipos conductuales compatibles con la esquizofrenia presentes en este modelo murino.

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, K. M., Drake, R., & Goldstein, J. M. (2010). Sex differences in schizophrenia. *International Review of Psychiatry (Abingdon, England)*, 22(5), 417-428. <https://doi.org/10.3109/09540261.2010.515205>
- Adhikari, A., Topiwala, M. A., & Gordon, J. A. (2010). Synchronized Activity between the Ventral Hippocampus and the Medial Prefrontal Cortex during Anxiety. *Neuron*, 65(2), 257-269. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.002>
- Adolphs, R. (2009). The social brain: Neural basis of social knowledge. *Annual Review of Psychology*, 60, 693-716. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.60.110707.163514>
- Agid, O., Kohn, Y., & Lerer, B. (2000). Environmental stress and psychiatric illness. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 54(3), 135-141. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(00\)89046-0](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(00)89046-0)
- Agorastos, A., Pervanidou, P., Chrousos, G. P., & Baker, D. G. (2019). Developmental Trajectories of Early Life Stress and Trauma: A Narrative Review on Neurobiological Aspects Beyond Stress System Dysregulation. *Frontiers in Psychiatry*, 10, 118. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00118>
- Akbarian, S. (1995). Gene Expression for Glutamic Acid Decarboxylase Is Reduced Without Loss of Neurons in Prefrontal Cortex of Schizophrenics. *Archives of General Psychiatry*, 52(4), 258. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1995.03950160008002>
- Alexander, G. E., & Goldman, P. S. (1978). Functional development of the dorsolateral prefrontal cortex: An analysis utilizing reversible cryogenic depression. *Brain Research*, 143(2), 233-249. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90566-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90566-8)
- Alvarez, R. J., Pafundo, D. E., Zold, C. L., & Belforte, J. E. (2020). Interneuron NMDA Receptor Ablation Induces Hippocampus-Prefrontal Cortex Functional Hypoconnectivity after Adolescence in a Mouse Model of Schizophrenia. *The Journal of Neuroscience*, 40(16), 3304-3317. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1897-19.2020>
- Anastasiades, P. G., & Carter, A. G. (2021). Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex. *Trends in Neurosciences*, 44(7), 550-563. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.03.006>
- Andreasen, N. C. (1979). Thought, language, and communication disorders. I. Clinical assessment, definition of terms, and evaluation of their reliability. *Archives of General Psychiatry*, 36(12), 1315-1321. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1979.01780120045006>
- Andreasen, N. C., & Carpenter, W. T. (1993). Diagnosis and classification of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 19(2), 199-214. <https://doi.org/10.1093/schbul/19.2.199>

- Andreasen, N. C., O'Leary, D. S., Cizadlo, T., Arndt, S., Rezai, K., Ponto, L. L., Watkins, G. L., & Hichwa, R. D. (1996). Schizophrenia and cognitive dysmetria: A positron-emission tomography study of dysfunctional prefrontal-thalamic-cerebellar circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(18), 9985-9990. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9985>
- Angrist, B., Sathananthan, G., Wilk, S., & Gershon, S. (1975). AMPHETAMINE PSYCHOSIS: BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS**This work was supported by USPHS Grant MH 04669. En S. W. Matthysse & S. S. Kety (Eds.), *Catecholamines and Schizophrenia* (pp. 13-23). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-018242-1.50009-X>
- Arango, C., Buchanan, R. W., Kirkpatrick, B., & Carpenter, W. T. (2004). The deficit syndrome in schizophrenia: Implications for the treatment of negative symptoms. *European Psychiatry*, *19*(1), 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2003.10.004>
- 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), 95. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.94660>
- Bähner, F., Demanuele, C., Schweiger, J., Gerchen, M. F., Zamoscik, V., Ueltzhöffer, K., Hahn, T., Meyer, P., Flor, H., Durstewitz, D., Tost, H., Kirsch, P., Plichta, M. M., & Meyer-Lindenberg, A. (2015). Hippocampal–Dorsolateral Prefrontal Coupling as a Species-Conserved Cognitive Mechanism: A Human Translational Imaging Study. *Neuropsychopharmacology*, *40*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.13>
- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N. P., McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W.-N., Pothuizen, H. H. J., & Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus—Memory and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *28*(3), 273-283. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.004>
- Barbas, H., & Blatt, G. J. (1995). Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus*, *5*(6), 511-533. <https://doi.org/10.1002/hipo.450050604>
- Barthó, P., Hirase, H., Monconduit, L., Zugaro, M., Harris, K. D., & Buzsáki, G. (2004). Characterization of Neocortical Principal Cells and Interneurons by Network Interactions and Extracellular Features. *Journal of Neurophysiology*, *92*(1), 600-608. <https://doi.org/10.1152/jn.01170.2003>
- Bartos, M., Vida, I., & Jonas, P. (2007). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrn2044>
- Bayer, T. A., Falkai, P., & Maier, W. (1999). Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: The basis of the «two hit hypothesis». *Journal of Psychiatric Research*, *33*(6), 543-548. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(99\)00039-4](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(99)00039-4)
- Belforte, J. E., & Nakazawa, K. (2011). Genetically Engineered Mice for Schizophrenia Research. En P. O'Donnell (Ed.), *Animal Models of Schizophrenia and Related Disorders* (Vol. 59, pp. 231-242). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-157-4_10

- Belforte, J. E., Zsiros, V., Sklar, E. R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., Quinlan, E. M., & Nakazawa, K. (2010). Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature Neuroscience*, *13*(1), 76-83. <https://doi.org/10.1038/nn.2447>
- Bender, F., Gorbati, M., Cadavieco, M. C., Denisova, N., Gao, X., Holman, C., Korotkova, T., & Ponomarenko, A. (2015). Theta oscillations regulate the speed of locomotion via a hippocampus to lateral septum pathway. *Nature Communications*, *6*, 8521. <https://doi.org/10.1038/ncomms9521>
- Berrios, G. E. (1985). Positive and negative symptoms and Jackson. A conceptual history. *Archives of General Psychiatry*, *42*(1), 95-97. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1985.01790240097011>
- Boivin, J. R., & Nedivi, E. (2018). Functional implications of inhibitory synapse placement on signal processing in pyramidal neuron dendrites. *Current Opinion in Neurobiology*, *51*, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.01.013>
- Brady, A. M., Saul, R. D., & Wiest, M. K. (2010). Selective deficits in spatial working memory in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of schizophrenia. *Neuropharmacology*, *59*(7-8), 605-611. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.08.012>
- Brown, A. S. (2011). The environment and susceptibility to schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, *93*(1), 23-58. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.09.003>
- Brown, V. J., & Bowman, E. M. (2002). Rodent models of prefrontal cortical function. *Trends in Neurosciences*, *25*(7), 340-343. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02164-1](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02164-1)
- Buzsáki, G. (2002). Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron*, *33*(3), 325-340. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00586-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00586-X)
- Buzsáki, G. (2004). Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, *7*(5), 446-451. <https://doi.org/10.1038/nn1233>
- Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience*, *16*(2), 130-138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>
- Bygrave, A. M., Jahans-Price, T., Wolff, A. R., Sprengel, R., Kullmann, D. M., Bannerman, D. M., & Kätzel, D. (2019). Hippocampal–prefrontal coherence mediates working memory and selective attention at distinct frequency bands and provides a causal link between schizophrenia and its risk gene GRIA1. *Translational Psychiatry*, *9*(1), 142. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0471-0>
- Bygrave, A. M., Kilonzo, K., Kullmann, D. M., Bannerman, D. M., & Kätzel, D. (2019). Can N-Methyl-D-Aspartate Receptor Hypofunction in Schizophrenia Be Localized to an Individual Cell Type? *Frontiers in Psychiatry*, *10*, 835. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00835>

- Caballero, A., & Tseng, K. Y. (2016). GABAergic Function as a Limiting Factor for Prefrontal Maturation during Adolescence. *Trends in Neurosciences*, 39(7), 441-448. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.04.010>
- Canetta, S., & Kellendonk, C. (2018). Can we use mice to study schizophrenia? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 373(1742), 20170032. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0032>
- Cannon, T. D., Thompson, P. M., van Erp, T. G. M., Toga, A. W., Poutanen, V.-P., Huttunen, M., Lonnqvist, J., Standerskjold-Nordenstam, C.-G., Narr, K. L., Khaledy, M., Zoumalan, C. I., Dail, R., & Kaprio, J. (2002). Cortex mapping reveals regionally specific patterns of genetic and disease-specific gray-matter deficits in twins discordant for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 3228-3233. <https://doi.org/10.1073/pnas.052023499>
- Cardin, J. A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H., & Moore, C. I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, 459(7247), 663-667. <https://doi.org/10.1038/nature08002>
- Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex? *Science (New York, N.Y.)*, 358(6362), 478-482. <https://doi.org/10.1126/science.aan8868>
- Carlén, M., Meletis, K., Siegle, J. H., Cardin, J. A., Futai, K., Vierling-Claassen, D., Rühlmann, C., Jones, S. R., Deisseroth, K., Sheng, M., Moore, C. I., & Tsai, L.-H. (2012). A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior. *Molecular Psychiatry*, 17(5), 537-548. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.31>
- Carlsson, A. (1974). Antipsychotic drugs and catecholamine synapses. *Journal of Psychiatric Research*, 11, 57-64. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(74\)90070-3](https://doi.org/10.1016/0022-3956(74)90070-3)
- Carlsson, A., Lindqvist, M., & Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature*, 180(4596), Article 4596. <https://doi.org/10.1038/1801200a0>
- Carpenter, W. T., Heinrichs, D. W., & Wagman, A. M. (1988). Deficit and nondeficit forms of schizophrenia: The concept. *The American Journal of Psychiatry*, 145(5), 578-583. <https://doi.org/10.1176/ajp.145.5.578>
- Carpenter, W. T., Jr., Strauss, J. S., & Bartko, J. J. (1974). Part I. Use of Signs and Symptoms for the Identification of Schizophrenic Patients. *Schizophrenia Bulletin*, 1(11), 37-49. <https://doi.org/10.1093/schbul/1.11.37>
- Caspi, A., Reichenberg, A., Weiser, M., Rabinowitz, J., Kaplan, Z., Knobler, H., Davidson-Sagi, N., & Davidson, M. (2003). Cognitive performance in schizophrenia patients assessed before and following the first psychotic episode. *Schizophrenia Research*, 65(2-3), 87-94. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(03\)00056-2](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(03)00056-2)
- Chambers, R. A., Moore, J., McEvoy, J. P., & Levin, E. D. (1996). Cognitive effects of neonatal hippocampal lesions in a rat model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 15(6), 587-594. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(96\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(96)00132-7)

- Cho, R. Y., Konecky, R. O., & Carter, C. S. (2006). Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(52), 19878-19883. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609440103>
- Chudasama, Y. (2011). Animal models of prefrontal-executive function. *Behavioral Neuroscience*, *125*(3), 327-343. <https://doi.org/10.1037/a0023766>
- Chung, D. W., Fish, K. N., & Lewis, D. A. (2016). Pathological Basis for Deficient Excitatory Drive to Cortical Parvalbumin Interneurons in Schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, *173*(11), 1131-1139. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2016.16010025>
- Chung, D. W., Wills, Z. P., Fish, K. N., & Lewis, D. A. (2017). Developmental pruning of excitatory synaptic inputs to parvalbumin interneurons in monkey prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(4), E629-E637. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610077114>
- Cloutier, M., Aigbogun, M. S., Guerin, A., Nitulescu, R., Ramanakumar, A. V., Kamat, S. A., DeLucia, M., Duffy, R., Legacy, S. N., Henderson, C., Francois, C., & Wu, E. (2016). The Economic Burden of Schizophrenia in the United States in 2013. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *77*(6), 764-771. <https://doi.org/10.4088/JCP.15m10278>
- Cochran, S. M., Kennedy, M., McKerchar, C. E., Steward, L. J., Pratt, J. A., & Morris, B. J. (2003). Induction of Metabolic Hypofunction and Neurochemical Deficits after Chronic Intermittent Exposure to Phencyclidine: Differential Modulation by Antipsychotic Drugs. *Neuropsychopharmacology*, *28*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300031>
- Condé, F., Maire-lepoivre, E., Audinat, E., & Crépel, F. (1995). Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents: AFFERENT OF MEDIAL FRONTAL CORTEX. *Journal of Comparative Neurology*, *352*(4), 567-593. <https://doi.org/10.1002/cne.903520407>
- Constantinidis, C., Funahashi, S., Lee, D., Murray, J. D., Qi, X.-L., Wang, M., & Arnsten, A. F. T. (2018). Persistent Spiking Activity Underlies Working Memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *38*(32), 7020-7028. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2486-17.2018>
- Corrales, A., Vilapriño Duprat, M., Benavente Pinto, C., Garay, C., Corral, R., Gargoloff, P. R., Goldchluk, A., Hönig, G., Jufe, G., Lamaison, F., Leiderman, E. A., Morra, C., Rebok, F., & Gargoloff, P. D. (2021). [Argentine consensus on the diagnosis and therapeutics of treatment resistant schizophrenia]. *Vertex (Buenos Aires, Argentina)*, *XXXII*(154), 49-85. <https://doi.org/10.53680/vertex.v32i154.119>
- Crawley, J. N. (2004). Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, *10*(4), 248-258. <https://doi.org/10.1002/mrdd.20039>
- Crow, T. J. (1980). Molecular pathology of schizophrenia: More than one disease process? *British Medical Journal*, *280*(6207), 66-68.

- Crow, T. J. (1985). The Two-syndrome Concept: Origins and Current Status. *Schizophrenia Bulletin*, 11(3), 471-488. <https://doi.org/10.1093/schbul/11.3.471>
- Davis, K. L., Kahn, R. S., Ko, G., & Davidson, M. (1991). Dopamine in schizophrenia: A review and reconceptualization. *The American Journal of Psychiatry*, 148(11), 1474-1486. <https://doi.org/10.1176/ajp.148.11.1474>
- DeFelipe, J., & Fariñas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology*, 39(6), 563-607. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(92\)90015-7](https://doi.org/10.1016/0301-0082(92)90015-7)
- Donato, F., Rompani, S. B., & Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature*, 504(7479), 272-276. <https://doi.org/10.1038/nature12866>
- Enric J., N., & Rafael, H. (2010). El síndrome de Kraepelin-Bleuler-Schneider y la conciencia moderna: Una aproximación a la historia de la esquizofrenia. *Clínica y Salud*, 21(3), 205-219. <https://doi.org/10.5093/cl2010v21n3a1>
- Enwright, J. F., Sanapala, S., Foglio, A., Berry, R., Fish, K. N., & Lewis, D. A. (2016). Reduced Labeling of Parvalbumin Neurons and Perineuronal Nets in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(9), 2206-2214. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.24>
- Euston, D. R., Gruber, A. J., & McNaughton, B. L. (2012). The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron*, 76(6), 1057-1070. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002>
- Ewald, R. C., & Cline, H. T. (2009). NMDA Receptors and Brain Development. En A. M. Van Dongen (Ed.), *Biology of the NMDA Receptor*. CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5287/>
- Falkai, P., Rossner, M. J., Schulze, T. G., Hasan, A., Brzózka, M. M., Malchow, B., Honer, W. G., & Schmitt, A. (2015). Kraepelin revisited: Schizophrenia from degeneration to failed regeneration. *Molecular Psychiatry*, 20(6), 671-676. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.35>
- Frankland, P. W., Bontempi, B., Talton, L. E., Kaczmarek, L., & Silva, A. J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5672), 881-883. <https://doi.org/10.1126/science.1094804>
- Freund, T. F., & Katona, I. (2007). Perisomatic Inhibition. *Neuron*, 56(1), 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.012>
- Frost, N. A., Haggart, A., & Sohal, V. S. (2021). Dynamic patterns of correlated activity in the prefrontal cortex encode information about social behavior. *PLOS Biology*, 19(5), e3001235. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001235>
- Fujisawa, S., & Buzsáki, G. (2011). A 4 Hz Oscillation Adaptively Synchronizes Prefrontal, VTA, and Hippocampal Activities. *Neuron*, 72(1), 153-165. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.018>

- Fuster, J. M. (2000). Prefrontal neurons in networks of executive memory. *Brain Research Bulletin*, 52(5), 331-336. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(99\)00258-0](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(99)00258-0)
- Galletly, C. A., McFarlane, A. C., & Clark, C. R. (2007). Impaired updating of working memory in schizophrenia. *International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 63(3), 265-274. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2006.11.004>
- Glahn, D. C., Therman, S., Manninen, M., Huttunen, M., Kaprio, J., Lönnqvist, J., & Cannon, T. D. (2003). Spatial working memory as an endophenotype for schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 53(7), 624-626. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01641-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01641-4)
- Glantz, L. A., Gilmore, J. H., Lieberman, J. A., & Jarskog, L. F. (2006). Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 81(1), 47-63. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2005.08.014>
- Godsil, B. P., Kiss, J. P., Spedding, M., & Jay, T. M. (2013). The hippocampal–prefrontal pathway: The weak link in psychiatric disorders? *European Neuropsychopharmacology*, 23(10), 1165-1181. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.10.018>
- Goldman-Rakic, P. S. (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron*, 14(3), 477-485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90304-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90304-6)
- Gonchar, Y., Wang, Q., & Burkhalter, A. (2008). Multiple Distinct Subtypes of GABAergic Neurons in Mouse Visual Cortex Identified by Triple Immunostaining. *Frontiers in Neuroanatomy*, 1, 3. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.003.2007>
- Good, K. (2004). The relationship of neuropsychological test performance with the PANSS in antipsychotic naïve, first-episode psychosis patients. *Schizophrenia Research*, 68(1), 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2003.07.001>
- Gordon, J. A. (2011). Oscillations and hippocampal–prefrontal synchrony. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(3), 486-491. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.02.012>
- Gould, T. D., & Gottesman, I. I. (2006). Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. *Genes, Brain, and Behavior*, 5(2), 113-119. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00186.x>
- Gray, C. M., Maldonado, P. E., Wilson, M., & McNaughton, B. (1995). Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-unit recordings in cat striate cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 63(1-2), 43-54. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00085-2](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00085-2)
- Green, M. F., Horan, W. P., & Lee, J. (2015). Social cognition in schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrn4005>
- Grossmann, T. (2013). The role of medial prefrontal cortex in early social cognition. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7, 340. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00340>
- Guerrin, C. G. J., Doorduyn, J., Sommer, I. E., & de Vries, E. F. J. (2021). The dual hit hypothesis of schizophrenia: Evidence from animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 131, 1150-1168. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.10.025>

- Häfner, H. (2014). The Concept of Schizophrenia: From Unity to Diversity. *Advances in Psychiatry*, 2014, e929434. <https://doi.org/10.1155/2014/929434>
- 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), 26-34. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1614.2000.00685.x>
- Harrison, P. J., & Weinberger, D. R. (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: On the matter of their convergence. *Molecular Psychiatry*, 10(1), 40-68; image 5. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001558>
- Harvey, P. D., Docherty, N. M., Serper, M. R., & Rasmussen, M. (1990). Cognitive deficits and thought disorder: II. An 8-month followup study. *Schizophrenia Bulletin*, 16(1), 147-156. <https://doi.org/10.1093/schbul/16.1.147>
- 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), 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.01.017>
- Henriksen, M. G., Nordgaard, J., & Jansson, L. B. (2017). Genetics of Schizophrenia: Overview of Methods, Findings and Limitations. *Frontiers in Human Neuroscience*, 11, 322. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00322>
- Hoff, P. (2012). Eugen Bleuler's concept of schizophrenia and its relevance to present-day psychiatry. *Neuropsychobiology*, 66(1), 6-13. <https://doi.org/10.1159/000337174>
- Hok, V., Save, E., Lenck-Santini, P. P., & Poucet, B. (2005). Coding for spatial goals in the prelimbic/infralimbic area of the rat frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(12), 4602-4607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407332102>
- Holroyd, C. B., Coles, M. G. H., & Nieuwenhuis, S. (2002). Medial Prefrontal Cortex and Error Potentials. *Science*, 296(5573), 1610-1611. <https://doi.org/10.1126/science.296.5573.1610>
- Homayoun, H., & Moghaddam, B. (2007). NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(43), 11496-11500. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2213-07.2007>
- 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), 149-179. <https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>
- Howard, M. W., Rizzuto, D. S., Caplan, J. B., Madsen, J. R., Lisman, J., Aschenbrenner-Scheibe, R., Schulze-Bonhage, A., & Kahana, M. J. (2003). Gamma oscillations correlate with working memory load in humans. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 13(12), 1369-1374. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhg084>
- Howes, O. D., & Kapur, S. (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III--the final common pathway. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 549-562. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp006>

- Hu, H., Gan, J., & Jonas, P. (2014). Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin⁺ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6196), 1255263. <https://doi.org/10.1126/science.1255263>
- Hu, W., MacDonald, M. L., Elswick, D. E., & Sweet, R. A. (2015). The glutamate hypothesis of schizophrenia: Evidence from human brain tissue studies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1338(1), 38-57. <https://doi.org/10.1111/nyas.12547>
- Hulshoff Pol, H. E., Hoek, H. W., Susser, E., Brown, A. S., Dingemans, A., Schnack, H. G., van Haren, N. E. M., Pereira Ramos, L. M., Gispens-de Wied, C. C., & Kahn, R. S. (2000). Prenatal Exposure to Famine and Brain Morphology in Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 157(7), 1170-1172. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.7.1170>
- Hyman, J. M., Ma, L., Balaguer-Ballester, E., Durstewitz, D., & Seamans, J. K. (2012). Contextual encoding by ensembles of medial prefrontal cortex neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(13), 5086-5091. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114415109>
- Jablensky, A. (1997). The 100-year epidemiology of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 28(2-3), 111-125. [https://doi.org/10.1016/s0920-9964\(97\)85354-6](https://doi.org/10.1016/s0920-9964(97)85354-6)
- Javitt, D. C., & Zukin, S. R. (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, 148(10), 1301-1308. <https://doi.org/10.1176/ajp.148.10.1301>
- Jensen, O., Kaiser, J., & Lachaux, J.-P. (2007). Human gamma-frequency oscillations associated with attention and memory. *Trends in Neurosciences*, 30(7), 317-324. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.05.001>
- Jiang, Z., Rompala, G. R., Zhang, S., Cowell, R. M., & Nakazawa, K. (2013). Social Isolation Exacerbates Schizophrenia-like Phenotypes via Oxidative Stress in Cortical Interneurons. *Biological psychiatry*, 73(10), 1024-1034. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.12.004>
- Jones, M. W., & Wilson, M. A. (2005). Theta Rhythms Coordinate Hippocampal–Prefrontal Interactions in a Spatial Memory Task. *PLoS Biology*, 3(12), e402. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030402>
- Keefe, R. S. E., Bilder, R. M., Davis, S. M., Harvey, P. D., Palmer, B. W., Gold, J. M., Meltzer, H. Y., Green, M. F., Capuano, G., Stroup, T. S., McEvoy, J. P., Swartz, M. S., Rosenheck, R. A., Perkins, D. O., Davis, C. E., Hsiao, J. K., Lieberman, J. A., CATIE Investigators, & Neurocognitive Working Group. (2007). Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Archives of General Psychiatry*, 64(6), 633-647. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.6.633>
- Kendler, K. S., & Mishara, A. (2019). The Prehistory of Schneider's First-Rank Symptoms: Texts From 1810 to 1932. *Schizophrenia Bulletin*, 45(5), 971-990. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbz047>
- Kesner, R. P., & Churchwell, J. C. (2011). An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(3), 417-431. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.07.002>

- Kirkpatrick, B., Buchanan, R. W., Ross, D. E., & Carpenter, W. T. (2001). A separate disease within the syndrome of schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, *58*(2), 165-171. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.2.165>
- Kirkpatrick, B., Fenton, W. S., Carpenter, W. T., & Marder, S. R. (2006). The NIMH-MATRICES Consensus Statement on Negative Symptoms. *Schizophrenia Bulletin*, *32*(2), 214-219. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbj053>
- Kjelstrup, K. G., Tuvnes, F. A., Steffenach, H.-A., Murison, R., Moser, E. I., & Moser, M.-B. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(16), 10825-10830. <https://doi.org/10.1073/pnas.152112399>
- Klingberg, S., Schneider, S., Wittorf, A., Buchkremer, G., & Wiedemann, G. (2008). Collaboration in outpatient antipsychotic drug treatment: Analysis of potentially influencing factors. *Psychiatry Research*, *161*(2), 225-234. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2007.07.027>
- Koechlin, E. (2016). Prefrontal executive function and adaptive behavior in complex environments. *Current Opinion in Neurobiology*, *37*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.11.004>
- Kolb, B. (1984). Functions of the frontal cortex of the rat: A comparative review. *Brain Research*, *320*(1), 65-98. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(84\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0165-0173(84)90018-3)
- Korotkova, T., Fuchs, E. C., 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), 557-569. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.017>
- Krystal, J. H., Karper, L. P., Seibyl, J. P., Freeman, G. K., Delaney, R., Bremner, J. D., Heninger, G. R., Bowers, M. B., & Charney, D. S. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of General Psychiatry*, *51*(3), 199-214. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1994.03950030035004>
- Lahti, A. C., Koffel, B., LaPorte, D., & Tamminga, C. A. (1995). Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *13*(1), 9-19. [https://doi.org/10.1016/0893-133X\(94\)00131-I](https://doi.org/10.1016/0893-133X(94)00131-I)
- Lally, J., & MacCabe, J. H. (2015). Antipsychotic medication in schizophrenia: A review. *British Medical Bulletin*, *114*(1), 169-179. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv017>
- Lalonde, R. (2002). The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *26*(1), 91-104. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00041-0](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00041-0)
- Laruelle, M., Abi-Dargham, A., van Dyck, C. H., Gil, R., D'Souza, C. D., Erdos, J., McCance, E., Rosenblatt, W., Fingado, C., Zoghbi, S. S., Baldwin, R. M., Seibyl, J. P., Krystal, J. H., Charney, D. S., & Innis, R. B. (1996). Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(17), 9235-9240.

- Laursen, T. M., Nordentoft, M., & Mortensen, P. B. (2014). Excess early mortality in schizophrenia. *Annual Review of Clinical Psychology*, *10*, 425-448. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032813-153657>
- Le Merre, P., Ährlund-Richter, S., & Carlén, M. (2021). The mouse prefrontal cortex: Unity in diversity. *Neuron*, *109*(12), 1925-1944. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.03.035>
- Lee, E., Rhim, I., Lee, J. W., Ghim, J.-W., Lee, S., Kim, E., & Jung, M. W. (2016). Enhanced Neuronal Activity in the Medial Prefrontal Cortex during Social Approach Behavior. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *36*(26), 6926-6936. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0307-16.2016>
- Lee, G., & Zhou, Y. (2019). NMDAR Hypofunction Animal Models of Schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2019.00185>
- Leon, J. de, Cuesta, M. J., & Peralta, V. (1993). Delusions and Hallucinations in Schizophrenic Patients. *Psychopathology*, *26*(5-6), 286-291. <https://doi.org/10.1159/000284835>
- Levin, E. by H. S., Eisenberg, H. M., & Benton, and A. L. (Eds.). (1991). *Frontal Lobe Function and Dysfunction*. Oxford University Press.
- Levy, D. R., Tamir, T., Kaufman, M., Parabucki, A., Weissbrod, A., Schneidman, E., & Yizhar, O. (2019). Dynamics of social representation in the mouse prefrontal cortex. *Nature Neuroscience*, *22*(12), 2013-2022. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0531-z>
- Lieberman, J. A., Kane, J. M., & Alvir, J. (1987). Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology*, *91*(4), 415-433. <https://doi.org/10.1007/BF00216006>
- Lipska, B. K., & Weinberger, D. R. (2000). To model a psychiatric disorder in animals: Schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *23*(3), 223-239. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00137-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00137-8)
- Liu, D., Gu, X., Zhu, J., Zhang, X., Han, Z., Yan, W., Cheng, Q., Hao, J., Fan, H., Hou, R., Chen, Z., Chen, Y., & Li, C. T. (2014). Medial prefrontal activity during delay period contributes to learning of a working memory task. *Science (New York, N.Y.)*, *346*(6208), 458-463. <https://doi.org/10.1126/science.1256573>
- Lodge, D., & Anis, N. A. (1982). Effects of phencyclidine on excitatory amino acid activation of spinal interneurons in the cat. *European Journal of Pharmacology*, *77*(2-3), 203-204. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(82\)90022-x](https://doi.org/10.1016/0014-2999(82)90022-x)
- Lu, J., Tucciarone, J., Lin, Y., & Huang, Z. J. (2014). Input-specific maturation of synaptic dynamics of parvalbumin interneurons in primary visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(47), 16895-16900. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400694111>
- Lu, L., Ren, Y., Yu, T., Liu, Z., Wang, S., Tan, L., Zeng, J., Feng, Q., Lin, R., Liu, Y., Guo, Q., & Luo, M. (2020). Control of locomotor speed, arousal, and hippocampal theta rhythms by the nucleus incertus. *Nature Communications*, *11*, 262. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14116-y>

- Luby, E. D., Cohen, B. D., Rosenbaum, G., Gottlieb, J. S., & Kelley, R. (1959). Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. *A.M.A. Archives of Neurology and Psychiatry*, *81*(3), 363-369. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1959.02340150095011>
- Lundqvist, M., Herman, P., & Miller, E. K. (2018). Working Memory: Delay Activity, Yes! Persistent Activity? Maybe Not. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *38*(32), 7013-7019. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2485-17.2018>
- Madras, B. K. (2013). History of the discovery of the antipsychotic dopamine D2 receptor: A basis for the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Journal of the History of the Neurosciences*, *22*(1), 62-78. <https://doi.org/10.1080/0964704X.2012.678199>
- Mansouri, F. A., Koechlin, E., Rosa, M. G. P., & Buckley, M. J. (2017). Managing competing goals—A key role for the frontopolar cortex. *Nature Reviews. Neuroscience*, *18*(11), 645-657. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.111>
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews. Neuroscience*, *5*(10), 793-807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>
- Marneros, A., Deister, A., & Rohde, A. (1991). Stability of diagnoses in affective, schizoaffective and schizophrenic disorders. Cross-sectional versus longitudinal diagnosis. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *241*(3), 187-192. <https://doi.org/10.1007/BF02219720>
- Matthysse, S. (1973). Antipsychotic drug actions: A clue to the neuropathology of schizophrenia? *Federation Proceedings*, *32*(2), 200-205.
- Maynard, T. M., Sikich, L., Lieberman, J. A., & LaMantia, A. S. (2001). Neural development, cell-cell signaling, and the «two-hit» hypothesis of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *27*(3), 457-476. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a006887>
- McFarland, W. L., Teitelbaum, H., & Hedges, E. K. (1975). Relationship between hippocampal theta activity and running speed in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *88*(1), 324-328. <https://doi.org/10.1037/h0076177>
- McGrath, J., Saha, S., Welham, J., El Saadi, O., MacCauley, C., & Chant, D. (2004). A systematic review of the incidence of schizophrenia: The distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Medicine*, *2*, 13. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-2-13>
- Meyer, U., & Feldon, J. (2010). Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, *90*(3), 285-326. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.10.018>
- Meyer-Lindenberg, A. S., Olsen, R. K., Kohn, P. D., Brown, T., Egan, M. F., Weinberger, D. R., & Berman, K. F. (2005). Regionally Specific Disturbance of Dorsolateral Prefrontal–Hippocampal Functional Connectivity in Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, *62*(4), 379. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.4.379>

- Miller, E. K., & Cohen, J. D. (2001). An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 167-202. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
- Mishara, A. L., & Fusar-Poli, P. (2013). The Phenomenology and Neurobiology of Delusion Formation During Psychosis Onset: Jaspers, Truman Symptoms, and Aberrant Salience. *Schizophrenia Bulletin*, 39(2), 278-286. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs155>
- Mizrahi, R., Kenk, M., Suridjan, I., Boileau, I., George, T. P., McKenzie, K., Wilson, A. A., Houle, S., & Rusjan, P. (2014). Stress-induced dopamine response in subjects at clinical high risk for schizophrenia with and without concurrent cannabis use. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(6), 1479-1489. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.347>
- Moghaddam, B., Adams, B., Verma, A., & Daly, D. (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), 2921-2927. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-08-02921.1997>
- Mohn, A. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., & Koller, B. H. (1999). Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, 98(4), 427-436. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81972-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81972-8)
- 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), 283-290. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0708-0>
- Murugan, M., Jang, H. J., Park, M., Miller, E. M., Cox, J., Taliaferro, J. P., Parker, N. F., Bhave, V., Hur, H., Liang, Y., Nectow, A. R., Pillow, J. W., & Witten, I. B. (2017). Combined Social and Spatial Coding in a Descending Projection from the Prefrontal Cortex. *Cell*, 171(7), 1663-1677.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.002>
- Nahar, L., Delacroix, B. M., & Nam, H. W. (2021). The Role of Parvalbumin Interneurons in Neurotransmitter Balance and Neurological Disease. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 679960. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.679960>
- Nakao, K., Jeevakumar, V., Jiang, S. Z., Fujita, Y., Diaz, N. B., Pretell Annan, C. A., Eskow Jaunarajs, K. L., Hashimoto, K., Belforte, J. E., & Nakazawa, K. (2019). Schizophrenia-Like Dopamine Release Abnormalities in a Mouse Model of NMDA Receptor Hypofunction. *Schizophrenia Bulletin*, 45(1), 138-147. <https://doi.org/10.1093/schbul/sby003>
- Nakazawa, K., Jeevakumar, V., & Nakao, K. (2017). Spatial and temporal boundaries of NMDA receptor hypofunction leading to schizophrenia. *Npj Schizophrenia*, 3(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41537-016-0003-3>
- Nakazawa, K., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Kolata, S., Zhang, S., & Belforte, J. E. (2012). GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology*, 62(3), 1574-1583. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.022>
- O'Keefe, J., & Recce, M. L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, 3(3), 317-330. <https://doi.org/10.1002/hipo.450030307>

- Olney, J. W. (1989). Glutamate, a neurotoxic transmitter. *Journal of Child Neurology*, 4(3), 218-226. <https://doi.org/10.1177/088307388900400315>
- Olney, J. W., & Farber, N. B. (1995). Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 52(12), 998-1007. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1995.03950240016004>
- O'Neill, P.-K., Gordon, J. A., & Sigurdsson, T. (2013). Theta oscillations in the medial prefrontal cortex are modulated by spatial working memory and synchronize with the hippocampus through its ventral subregion. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(35), 14211-14224. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2378-13.2013>
- Owen, M. J., Sawa, A., & Mortensen, P. B. (2016). Schizophrenia. *The Lancet*, 388(10039), 86-97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01121-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01121-6)
- Padilla-Coreano, N., Bolkan, S. S., Pierce, G. M., Blackman, D. R., Hardin, W. D., Garcia-Garcia, A. L., Spellman, T. J., & Gordon, J. A. (2016). Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. *Neuron*, 89(4), 857-866. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.011>
- Pafundo, D. E., Pretell Annan, C. A., Fulginiti, N. M., & Belforte, J. E. (2021). Early NMDA Receptor Ablation in Interneurons Causes an Activity-Dependent E/I Imbalance in vivo in Prefrontal Cortex Pyramidal Neurons of a Mouse Model Useful for the Study of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 47(5), 1300-1309. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbab030>
- Paneri, S., & Gregoriou, G. G. (2017). Top-Down Control of Visual Attention by the Prefrontal Cortex. Functional Specialization and Long-Range Interactions. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 545. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00545>
- Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J.-E., & Woolfrey, K. M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 14(3), 285-293. <https://doi.org/10.1038/nn.2741>
- Phillips, M. L., Robinson, H. A., & Pozzo-Miller, L. (2018). *Ventral hippocampal projections to the medial prefrontal cortex regulate social memory* [Preprint]. Neuroscience. <https://doi.org/10.1101/461533>
- Pinkham, A. E. (2014). Social cognition in schizophrenia. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 75 Suppl 2, 14-19. <https://doi.org/10.4088/JCP.13065su1.04>
- Piskulic, D., Olver, J. S., Norman, T. R., & Maruff, P. (2007). Behavioural studies of spatial working memory dysfunction in schizophrenia: A quantitative literature review. *Psychiatry Research*, 150(2), 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2006.03.018>
- Pletnikov, M. V., & Ross, C. A. (2013). Mouse models of schizophrenia and bipolar disorder. En *Neurobiology of mental illness*, 4th ed (pp. 287-300). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/med/9780199934959.003.0022>

- Posner, M. I., Rothbart, M. K., Sheese, B. E., & Tang, Y. (2007). The anterior cingulate gyrus and the mechanism of self-regulation. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 7(4), 391-395. <https://doi.org/10.3758/CABN.7.4.391>
- Pouille, F., & Scanziani, M. (2001). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1159-1163. <https://doi.org/10.1126/science.1060342>
- Rice, J., Coutellier, L., Weiner, J. L., & Gu, C. (2019). Region-specific interneuron demyelination and heightened anxiety-like behavior induced by adolescent binge alcohol treatment. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0829-9>
- Rompala, G. R., Zsiros, V., Zhang, S., Kolata, S. M., & Nakazawa, K. (2013). Contribution of NMDA receptor hypofunction in prefrontal and cortical excitatory neurons to schizophrenia-like phenotypes. *PloS One*, 8(4), e61278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061278>
- Saha, S., Chant, D., Welham, J., & McGrath, J. (2005). A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Medicine*, 2(5), e141. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020141>
- Sakurai, T., & Gamo, N. J. (2019). Cognitive functions associated with developing prefrontal cortex during adolescence and developmental neuropsychiatric disorders. *Neurobiology of Disease*, 131, 104322. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.11.007>
- Sams-Dodd, F., Lipska, B. K., & Weinberger, D. R. (1997). Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology*, 132(3), 303-310. <https://doi.org/10.1007/s002130050349>
- Sanders, A. R., Duan, J., Levinson, D. F., Shi, J., He, D., Hou, C., Burrell, G. J., Rice, J. P., Nertney, D. A., Olincy, A., Rozig, P., Vinogradov, S., Buccola, N. G., Mowry, B. J., Freedman, R., Amin, F., Black, D. W., Silverman, J. M., Byerley, W. F., ... Gejman, P. V. (2008). No significant association of 14 candidate genes with schizophrenia in a large European ancestry sample: Implications for psychiatric genetics. *The American Journal of Psychiatry*, 165(4), 497-506. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.07101573>
- San-Martin, R., Castro, L. A., Menezes, P. R., Fraga, F. J., Simões, P. W., & Salum, C. (2020). Meta-Analysis of Sensorimotor Gating Deficits in Patients With Schizophrenia Evaluated by Prepulse Inhibition Test. *Schizophrenia Bulletin*, 46(6), 1482-1497. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbaa059>
- Sartorius, N., Shapiro, R., & Jablensky, A. (1974). The International Pilot Study of Schizophrenia*. *Schizophrenia Bulletin*, 1(11), 21-34. <https://doi.org/10.1093/schbul/1.11.21>
- Saunders, J. A., Morita, S., Featherstone, R. E., Ortinski, P. I., Gandal, M. J., Lin, R., Liang, Y., Gur, R. E., Carlson, G. C., Hahn, C.-G., & Siegel, S. J. (2014). Parvalbumin Cell Ablation of NMDA-R1 Causes Increased Resting Network Excitability with Associated Social and Self-Care Deficits. *Neuropsychopharmacology*, 39(7), 1603-1613. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.7>

- Schmack, K., Bosc, M., Ott, T., Sturgill, J. F., & Kepecs, A. (2021). Striatal dopamine mediates hallucination-like perception in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *372*(6537), eabf4740. <https://doi.org/10.1126/science.abf4740>
- Seeman, P. (1987). Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse (New York, N.Y.)*, *1*(2), 133-152. <https://doi.org/10.1002/syn.890010203>
- Sesack, S., & Carr, D. (2002). Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: Implications for schizophrenia. *Physiology & Behavior*, *77*(4-5), 513-517. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00931-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00931-9)
- Shergill, S. S., Brammer, M. J., Williams, S. C., Murray, R. M., & McGuire, P. K. (2000). Mapping auditory hallucinations in schizophrenia using functional magnetic resonance imaging. *Archives of General Psychiatry*, *57*(11), 1033-1038. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.11.1033>
- Shin, J. D., Tang, W., & Jadhav, S. P. (2019). Dynamics of Awake Hippocampal-Prefrontal Replay for Spatial Learning and Memory-Guided Decision Making. *Neuron*, *104*(6), 1110-1125.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.09.012>
- Shu, Y., Hasenstaub, A., & McCormick, D. A. (2003). Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature*, *423*(6937), 288-293. <https://doi.org/10.1038/nature01616>
- Siapas, A. G., Lubenov, E. V., & Wilson, M. A. (2005). Prefrontal Phase Locking to Hippocampal Theta Oscillations. *Neuron*, *46*(1), 141-151. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.02.028>
- Sigurdsson, T., & Duvarci, S. (2016). Hippocampal-Prefrontal Interactions in Cognition, Behavior and Psychiatric Disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00190>
- Sigurdsson, T., Stark, K. L., Karayiorgou, M., Gogos, J. A., & Gordon, J. A. (2010). Impaired hippocampal–prefrontal synchrony in a genetic mouse model of schizophrenia. *Nature*, *464*(7289), 763-767. <https://doi.org/10.1038/nature08855>
- Silbersweig, D. A., Stern, E., Frith, C., Cahill, C., Holmes, A., Grootenok, S., Seaward, J., McKenna, P., Chua, S. E., & Schnorr, L. (1995). A functional neuroanatomy of hallucinations in schizophrenia. *Nature*, *378*(6553), 176-179. <https://doi.org/10.1038/378176a0>
- Simon, A. E., Cattapan-Ludewig, K., Zmilacher, S., Arbach, D., Gruber, K., Dvorsky, D. N., Roth, B., Isler, E., Zimmer, A., & Umbricht, D. (2007). Cognitive Functioning in the Schizophrenia Prodrome. *Schizophrenia Bulletin*, *33*(3), 761-771. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbm018>
- Sławińska, U., & Kasicki, S. (1998). The frequency of rat's hippocampal theta rhythm is related to the speed of locomotion. *Brain Research*, *796*(1-2), 327-331. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00390-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00390-4)
- Smeland, O. B., Frei, O., Dale, A. M., & Andreassen, O. A. (2020). The polygenic architecture of schizophrenia—Rethinking pathogenesis and nosology. *Nature Reviews. Neurology*, *16*(7), 366-379. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0364-0>

- Smigielski, L., Jagannath, V., Rössler, W., Walitza, S., & Grünblatt, E. (2020). Epigenetic mechanisms in schizophrenia and other psychotic disorders: A systematic review of empirical human findings. *Molecular Psychiatry*, 25(8), 1718-1748. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0601-3>
- Snyder, M. A., & Gao, W.-J. (2013). NMDA hypofunction as a convergence point for progression and symptoms of schizophrenia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 31. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00031>
- Snyder, P. J., Jackson, C. E., Piskulic, D., Olver, J., Norman, T., & Maruff, P. (2008). Spatial working memory and problem solving in schizophrenia: The effect of symptom stabilization with atypical antipsychotic medication. *Psychiatry Research*, 160(3), 316-326. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2007.07.011>
- Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), 698-702. <https://doi.org/10.1038/nature07991>
- Soltani Zangbar, H., Ghadiri, T., Seyedi Vafae, M., Ebrahimi Kalan, A., Fallahi, S., Ghorbani, M., & Shahabi, P. (2020). Theta Oscillations Through Hippocampal/Prefrontal Pathway: Importance in Cognitive Performances. *Brain Connectivity*, 10(4), 157-169. <https://doi.org/10.1089/brain.2019.0733>
- Sotres-Bayon, F., Sierra-Mercado, D., Pardilla-Delgado, E., & Quirk, G. J. (2012). Gating of Fear in Prelimbic Cortex by Hippocampal and Amygdala Inputs. *Neuron*, 76(4), 804-812. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.028>
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(4), 417-463. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00014-2)
- Spellman, T., Rigotti, M., Ahmari, S. E., Fusi, S., Gogos, J. A., & Gordon, J. A. (2015). Hippocampal–prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature*, 522(7556), Article 7556. <https://doi.org/10.1038/nature14445>
- Spencer, K. M., Nestor, P. G., Perlmutter, R., Niznikiewicz, M. A., Klump, M. C., Frumin, M., Shenton, M. E., & McCarley, R. W. (2004). Neural synchrony indexes disordered perception and cognition in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17288-17293. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406074101>
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(3), 206-221. <https://doi.org/10.1038/nrn2286>
- Sullivan, P. F. (2007). Spurious genetic associations. *Biological Psychiatry*, 61(10), 1121-1126. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.11.010>

- Swerdlow, N. R., Light, G. A., Thomas, M. L., Sprock, J., Calkins, M. E., Green, M. F., Greenwood, T. A., Gur, R. E., Gur, R. C., Lazzeroni, L. C., Nuechterlein, K. H., Radant, A. D., Seidman, L. J., Siever, L. J., Silverman, J. M., Stone, W. S., Sugar, C. A., Tsuang, D. W., Tsuang, M. T., ... Braff, D. L. (2018). Deficient prepulse inhibition in schizophrenia in a multi-site cohort: Internal replication and extension. *Schizophrenia research*, *198*, 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.05.013>
- Takashima, A., Petersson, K. M., Rutters, F., Tendolkar, I., Jensen, O., Zwarts, M. J., McNaughton, B. L., & Fernández, G. (2006). Declarative memory consolidation in humans: A prospective functional magnetic resonance imaging study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(3), 756-761. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507774103>
- Tandon, R., Keshavan, M. S., & Nasrallah, H. A. (2008). Schizophrenia, «just the facts» what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophrenia Research*, *102*(1-3), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2008.04.011>
- Tandon, R., Nasrallah, H. A., & Keshavan, M. S. (2009). Schizophrenia, «just the facts» 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia Research*, *110*(1-3), 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2009.03.005>
- Tatard-Leitman, V. M., Jutzeler, C. R., Suh, J., Saunders, J. A., Billingslea, E. N., Morita, S., White, R., Featherstone, R. E., Ray, R., Ortinski, P. I., Banerjee, A., Gandal, M. J., Lin, R., Alexandrescu, A., Liang, Y., Gur, R. E., Borgmann-Winter, K. E., Carlson, G. C., Hahn, C.-G., & Siegel, S. J. (2015). Pyramidal cell selective ablation of N-methyl-D-aspartate receptor 1 causes increase in cellular and network excitability. *Biological Psychiatry*, *77*(6), 556-568. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.06.026>
- Thompson, L., Khuc, J., Sacconi, M. S., Zokaei, N., & Cappelletti, M. (2021). Gamma oscillations modulate working memory recall precision. *Experimental Brain Research*, *239*(9), 2711-2724. <https://doi.org/10.1007/s00221-021-06051-6>
- Thune, J. J., Uylings, H. B., & Pakkenberg, B. (2001). No deficit in total number of neurons in the prefrontal cortex in schizophrenics. *Journal of Psychiatric Research*, *35*(1), 15-21. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(00\)00043-1](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(00)00043-1)
- Tost, H., Bilek, E., & Meyer-Lindenberg, A. (2012). Brain connectivity in psychiatric imaging genetics. *NeuroImage*, *62*(4), 2250-2260. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.11.007>
- Tost, H., & Meyer-Lindenberg, A. (2012). Puzzling over schizophrenia: Schizophrenia, social environment and the brain. *Nature medicine*, *18*, 211-213. <https://doi.org/10.1038/nm.2671>
- Tremblay, R., Lee, S., & Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*, *91*(2), 260-292. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033>
- Tsuang, M. T., Gilbertson, M. W., & Faraone, S. V. (1991). The genetics of schizophrenia: Current knowledge and future directions. *Schizophrenia Research*, *4*(2), 157-171. [https://doi.org/10.1016/0920-9964\(91\)90031-L](https://doi.org/10.1016/0920-9964(91)90031-L)
- Uddin, L. Q. (2011). The self in autism: An emerging view from neuroimaging. *Neurocase*, *17*(3), 201-208. <https://doi.org/10.1080/13554794.2010.509320>

- Uhlhaas, P. J., & Singer, W. (2010). Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nature Reviews. Neuroscience*, *11*(2), 100-113. <https://doi.org/10.1038/nrn2774>
- Unschuld, P. G., Buchholz, A. S., Varvaris, M., van Zijl, P. C. M., Ross, C. A., Pekar, J. J., Hock, C., Sweeney, J. A., Tamminga, C. A., Keshavan, M. S., Pearlson, G. D., Thaker, G. K., & Schretlen, D. J. (2014). Prefrontal brain network connectivity indicates degree of both schizophrenia risk and cognitive dysfunction. *Schizophrenia Bulletin*, *40*(3), 653-664. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbt077>
- Ursini, G., Punzi, G., Chen, Q., Marenco, S., Robinson, J. F., Porcelli, A., Hamilton, E. G., Mitjans, M., Maddalena, G., Begemann, M., Seidel, J., Yanamori, H., Jaffe, A. E., Berman, K. F., Egan, M. F., Straub, R. E., Colantuoni, C., Blasi, G., Hashimoto, R., ... Weinberger, D. R. (2018). Convergence of placenta biology and genetic risk for schizophrenia. *Nature Medicine*, *24*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0021-y>
- Uylings, H. B. M., Groenewegen, H. J., & Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, *146*(1-2), 3-17. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.028>
- Uylings, H. B., & van Eden, C. G. (1990). Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Progress in Brain Research*, *85*, 31-62. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)62675-8](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62675-8)
- van der Staay, F. J. (2006). Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Reviews*, *52*(1), 131-159. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.01.006>
- van Eden, C. G., & Uylings, H. B. M. (1985). Postnatal volumetric development of the prefrontal cortex in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *241*(3), 268-274. <https://doi.org/10.1002/cne.902410303>
- van Os, J., Kenis, G., & Rutten, B. P. F. (2010). The environment and schizophrenia. *Nature*, *468*(7321), 203-212. <https://doi.org/10.1038/nature09563>
- Van Overwalle, F. (2009). Social cognition and the brain: A meta-analysis. *Human Brain Mapping*, *30*(3), 829-858. <https://doi.org/10.1002/hbm.20547>
- Vaskinn, A., Ventura, J., Andreassen, O. A., Melle, I., & Sundet, K. (2015). A social path to functioning in schizophrenia: From social self-efficacy through negative symptoms to social functional capacity. *Psychiatry Research*, *228*(3), 803-807. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.05.019>
- Vogel, P., Hahn, J., Duvarci, S., & Sigurdsson, T. (2022). Prefrontal pyramidal neurons are critical for all phases of working memory. *Cell Reports*, *39*(2), 110659. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110659>
- Wang, H.-X., & Gao, W.-J. (2009). Cell type-specific development of NMDA receptors in the interneurons of rat prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *34*(8), 2028-2040. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.20>

- Willner, P. (1986). Validation criteria for animal models of human mental disorders: Learned helplessness as a paradigm case. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 10(6), 677-690. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(86\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0278-5846(86)90051-5)
- Xia, M., Liu, T., Bai, W., Zheng, X., & Tian, X. (2019). Information transmission in HPC-PFC network for spatial working memory in rat. *Behavioural Brain Research*, 356, 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.024>
- Xu, M.-Q., Sun, W.-S., Liu, B.-X., Feng, G.-Y., Yu, L., Yang, L., He, G., Sham, P., Susser, E., St. Clair, D., & He, L. (2009). Prenatal Malnutrition and Adult Schizophrenia: Further Evidence From the 1959-1961 Chinese Famine. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 568-576. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn168>
- Zhang, Y., Behrens, M. M., & Lisman, J. E. (2008). Prolonged exposure to NMDAR antagonist suppresses inhibitory synaptic transmission in prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, 100(2), 959-965. <https://doi.org/10.1152/jn.00079.2008>
- Zhao, Z., Zeng, F., Wang, H., Wu, R., Chen, L., Wu, Y., Li, S., Shao, J., Wang, Y., Wu, J., Feng, Z., Gao, W., Hu, Y., Wang, A., Cheng, H., Zhang, J., Chen, L., & Wu, H. (2022). Encoding of social novelty by sparse GABAergic neural ensembles in the prefrontal cortex. *Science Advances*, 8(35), eabo4884. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo4884>
- Zhou, Y., Shu, N., Liu, Y., Song, M., Hao, Y., Liu, H., Yu, C., Liu, Z., & Jiang, T. (2008). Altered resting-state functional connectivity and anatomical connectivity of hippocampus in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 100(1), 120-132. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2007.11.039>
- Zivanovic, O., & Nedic, A. (2012). Kraepelin's concept of manic-depressive insanity: One hundred years later. *Journal of Affective Disorders*, 137(1-3), 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.03.032>