



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

ESTUDI DE LA PLASTICITAT ESTRUCTURAL EN MALALTIES PSIQUIÀTRIQUES AMB MODELS ANIMALS

Programa de Doctorat en Neurociències.

RD 99/2011

CLARA BUENO FERNÁNDEZ

Directors

Dr. Joan Nàcher Roselló

Dra. Esther Castillo Gómez

Juan Nàcher Roselló, Catedràtic de l'Institut Universitari de Biotecnologia i Biomedicina (BIOTECMED) de la Universitat de València, i Esther Castillo Gómez, Professora Ajudant Doctora del Departament de Medicina de la Universitat Jaume I de Castelló,

Certifiquen

Que Clara Bueno Fernández, ha realitzat sota la seua direcció el present treball d'investigació, corresponent a la Tesi Doctoral titulada: *“Estudi de la plasticitat estructural en malalties psiquiàtriques amb models animals”*.

Una vegada revisat el treball, consideren que pot ser presentat al Tribunal que ha de jutjar-lo per optar al grau de Doctora.

I per a que conste, en compliment de la legislació vigent, signen el present certificat a 10 de Desembre de 2020.

Dr. Juan Nàcher Roselló

Dra. Esther Castillo Gómez

Per a la realització d'aquesta tesi, l'autora ha sigut beneficiària d'una ajuda per a la contractació de Personal Investigador en Formació de caràcter Predoctoral concedida per la Generalitat Valenciana (ACIF/2016/376) segons la resolució del 16 de Juny de 2016 per la Conselleria d'Educació, Investigació, Cultura i Esport.

Above all, don't fear difficult moments. The best comes from them.

Rita Levi-Montalcini

ÍNDEX

AGRAÏMENTS.....	i
ABREVIACIONS.....	xi
RESUM GENERAL.....	x
I. INTRODUCCIÓ.....	1
1. L' ESTRÈS.....	3
1.1. Concepte de l'estrès.....	3
1.2. Biologia de l'estrès (Mecanismes de la resposta de l'estrès).....	3
1.3. Efectes de l'estrès sobre el sistema nerviós central.....	5
2. POBLACIONS NEURONALS D'INTERÈS PER A L'ESTUDI DE L'ESTRÈS CRÒNIC.....	7
2.1. Neurones piramidals.....	7
2.2. Interneurones.....	10
2.2.1. Interneurones <i>Martinotti</i> / O-LM.....	12
2.2.2. Interneurones de cistella (<i>Basket cells</i>).....	13
2.2.3. Interneurones canelobre (<i>Chandelier cells</i>).....	14
2.2.4. Altres subpoblacions de interneurones.....	15
3. ÀREES IMPLICADES EN LA RESPOSTA A L'ESTRÈS.....	17
3.1. Escorça prefrontal.....	17
3.2. Hipocamp.....	20
3.3. Amígdala.....	22
3.4. Nucli Reticular Talàmic.....	24
3.5. Habènula.....	24
4. PLASTICITAT DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL.....	26
4.1. Plasticitat estructural.....	26
4.2. Connectivitat.....	27
4.3. Molècules relacionades amb la plasticitat.....	28
4.4. Matriu extracel·lular.....	29
5. IMPACTE DE L'ESTRÈS SOBRE EL SISTEMA NERVIÓS.....	32
5.1. Impacte de l'estrès sobre el sistema nerviós adult.....	32
5.2. Impacte de l'estrès sobre el sistema nerviós juvenil.....	34
6. DIFERENCIES SEXUALS EN LA RESPOSTA A L'ESTRÈS.....	37
7. MODELS EXPERIMENTALS UTILITZATS.....	38

7.1. Estrès per restricció	38
7.1.1. Restricció al llarg de 21 dies (1h/dia)	39
7.1.2. Restricció al llarg de 10 dies (6h/dia)	40
7.2. Estrès crònic impredecible (UCMS)	42
7.2.1. Estrès peripubertal impredecible	43
II. OBJECTIUS.....	45
Objectiu principal general.....	49
Objectius secundaris generals	49
Objectius específics.....	49
III. PUBLICACIONS CIENTÍFIQUES EN REVISTES INDEXADES.....	48
ARTICLE 1	49
ARTICLE 2	60
ARTICLE 3	81
IV. DISCUSSIÓ	115
V. CONCLUSIONS	131
ANNEX.....	134
ARTICLE 1	135
ARTICLE 2	144
VI. BIBLIOGRAFIA	160

AGRAÏMENTS

Per començar, faré memòria i contaré la història de la meua tesi, on moltes persones que ni s'ho pensen han format part d'ella.

Tot va començar en quart de carrera, quan Joan va donar el vist-i-plau per a que jo realitzara el meu TFG al seu laboratori. Gràcies per obrir-me la porta, després torne a tu. En aquest moment, i amb l'ajuda de Javi (gràcies per fer de guia durant l'inici d'aquesta aventura), va començar per a mi l'apassionant vida científica: microscopis que no sabia com funcionaven, paraules rares de les que desconeixia el significat i problemes que no tenia ni idea de com resoldre. Tots aquests dubtes passejaven pel meu cap fins a que vaig entrar en el "quartito" dels becaris, on vaig trobar a les xiques dispostes a mantindre'm a flot. Gràcies Marta, Esther, Maria, Clara Gracia, Lidia, Tere i Laura, perquè totes vosaltres m'ajudareu en mil i una coses durant els meus primers anys al laboratori. Resolguereu els meus dubtes i molts dels meus problemes, m'ensenyareu les tècniques necessàries per a fer la meua feina, però sobretot, de vosaltres vaig aprendre a ser més crítica, tant a la ciència com a la vida, per a mi heu sigut tot un exemple i us tinc molta estima.

La carrera i el màster van acabar i em vaig asomar a un d'aquests precipicis que la vida et fica al teu pas de volta en quan: "Ara què?". Joan, és moment de tornar a tu. No sé qui estirarà de mi per a que no caiga en els altres precipicis de la vida, pero el que si sé és que en aquest, vas ser tu el que estirares. Gràcies. Has sigut comprensiu, humà, m'has escoltat, m'has resolt problemes, m'has fet riure, m'has animat quan ho he necessitat i m'has pegat canya en les coses que no feia bé per a que aprenguera, i tot açò durant els 4 anys de tesi i els 2 de carrera i màster! Gràcies, perquè tot açò fa que els que treballem amb tu, estigam bé i vullgam seguir aci.

Però no cal oblidar, que tot i que Joan estira fort, per a que no caigam hi ha molta gent al seu voltant que també estira de volta en quan. Aci voldria agrair a Esther, que has estirat moltíssim. Tot i que sé que l'experiment del PPS va ser dur, que van ser moooltes (moltiissimes) hores per generar el model i que vam invertir caps de setmana, festius i dies importants per a les nostres famílies en fer-ho, mire enrere i no tinc un mal record, eixos mesos vam compartir moments molt especials, bons i roïns, però el sabor final que deixaren en mi és dolç. És una llàstima que aquests últims anys hages canviat de localització al lloc de treball i no hem pogut continuar compartint tan intensament la meua tesi, tant de bo haguera sigut diferent.

Altres persones que estiren prou fort son Emilio, siempre dispuesto a ayudar a todos, pero para mi, un gran apoyo personal, gracias por haber estado siempre que te he necesitado. Carlos, siempre con una sonrisa hacia nosotras y con buenas palabras, es de agradecer tener a alguien así cerca. Y José

Miguel, que a pesar de nuestros rife-rafes, tengo muy claro que me has ayudado muchísimo y has hecho que las cosas fueran más fáciles, muchas gracias.

I com no, les meues companyes dels últims anys. Simona, del casi principio al final, gracias porque tu apoyo ha sido muy importante y tenerte caminando al mismo paso que yo los últimos años ha hecho el camino más bonito. Júlia, no se si va ser Santiago, la vida en general o el fet de ser la única que parla el meu idioma al despatx (em referisc al valencià, bueno i al de ser borde) pero se que quan estàs al labo, els dies són molt millors, gràcies per tindre ixa màgia i gràcies per vindre casi sempre. Ramón, tu que ens abandonares per una vida millor (ho dubte) i que quan marxares vas deixar-me com a hereva del teu titol de “pozo negro”, gràcies, ha sigut tot un honor i et promet que he sabut estar a l’altura. T’he trobat molt a faltar els últims mesos. Hèctor, cabró si tu no hagueres llegit la tesis jo no estaria en esta situació!! Jo no volia ser la propera! També et vull donar les gràcies per deixar qualsevol cosa que tingues entre mans i estar dispost a ajudar sempre. Yaiza y Patrycja, gracias por aportar ese toque de novedad y por venir siempre con una sonrisa, no la perdais! I finalment, gràcies a totes les que ja no esteu però foreu importants al llarg del camí: a Adriana, solo 3 meses y sin idiomas en común, y aun así, te has convertido en una persona muy especial para mi a la que no hay dia que no eche de menos, por todas las bromas, los videos, por los cafés en nuestro banco, por enseñarme tu armario ese que llamabas habitación, por presentarme a tu familia y sobretodo por hacer de una fiesta cada dia a tu lado, mil gracias. A Yasmina, porque saps que fer-te la punyeta sempre ha sigut un dels meus hobbies, gràcies per fer-me riure, a Ana Paula, una parte de esta tesis es también tuya y nunca podré expresar lo agradecida que estoy. A Pablo, por ser mi compi de meterse con Yasimira, y por endulzarnos los días, te echo de menos.

Però, tot i que gran part d’aquest anys els he passat dins del laboratori, per a mi sempre ha sigut molt important que les coses també anaren bé fora d’ell. Quan el temps al microscopi o ordinador començava a anar més lent, sabia que era l’hora d’eixir i trobar suport en altres persones. Aci cal destacar a la meua familia, mamá, se que el día de mi defensa no irás para nada perdida, has sido una gran oyente de mis ensayos de todas las charlas, muchos problemas y lectora de algún que otro tramo de artículo durante todos estos años, gracias, también he de agradecer tu comprensión y empatía constante, ha sido muy importante. A Ana, siempre dispuesta a echar una mano en lo que sea, cuando estás, aunque a veces me desespere, haces las cosas más fáciles. Y a papá, por tener esa visión tan rara del mundo y hacerme ver la importancia de las cosas cotidianas.

Malgrat la importància de la familia, jo no soc molt d’estar en casa, i és per això que molta més gent estira de mi dia rere dia. I si parle de constància, no puc deixar de mencionar a la gent del bàsquet, a Beto, per ser el meu “pare basquetbolístic”, per ensenyar-me tot i valorar-me tant, moltes gràcies. A

Lu, perquè m'he fet com soc amb tu i en gran part per tu. A Noe, por nuestra complicidad, confianza y particular estima, me sacas de mis casillas tanto como me metes en ellas, un don que poca gente tiene, no te alejes. A Lau, por estar en los momentos malos, y además no dejar de perderse tampoco los buenos. A Malena, por ser la más fiel compañera, eres genial. A la generación del 2003, porque he crecido con vosotros y posiblemente después de tantos años, he aprendido más yo de vosotros que vosotros de mí, gracias por un pasado tan bonito. A la generación del 2007, mi presente, gracias, porque sois mi refugio, mi cambio de aires y en muchas ocasiones, lo mejor de mi día rutinario, para mí sois un ejemplo de esfuerzo, constancia, disciplina y compañerismo, no dejéis de serlo nunca. Y finalmente, a la generación del 2010, me transportais a mi infancia cada vez que estoy con vosotros y eso me encanta, creais un ambiente de juego, felicidad y cariño muy necesario para mí en el día a día, ojalá pudiéramos parar el tiempo cuando estamos juntos.

Però per sort o per desgràcia, no tots els dies són de la gent de Picanya, i és per això que no puc restar importància a tota ixa gent que m'acompanya en els moments lliures i que fan de la meua vida una aventura constant. Gracias a Ire y Rebe, me encantais y me haceis feliz, Ire, tengo confianza ciega en todo lo que me dices, en poco tiempo te has convertido en alguien muy especial, gracias por escucharme y aconsejarme, contigo puedo ser totalmente sincera en todo. Rebe, eres la persona más constante, paciente y fuerte que conozco y esto hace que te admire muchísimo, y eso va a ser así aquí y en cualquier otra parte del mundo, gracias. A la gent de Patraix, a Marta y a Esther, por los paseos por la noche y los cafés del domingo por la mañana que me han dado la felicidad muchos días, gracias. A los Patrallas, por hacer de cada momento juntos una fiesta, con vosotros tengo vacaciones divertidas pagadas, que más se puede pedir? Als de la uni, als exagerats de Miquel, Rebe, Hipi i Noe, i a les dolces de Isa, Maria i Ester, per totes les aventures que hem viscut, per fer-me riure tant sempre i per ser un suport molt més important del que us sembla, tant de bo sigui llarg el viatge. A Raquel, gracias por ser tan atenta y preocuparte tanto por mí. A Enzo, por ser tan tierno y hacer que mis días empiecen sonriendo, jugando y llenos de besos y abrazos, no crezcas nunca.

I per acabar, hi ha una persona que estira de mí incondicionalment davant de qualsevol situació, que em fa sentir estimada en tot moment, que m'ensenya de tot allò que ella sap, que m'ajuda en tot el que necessite, que em dona suport en cada una de les meues decisions, que m'escolta cada volta que parlo, que celebra les meues victòries, que m'anima en les meues derrotes, que m'acompanya allà on vaig i que em fa feliç cada dia que passa. Gràcies Marta, per cada una de les coses que acabe de mencionar i per què eres la única persona que vertaderament ha estat en tots i cada un dels dies d'aquesta tesi.

Podria passar-me més temps escrivint sobre les persones importants per a mi que sobre el meu tema d'investigació i això, és algo molt bonic que no tot el món pot dir.

Gràcies a tots els mencionats i a la tanta gent que no he especificat ací però que també han aportat el seu granet, gràcies per fer-me sentir suportada, estimada i acollida.

ABREVIACIONES

- 5-HT3: receptor de serotonina tipus 3
- ACTH: hormona adrenocorticotropa
- BA: nucli basal de l'amígdala
- BLA: amígdala basolateral
- BM: nucli basomedial de l'amígdala
- CA: banya d'Amon
- CB: calbindina
- CB1R: receptor d'endocannabinoides tipus 1
- CCK: colecistoquinina
- CeA: amígdala central
- CeM: amígdala central medial
- CeL: amígdala central lateral
- Cg: escorça cingulada
- ChABC: condroitinasa ABC
- CR: calretinina
- CRH: factor alliberador de corticotropina
- CSPGs: proteoglicans de condroitin-sulfat
- DG: gir dentat
- E: excitació
- EC: escorça entorínica
- ECM: matriu extracel·lular
- EndoN: enzim Endoneuraminidasa-N
- GABA: àcid gamma-aminobutíric
- GAD: àcid glutàmic-descarboxilasa
- Glu: glutamat

- GR: receptors de glucocorticoides
- HA: àcid hialurònic
- HAPLN: proteïna d'unió a l'àcid hialurònic
- I: inhibició
- IL: escorça infralímbica
- LA: amígdala lateral
- LHb: habènula lateral
- LM: estrat *lacunosum-moleculare*
- MHb: habènula medial
- mPFC: escorça prefrontal medial
- mRNA: àcid ribonucleic missatger
- NA: noradrenalina
- NCAM: molècula d'adhesió cel·lular neuronal
- NDS: sèrum normal d'ase
- NPY: neuropèptid Y
- O: estrat *oriens*
- OFC: escorça orbitofrontal
- O-LM: estrat *Oriens-Lacunosum-moleculare*
- PB: tampó fosfat
- PBS: tampó fosfat salí
- PBST: tampó fosfat salí amb Tritón X100
- PFC: escorça prefrontal
- PrL: escorça prelímbica
- PNNs: xarxes perineuronals
- PPS: estrès peripubertal

- PSA: àcid polisiàlic
- PSA-NCAM: forma polisialitzada de la NCAM
- PTSD: trastorn d'estrès-posttraumàtic
- PV: parvalbúmina
- RN: nuclis del rafe
- SDPS: estrès persistent induït per la derrota social
- SEM: error estandar de la mitjana
- SNC: sistema nerviós central
- SOM: somatostatina
- SPLASH: prova d'esquitxada de sacarosa
- ST8SialII / ST8SialIV: enzims polisialiltransferases
- SYN: sinaptofisina
- TRN: nucli reticular talàmic
- VGAT: transportador vesicular de GABA
- VGLUT: transportador vesicular de glutamat
- VIP: polipèptid intestinal vasoactiu
- VTA: àrea ventral tegmental
- WFA: aglutinina Wisteria floribunda

RESUM GENERAL

El concepte científic de l'estrès s'associa a una resposta adaptativa front a un estímul ambiental o una demanda. Tot i això, si les perturbacions al medi ambient son constants, es produeix un desgast a l'organisme que té efectes perjudicials en aquest.

El cervell es pot considerar l'òrgan central de l'estrès, ja que en ell comença la principal resposta biològica. És conegut que esdeveniments estressants de curta duració poden potenciar les funcions neuronals i millorar el rendiment cognitiu. D'altra banda, llargs períodes d'estrès poden alterar més profundament la fisiologia de diverses regions del sistema nerviós i afectar el seu funcionament, produint dèficits cognitius i d'aprenentatge. Així mateix, si l'estímul estressant es produeix en les etapes primerenques de la vida, el cervell pot desenvolupar-se de manera anòmala i els efectes produïts poden ser crònics.

Com a procés d'adaptació a l'estrès, l'organisme produeix una secreció d'hormones procedents de centres cerebrals com són l'hipotàlem i la hipòfisi i que viatgen per circulació sanguínia fins a arribar a l'escorça suprarenal. L'activació d'aquesta glàndula produeix la síntesi de glucocorticoides que creuen la barrera hemato-encefàlica i s'uneixen a receptors específics que es troben en diverses estructures del cervell. La unió d'aquests a l'hipotàlem i a la hipòfisi produeix una retroalimentació negativa que amaina la síntesi de les hormones que aquests centres generen. La producció paral·lela d'adrenalina i noradrenalina per part de la medul·la suprarenal és la responsable dels símptomes comuns de la Síndrome d'Adaptació General. La presència dels receptors per a aquestes hormones en les diverses àrees del cervell fa que aquestes siguin especialment vulnerables a l'estrès. De fet, durant els últims anys s'ha fet evident que els glucocorticoides indueixen efectes ràpids en l'activitat neuronal d'aquestes regions.

És conegut que els receptors hormonals varien en la seua densitat depenent de l'etapa de la vida en que l'individu es troba, de manera que el moment en què es produeix l'estímul estressant serà determinant per al desenvolupament dels possibles efectes. En aquest sentit, és també important destacar que l'estrès té un impacte diferent en mascles i en femelles. Finalment, com s'ha dit adés, la durada en que l'estímul estressant es produïxca serà responsable del desenvolupament d'una resposta merament adaptativa o d'una alteració de l'homeòstasi interna i dels efectes adversos que aquesta comporta, que poden fins i tot, arribar a promoure el desenvolupament de malalties psiquiàtriques, com és el cas de la depressió. Els desordres psiquiàtrics més prevalents són les patologies depressives. Aquests afecten a 1 de cada 8 europeus i tenen una major incidència en les dones. Aquestes

devastadores dades fan que l'estudi dels efectes de l'estrès i les possibles estratègies per combatre'l siguin una prioritat per a molts laboratoris científics.

Fins a l'actualitat, és conegut, que l'estrès crònic afecta a diverses poblacions neuronals. Principalment, els estudis es centren en entendre quines són les conseqüències produïdes, tant a nivell estructural com a nivell molecular, en les neurones excitadores o neurones principals del sistema nerviós central (SNC). Per contra, els efectes de l'estrès sobre les diferents subpoblacions de interneurons són molt menys estudiats i per tant menys coneguts. En aquesta tesi, ens centrem en l'estudi de com afecta l'estrès tant a neurones principals com a interneurons; en aquest últim cas estudiem els efectes a la subpoblació de cèl·lules anomenades cèl·lules *Martinotti i O-LM* (que expressen somatostatina; SOM) i a la subpoblació de les *Basket cells* (que expressen parvalbúmina; PV).

Adicionalment, se sap que l'estrès no afecta d'igual manera a totes les estructures que componen el cervell. Algunes de les principals àrees que es troben afectades i que tenen un especial interès en l'estudi de l'estrès són:

- L'escorça prefrontal (PFC), forma part del neocòrtex i es troba localitzada als lòbuls frontals del cervell. Està associada a la capacitat de control cognitiu i per tant implicada en un ampli ventall de funcions, així com en el control d'impulsos o la capacitat de fer plans a llarg termini. Es divideix en l'escorça orbitofrontal i en l'escorça prefrontal medial (mPFC). Aquesta última es divideix en 3 àrees específiques: l'escorça cingulada, l'escorça prelímbica i l'escorça infralímbica. L'escorça infralímbica és en la que centrarem el nostre treball. En rosegadors, totes les àrees del neocòrtex estan dividides en 5 capes, formades per diferents tipus cel·lulars. El 80% de les neurones que trobem a aquesta regió són cèl·lules piramidals excitadores, les restants són cèl·lules inhibidores del tipus PV+, SOM+ i en menor mesura colecistoquinina+ (CCK+). El desenvolupament d'aquesta regió acaba a l'adolescència, cosa que fa que durant aquesta etapa, la PFC siga especialment sensible a les experiències adverses. A més, la gran presència de receptors de glucocorticoides (GR) fa que siga evident la seua afectació amb l'estrès.

- L'hipocamp: localitzat a la regió medial del lòbul temporal. S'associa a la generació de memòries. Es pot dividir anatòmicament en gir dentat (amb 3 capes: molecular, granular i hilus) i en banya d'Amon (amb les capes: oriens, piramidal, *lucidum*, radiada i *lacunosum-moleculare*). L'hipocamp rep projeccions de l'escorça entorrinal que arriben al gir dentat i des d'ací comença un circuit intern que passa per les diferents parts de l'hipocamp i torna fins a l'escorça entorrinal. Aquesta regió també rep projeccions del septum, de l'hipotàlem, i de l'amígdala entre d'altres i està formada

per cèl·lules excitadores (granulars i piramidals) i per diferents subpoblacions de cèl·lules inhibidores. La presència d'una gran densitat de GR fa que siga una regió particularment susceptible a l'estrès.

- L'amígdala: localitzada al lòbul temporal anterior. Aquesta estructura està formada per nuclis, els quals no s'organitzen en capes com les dues estructures anteriors. És responsable del control de les emocions, de la integració de l'entrada de formació sensorial i de la resposta davant de situacions de por. A més, aquesta estructura forma part del circuit del reforç. Dos de les seues subdivisions anatòmiques principals són l'amígdala basolateral (formada principalment per cèl·lules excitadores) i l'amígdala central (formada majoritàriament per cèl·lules inhibidores). Aquestes dues regions estableixen connexions recíproques. Tanmateix, l'amígdala projecta i rep projeccions de la PFC i de l'hipocamp entre altres àrees. Aquestes connexions fan que l'amígdala siga particularment sensible als efectes de l'estrès.

- El nucli reticular talàmic: és la única porció del tàlem que no projecta a l'escorça, però sí que rep projeccions excitadores d'aquesta. Aquest nucli, format quasi exclusivament per neurones inhibidores, estableix connexions amb els altres nuclis del tàlem i es considera que regula les connexions que van del tàlem dorsal al neocortex. La seua funció és exercir aquesta regulació mitjançant l'inhibició lateral, on s'amplifica la informació rellevant i es redueix la informació irrellevant.

- L'habènula: junt a la glàndula pineal forma l'epitàlem. Modula els circuits dopaminèrgics i serotoninèrgics del mesencèfal. Les neurones de l'habènula responen a una gran quantitat d'estímuls estressants i poden provocar una menor síntesi de monoamines, com és la dopamina, cosa que pot comportar una falta de motivació i una reducció de l'activitat motora.

Al llarg de les últimes dècades diversos estudis han demostrat que els circuits neuronals en els que aquestes regions es troben implicades, són extremadament dinàmics i poden ser remodelats a través de les experiències. Els estímuls generen efectes sobre les poblacions neuronals, que es veuen afectades tant a nivell estructural com a nivell sinàptic. L'habilitat dels circuits neuronals d'adaptar la seua connectivitat en funció d'estímuls o experiències s'anomena plasticitat.

La plasticitat estructural es pot definir com el conjunt de canvis morfològics que experimenten les neurones sota els efectes de diferents estímuls. Aquests canvis morfològics són el resultat d'adaptacions a nivell molecular. En la present tesi fem un estudi de la complexitat de l'arbre dendrític, així com de la densitat de les espines dendrítiques per entendre com diversos estímuls estressants afecten estructuralment a les cèl·lules d'interès.

Per estudiar els efectes d'aquests estímuls sobre la connectivitat del sistema, hem analitzat diversos paràmetres, com la densitat de receptors inhibidors en l'element postsinàptic, la densitat dels transportadors vesiculars en l'element presinàptic o el nombre de sinapsis actives.

Actualment es coneixen diverses molècules relacionades amb la plasticitat, com és el cas de la forma polisialitzada de la molècula d'adhesió cel·lular neuronal (PSA-NCAM). Aquesta molècula s'expressa abundantment durant el desenvolupament, però al SNC adult la seua expressió és molt més reduïda. En adults, l'expressió d'aquesta molècula és majoritària en neurones GABAèrgiques madures situades al neocòrtex, a l'hipocamp i a l'amígdala. És particularment interessant que l'expressió de la PSA-NCAM es troba alterada en alguns desordres neuropsiquiàtrics en paral·lel a alteracions en la circuiteria GABAèrgica. És per això que diversos estudis assenyalen a la PSA-NCAM com a mediadora de la plasticitat estructural en les interneurons de l'escorça d'individus adults. Per tant, és d'especial interès en aquesta tesi, l'estudi dels efectes de l'estrès sobre aquesta molècula.

Adicionalment, unes altres estructures que es troben molt relacionades amb la plasticitat del sistema nerviós central són les xarxes perineuronals (PNNs), les quals són regions especialitzades de la matriu extracel·lular. Encara que s'ha descrit la presència de PNNs al voltant d'algunes neurones piramidals situades en capes profundes del neocòrtex, la gran majoria de PNNs es troben associades a les interneurons que expressen PV. L'aparició de les PNNs té lloc al final del desenvolupament cerebral, quan la majoria de les connexions es troben establertes i es produeix l'estabilització i la maduració dels circuits del SNC. Es pensa que estan implicades en la protecció, desenvolupament i plasticitat neuronal i en l'estabilització sinàptica. S'ha vist que es donen alteracions de les PNNs en algunes malalties mentals comuns com per exemple la depressió major, l'esquizofrènia o l'autisme.

Fins a l'actualitat, la majoria dels laboratoris que treballen investigant els efectes de l'estrès s'han centrat en entendre quin és el seu impacte sobre el sistema nerviós adult. Concretament, la majoria d'estudis es focalitzen en els efectes que es produeixen sobre les neurones excitadores. Se sap que l'estructura de les neurones piramidals es troba alterada en individus que han patit llargs períodes d'estrès. Aquesta experiència adversa produeix atròfia dendrítica i disminueix la densitat d'espines dendrítiques en neurones principals de la mPFC i l'hipocamp. Per contra, produeix els efectes oposats en les neurones principals de l'amígdala basolateral (BLA).

D'altra banda, l'estrès crònic afecta de manera diferencial a diverses subpoblacions de interneurons. Concretament, s'han vist efectes en les interneurons PV+, el nombre de les quals disminueix en l'hipocamp i en l'escorça infralímbica (IL) d'individus estressats crònicament. Així mateix,

se sap que l'activació i la funcionalitat d'aquestes també es veu afectada per l'estrès; trobem una sobreactivació de les PV+ de la PFC en individus sotmesos a estímuls estressants.

Altres subpoblacions d'interneurones, com són les SOM+, també mostren alteracions produïdes per l'estrès; a l'hipocamp, la densitat d'aquestes cèl·lules es veu reduïda i la seua estructura exhibeix un augment de l'arborització dendrítica en la PFC, així com una reducció en l'amígdala.

A més, l'estrès crònic produeix alteracions sobre les molècules relacionades amb la plasticitat neuronal. S'han descrit augments en l'expressió de PSA-NCAM en l'hipocamp i reduccions a l'amígdala d'individus estressats. Tanmateix, el nombre de PNNs es troba augmentat en la regió CA1 de l'hipocamp.

Les alteracions neuroquímiques, estructurals i fisiològiques produïdes com a conseqüència de l'estrès poden arribar a exterioritzar-se, provocant comportaments poc comuns en rosegadors sans, com un augment de la immobilitat i una tendència a evitar espais oberts i lluminosos.

Als models animals d'estrès, pot observar-se que els individus juvenils i els adults no reaccionen de la mateixa manera front als estressors. Així, per exemple, les adaptacions que es produeixen davant dels estressors en etapes juvenils incrementen el risc del desenvolupament de psicopatologies en adults. Açò és degut, en part a l'existència d'una major quantitat de GR en els individus juvenils que als adults. També influeix el desenvolupament tardà de la PFC, que es dona en gran mesura en les etapes pubertals (P21-P46) i fa que alteracions en aquesta regió durant aquest període, produïsquen un desenvolupament incorrecte i per tant efectes que poden arribar a ser irreversibles.

És conegut, que l'estrès crònic en l'etapa pubertal, produeix una pèrdua d'un gran percentatge de les sinapsis axoespines de les neurones excitadores de la mPFC. Aquesta pèrdua es pot recuperar amb el temps en animals joves. Estudis on s'apliquen estressors en les etapes primerenques de la vida (entre el 2^{on} i el 20^e dia de vida) mostren canvis en l'estructura i la morfologia de les cèl·lules piramidals de la IL.

De la mateixa manera que ocorre en adults, les interneurones, i majoritàriament les PV+ i les SOM+, es troben també afectades. Protocols d'estrès perinatal produeixen una disminució de la densitat de cèl·lules PV+ en hipocamp i en la IL i un augment d'aquestes en BLA. Altres treballs mostren com l'aïllament continu des de l'etapa juvenil fins a l'adult produeix un augment en la densitat d'espines dendrítiques de les cèl·lules SOM+ en la PFC.

Finalment, podem trobar altres efectes de l'estrès en paràmetres com l'activació neuronal, l'equilibri entre l'excitació i la inhibició del sistema i la plasticitat neuronal o les molècules relacionades amb aquesta, això com afectació en la locomoció dels individus i altres trets comportamentals que resulten atípics després dels protocols d'estrès.

De la mateixa manera que l'edat, el sexe juga un paper important en la vulnerabilitat a l'estrès. De fet, les dones són més susceptibles que els homes a desenvolupar desordres psiquiàtrics en els que l'estrès es considera un factor de precipitació, com són la depressió o l'ansietat. A nivell de l'estructura neuronal és ben conegut que la maduració dendrítica de les neurones piramidals de la PFC ocorre més prompte en les femelles que en els mascles.

A nivell de l'estructura neuronal és ben conegut que la maduració dendrítica de les neurones piramidals de la PFC ocorre més prompte en les femelles que en els mascles. Se sap que els mascles tenen dendrites més complexes en les neurones piramidals de la mPFC que les femelles. Així mateix, altres estudis mostren com la mPFC té un volum major en femelles. Aquest dimorfisme sexual reflecteix les diferències en la distribució de receptors d'hormones sexuals i implica que idèntics tractaments o estimulacions poden generar respostes o canvis diferents en mascles i en femelles.

MODELS UTILITZATS

En la present tesi he utilitzat dos models diferents d'estrès crònic; l'estrès per restricció i l'estrès impredecible. El primer dels dos l'hem fet servir en dos treballs diferents, alterant la durada del protocol. Tots dos models tenen l'objectiu comú d'entendre com diferents situacions d'estrès crònic afecten al SNC, i concretament quins són els seus efectes sobre les interneurons i la seua plasticitat.

Estrès per restricció: Aquest model consisteix a realitzar una immobilització o restricció de la mobilitat dels individus durant un temps determinat i repetir la restricció al llarg d'un període de temps concret. Es considera que aquest és un bon model que simula les experiències estressants predictibles que pateixen les persones de manera contínua, dia rere dia, com podrien ser situacions estressants socials, familiars o en el treball.

En aquesta tesi hem fet servir dues versions d'aquest model:

- Restricció al llarg de 21 dies (1h/dia): Per a aquest treball ferem servir una soca de ratolins transgènics Tg(GadGFP-45704Swm) que expressa EGFP sota el promotor de GAD67, cosa que permet

veure marcada una subpoblació específica de interneurons que expressen SOM. El protocol es va realitzar en ratolins mascles de 3 mesos (adults). Vint-i-quatre hores després de l'última sessió de restricció, tots els animals (tant controls com estressats) van ser eutanitzats i perfosos transcordialment.

- Restricció al llarg de 10 dies (6h/dia): Els animals utilitzats per a aquest treball foren rates mascles Sprague-Dawley de 13 setmanes de vida (adults). Vint-i-quatre hores després de l'última sessió de restricció, tots els animals (tant controls com estressats) van ser eutanitzats i perfosos transcordialment.

Estrès crònic peripubertal impredecible: El principal tret d'aquest model és el fet que els diferents estímuls aversius no segueixen cap ordre predecible per a l'individu que els pateix, de manera que generen un estat d'ansietat pel desconeixement. A més, moltes voltes no es realitzen sessions d'estrès tots els dies consecutius, és a dir, es pot deixar algun dia sense sessió per tal d'augmentar la impredecibilitat i disminuir el procés d'adaptació dels individus.

El protocol d'estrès impredecible l'he realitzat tant a ratolins mascles com femelles en l'etapa peripubertal (entre P28 i P42). Durant aquest període els animals van ser sotmesos a diversos estressors diferents, distribuïts en dies no contigus. Tres dies després de la fi del protocol d'estrès (P45), tant els animals estressats com els controls van passar 2 tests de comportament: *open field* i *splash sucrose test*. Posteriorment vam deixar passar 40 dies sense manipular als animals i ja quan eren adults tornarem a realitzar tots 2 tests comportamentals (P84). Finalment els animals foren eutanitzats i perfosos transcordialment a P90.

OBJECTIUS

Objectiu principal general: Entendre com afecten diferents protocols d'estrès crònic (tant desenvolupats en la vida adulta com en l'etapa juvenil) a diverses àrees del cervell que estan estretament lligades a la resposta front a l'estrès.

Objectius secundaris generals:

- Entendre com l'estrès crònic afecta a diverses subpoblacions de neurones inhibidores del SNC.

- Entendre com l'etapa en que s'indueix l'estrès té una influència en els efectes que aquest provoca.
- Entendre com afecta l'estrès tenint en compte el sexe dels individus.
- Entendre com l'estrès crònic afecta a la plasticitat neuronal i a les molècules relacionades amb aquesta en diverses àrees del cervell.

RESULTATS PRINCIPALS

Amb el primer dels treballs recollits a la present tesi, mostrem com la restricció de la mobilitat d'1 hora al dia al llarg de 21 dies, produeix una disminució de l'arbre dendrític de les interneurons de la regió CA1 de l'hipocamp que expressen SOM; les interneurons *O-LM*. Per contra, açò no ocorre amb les interneurons situades a CA3. Cap diferència significativa es va detectar en la densitat d'espines dendrítiques en les interneurons SOM+ de cap de les dues regions de l'hipocamp analitzades. La densitat de interneurons SOM+ tampoc es va veure alterada per aquest protocol d'estrès. Finalment, l'estrès va produir una disminució de l'expressió de GAD67 en l'estrat *lacunosum-moleculare* de CA1 i en els estrats *lucidum* i *radiatum* de CA3, però no va afectar a l'expressió de SYN) ni a la de PSA-NCAM en cap de les capes estudiades.

Amb el segon dels treballs, on la restricció es va fer en rates mascle durant 6h/dia al llarg de 10 dies, vam veure que l'estrès crònic induïa increments en l'expressió de PSA-NCAM a la regió CA1 de l'hipocamp, però no a la mPFC ni a la BLA.

Així mateix, aquest model, va produir un augment de la densitat de cèl·lules PV+ en la mPFC i en la BLA, però això no va alterar la densitat de cèl·lules PV+ envoltades de PNNs en cap d'aquestes regions. Per contra, a la regió CA1 de l'hipocamp, la densitat de cèl·lules PV+ no es va veure afectada, tot i que sí que es va produir una disminució de la densitat de PNNs en animals sotmesos a l'estrès. Tot i això, la densitat de cèl·lules PV+ envoltades de PNNs no va mostrar diferències significatives en aquesta regió. En quant al nucli reticular talàmic (TRN), es va analitzar la intensitat de fluorescència i vam veure que l'estrès augmentava la senyal dels marcadors de les PNNs i de les cèl·lules PV+. A l'habècula es va produir un increment de cèl·lules PV-/PNNs+.

Finalment, vam veure que la densitat de puncta SYN+/PV+ que envolta les neurones excitadores de la mPFC no estava alterada per l'estrès, però aquest protocol sí que produïa una disminució de la densitat de puncta SYN+/PV- a la mPFC. En la BLA no vam veure cap diferència significativa.

A l'últim dels treballs, mostrem com l'estrès peripubertal produeix canvis al comportament dels animals tant juvenils com adults, on es mostra un augment de la locomoció tant en mascles com en femelles així com un augment de comportaments relacionats amb l'ansietat.

Aquests canvis comportamentals se sustenten amb canvis moleculars en la IL; vam veure que quan analitzem els dos sexes junts, els animals estressats tenien una major densitat de vGAT que els animals control, cosa que es traduïa en una menor ratio E / I, que era significativa tant en femelles com en tots dos sexes junts. Aquest augment de la inhibició es veia suportat per augments en la complexitat de l'arborització dendrítica de les cèl·lules PV+, concretament a les regions medials i distals de les cèl·lules de les femelles estressades. A més, aquest grup d'animals va mostrar una reducció de la densitat d'aquesta subpoblació de interneurons.

L'estudi de la innervació perisomàtica de les cèl·lules piramidals i les cèl·lules PV+ de la IL va mostrar un augment de la densitat de puncta inhibidors sobre aquestes cèl·lules, en mascles, en femelles i analitzant els dos sexes junts. Curiosament, quan analitzàrem l'estructura de les cèl·lules excitadores, vam veure que l'estrès peripubertal afectava diferencialment als mascles (disminuint la densitat d'espines dendrítiques) i a les femelles (augmentant-la).

Finalment, vam analitzar la densitat de punta immunoreactius per a PSA-NCAM, que va mostrar un augment significatiu en animals sotmesos a estrès peripubertal únicament quan analitzàvem els dos sexes junts i la densitat de PNNs, que no es va veure afectada per aquest protocol d'estrès.

CONCLUSIONS

- L'estrès crònic per restricció d'1h al dia al llarg de 21 dies no produeix efectes en la densitat d'espines dendrítiques de interneurons SOM+, ni en CA1 ni en CA3.
- L'estrès crònic per restricció d'1h al dia al llarg de 21 dies no afecta a la densitat d'interneurons SOM+ ni en CA1 ni en CA3.

- L'estrès crònic per restricció d'1h al dia al llarg de 21 dies produeix una disminució de l'expressió de GAD67 en l'estrat *lacunosum-moleculare* de CA1 i en els estrats *lucidum* i *radiatum* de CA3, però no afecta a l'expressió de SYN ni a la de PSA-NCAM en cap de les capes estudiades.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies indueix increments en l'expressió de PSA-NCAM a la regió CA1 de l'hipocamp dorsal, a la l'estrat *lacunosum-moleculare*, i a l'hipocamp ventral als estrats *piramidal* i *radiat*, però no altera l'expressió d'aquesta molècula ni a la mPFC ni a la BLA.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies produeix un augment de la densitat de cèl·lules PV+ en la mPFC i en la BLA, però no altera la densitat de cèl·lules PV+ envoltades de PNNs en cap d'aquestes regions.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies no afecta a la densitat de cèl·lules PV+ a la regió CA1 de l'hipocamp, tot i que sí que produeix una disminució de la densitat de PNNs en animals sotmesos a l'estrès. Tot i això, la relació de cèl·lules PV+ envoltades de PNNs no presenta diferències significatives en aquesta regió.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies produeix un augment de la intensitat de fluorescència de les PNNs i de les cèl·lules PV+ al TRN.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies produeix un increment del nombre de PNNs en la habènula.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies no altera la densitat de punta SYN+ / PV+ que envolten els somes de les neurones excitadores de la mPFC, però sí que produeix una disminució de la densitat de punta SYN+ / PV-.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies no altera la densitat de punta SYN+ / PV+ i SYN+ / PV- en la BLA.
- L'estrès peripubertal produeix un augment de la locomoció i de comportaments relacionats amb l'ansietat tant a curt com a llarg termini, tant en mascles com en femelles i quan s'analitzen els dos sexes junts.
- L'estrès peripubertal no produeix canvis en la densitat de punta VGLUT1+ de la IL en cap dels grups estudiats. La densitat de punta VGAT+ es veu augmentada en aquesta regió en animals estressats quan s'analitzen els dos sexes junts.

- L'estrès peripubertal produeix un menor ratio E / I en la IL de les femelles i quan s'analitzen els dos sexes junts.
- L'estrès peripubertal redueix la densitat de cèl·lules PV+ en la IL de les femelles adultes.
- L'estrès peripubertal produeix un augment en la complexitat de l'arborització dendrítica de les cèl·lules PV+ de l'escorça IL de les femelles adultes.
- L'estrès peripubertal produeix un augment de la densitat de punta CB1R+ sobre els somes de les cèl·lules piramidals de la IL tant de mascles, com de femelles, com quan s'analitzen els dos sexes junts. Per contra, la densitat de punta perisomàtics PV+ sobre les cèl·lules piramidals, sols es veu augmentada al grup dels mascles.
- L'estrès peripubertal produeix un augment de la densitat de punta CBR1+ sobre els somes de les cèl·lules PV+ de la IL únicament en el grup de les femelles.
- L'estrès peripubertal produeix una reducció de la densitat d'espines a les regions distals de les dendrites de les cèl·lules piramidals de la IL dels mascles i un augment d'aquestes en les femelles.
- L'estrès peripubertal no produeix alteracions en la densitat de PNNs, ni en la densitat de cèl·lules PV+ rodejades per aquestes en la IL.
- L'estrès peripubertal produeix un augment de la densitat de somes que expressen PSA-NCAM a la IL quan s'analitzen els dos sexes junts.

I. INTRODUCCIÓ

1. L' ESTRÈS

1.1. Concepte de l'estrès

El concepte d'estrès va ser definit al 1936 per Hans Selye, qui va observar que pacients amb diferents dolències mostraven símptomes similars. L'aparició d'aquests símptomes va ser atribuïda als esforços de l'organisme per a combatre l'estrès d'estar malalt. Aquests símptomes els va agrupar en l'anomenada Síndrome d'Adaptació General (Selye 1950), la qual incloïa: fatiga, pèrdua de la gana, baixada de pes i debilitat tant física com psíquica.

Selye va observar un efecte similar quan injectava substàncies o modificava l'homeòstasi de les rates amb les quals experimentava. Va ser després d'aquestes investigacions, i amb l'ajuda de definicions ja establertes per altres científics -com Claude Bernard, qui va definir el medi intern (Bernard 1855), i Walter Cannon, qui va associar el terme 'homeòstasi' als mecanismes fisiològics que mantenen el balanç d'aquest medi- quan Selye va publicar la seua major aportació científica: aquesta aportació va consistir a atribuir la paraula '*stress*' (estrès) a la resposta no específica dels organismes quan es dona una demanda (Selye 1950). En aquest mateix treball va definir com a '*Stressors*' (estressors) aquells estímuls que produeixen la resposta d'estrès i va hipotetitzar que aquest, quan es produeix durant llargs períodes de temps, podria ser un factor determinant per al desenvolupament de certs desordres psiquiàtrics.

1.2. Biologia de l'estrès (Mecanismes de la resposta de l'estrès)

Actualment, és ben conegut que, com a reacció a l'estrès, es produeix una secreció de l'hormona alliberadora de corticotropina (CRH) per part de l'hipotàlem (Aguilera 2011). Aquesta hormona es trasllada fins a la hipòfisi, i indueix la seua estimulació i la consegüent producció de l'hormona adrenocorticotropina (ACTH). L'alliberament d'ACTH a la circulació sanguínia fa que aquesta viatge fins a l'escorça suprarenal i l'active, de manera que s'inicia la síntesi de glucocorticoides (fonamentalment cortisol en humans i corticosterona en rosegadors). El cortisol viatja per la circulació sanguínia fins a creuar la barrera hemato-encefàlica i arribar de nou a l'hipotàlem, on s'uneix als receptors de glucocorticoides (GR) i el retroalimenta negativament. D'aquesta manera, impedeix la síntesi de més CRH i ACTH (Mukhara et al. 2018) (*Figura 1*). El cortisol es considera una hormona que redirigeix el metabolisme, provocant un increment de les demandes d'energia per combatre una situació anòmala (Kyrou and Tsigos 2009). Paral·lelament a la secreció del cortisol, l'estrès també desencadena la síntesi i l'alliberament de l'adrenalina i la noradrenalina (NA) a la medul·la suprarenal. L'adrenalina és

l'hormona que produeix les respostes o símptomes comuns de l'anomenada Síndrome d'Adaptació General. La NA, al contrari que l'adrenalina, pot creuar la barrera hemato-encefàlica i produir efectes a les regions del sistema nerviós central (SNC) que tinguen receptors per a aquesta molècula.

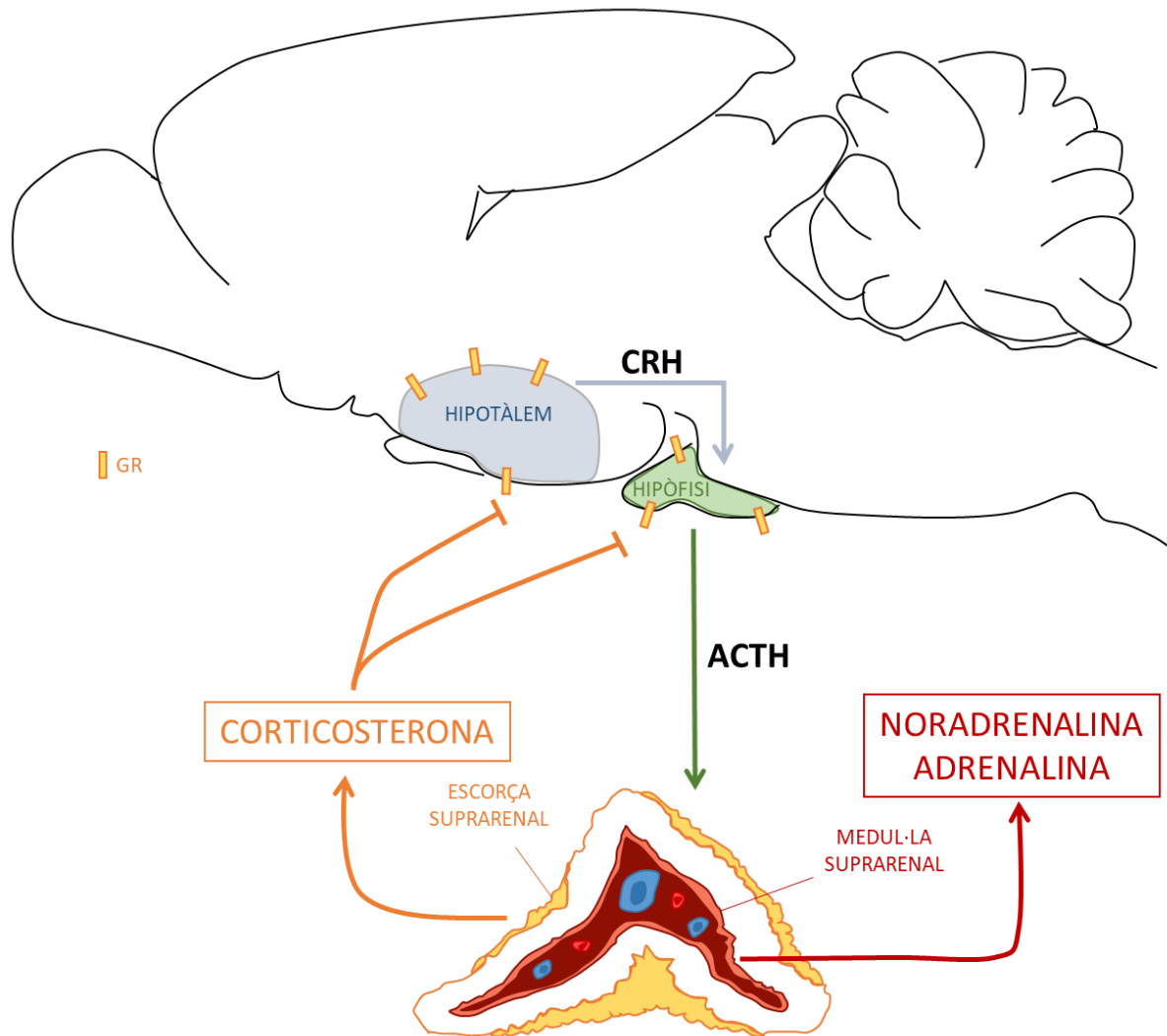


Figura 1: Principals components de l'eix hipotàlem-hipofisari en rosegadors. La CRH procedent de l'hipotàlem estimula la síntesi d'ACTH per part de la hipòfisi. L'ACTH viatja fins a la glàndula suprarenal on induïx la síntesi de NA, adrenalina i cortisol. Aquest últim produeix una retroalimentació negativa en aquelles estructures amb GR, com és el cas de l'hipotàlem i la hipòfisi. CRH: factor alliberador de corticotropina. ACTH: hormona adrenocorticotropina. NA: noradrenalina. GR: receptor de glucocorticoides.

És important destacar que l'expressió de GRs és elevada a les àrees del sistema límbic, com són l'hipocamp i l'hipotàlem (Aronsson et al. 1988; Sousa et al. 1989), però és lleugerament més reduïda a les regions talàmiques, a l'amígdala central i al neocortex (Joëls and Vreugdenhil 1998). L'expressió de

receptors per a la NA pot coincidir en algunes àrees amb els de GR, com és el cas de l'escorça o l'hipocamp (Yapıcı-Eser et al. 2018; Lesuis et al. 2020).

La presència d'aquests receptors fa que les àrees on es troben siguin especialment vulnerables a l'estrès. De fet, durant els últims anys s'ha fet evident que els glucocorticoides indueixen efectes ràpids en l'activitat neuronal d'aquestes regions (Krugers et al. 2012).

1.3. Efectes de l'estrès sobre el sistema nerviós central

Com ja hem esmentat adès, tant el cortisol com la NA produïts durant les situacions estressants poden creuar la barrera hemato-encefàlica i generar diversos efectes en aquelles àrees cerebrals on s'expressen els seus receptors específics.

Així mateix, la duració de l'estrès és un factor molt important a considerar quan s'avalua el seu impacte sobre el sistema nerviós. L'estrès agut -esdeveniments estressants de curta duració però molt intensos, que posen en marxa la resposta a l'estrès durant curts períodes de temps- és capaç de potenciar funcions neuronals i millorar el rendiment cognitiu (Mcewen and Sapolsky 1995). Aquests estressors de curta duració generen una resposta fisiològica típica, la qual permet als individus reaccionar de manera molt eficient davant de situacions adverses, constituint una resposta adaptativa o de supervivència. Al contrari del que ocorre amb l'estrès agut, l'exposició prolongada a l'estrès pot induir una sèrie de canvis que modifiquen de manera més profunda la fisiologia de diverses regions del SNC, particularment les que són riques en receptors de glucocorticoides. Aquests canvis severos també es produeixen a nivell estructural i molecular tant en neurones principals com en interneurons (Radley and Morrison 2005; Radley et al. 2006; Gilabert-Juan et al. 2011, 2013). Moltes d'aquestes alteracions induïdes per l'estrès crònic són deletèries i poden comportar canvis comportamentals i dèficits en la cognició i l'aprenentatge.

És important destacar també que la densitat de GR a les diferents estructures del SNC varia depenent de l'edat dels individus (Dalm et al. 2005), propiciant que determinades regions siguin més vulnerables en algunes etapes de la vida. De fet, és conegut que en etapes primerenques, la quantitat de GRs que trobem a les principals estructures del sistema límbic és major que la densitat d'aquests receptors en edats més tardanes (Bizon et al. 2001).

Un altre aspecte molt important que s'ha de preveure en estudiar la neurobiologia de l'estrès és que les accions dels glucocorticoides poden ser diferencials depenent del sexe. Per tant, l'estrès té un

impacte diferent en mascles i en femelles. Açò és particularment important, perquè en algunes malalties psiquiàtriques on l'estrès pot ser un factor desencadenador, la prevalença és distinta entre sexes (Brivio et al. 2020). El nostre estil de vida actual, particularment a les societats occidentals, fa que estiguem sotmesos, sovint, a uns nivells d'estrès elevats i continuats, els quals, com hem vist, poden contribuir al desenvolupament de diverses malalties psiquiàtriques (Davis et al. 2017). En conseqüència, molts laboratoris centren la seua recerca a determinar quins són els efectes específics que diferents paradigmes d'estrès crònic produeixen al cervell. En la present tesi, pretenem contribuir a aquesta línia de treball analitzant els efectes de diferents models d'estrès crònic en rosegadors. Com que l'edat i el sexe són dos factors molt importants en la resposta a l'estrès, emprarem animals en diferents fases de la vida, així com mascles i femelles en aquests estudis.

2. POBLACIONS NEURONALS D'INTERÈS PER A L'ESTUDI DE L'ESTRÈS CRÒNIC

El sistema nerviós està format per diversos tipus cel·lulars, fonamentalment agrupats en neurones i cèl·lules de glia. Es considera que la neurona és la unitat funcional bàsica del cervell i és responsable de la generació i la transmissió dels potencials d'acció. Hi ha dos tipus de neurones al cervell: les excitadores o neurones principals, aquelles que promouen l'activació de la neurona amb la què contacten, i les inhibidores o interneurons, que són les que reprimeixen l'activitat de la neurona amb què contacten.

L'organització de les neurones en diverses capes i nuclis fa que el cervell es pugui dividir en diferents àrees específiques. La variabilitat de tipus neuronals que trobem al cervell és molt extensa. En la present tesi ens hem centrat en l'estudi dels canvis que produeix l'estrès crònic en poblacions de neurones principals i interneurons, localitzades en àrees especialment susceptibles a l'estrès.

2.1. Neurones piramidals

Les neurones piramidals són la població neuronal més abundant de l'escorça cerebral; representen al voltant del 80% de les cèl·lules que la componen (Kamigaki 2019). Podem trobar també neurones piramidals en algunes regions del sistema límbic, com l'amígdala (Spruston 2008).

El neurotransmissor principal d'aquestes neurones al cervell de mamífers és el glutamat i es caracteritza per ser un neurotransmissor excitador. Aquest se sintetitza al citoplasma cel·lular a partir de la glucosa i s'emmagatzema a les vesícules sinàptiques fins a la despolarització cel·lular, moment en el qual és lliurat a la fenedura sinàptica. El glutamat s'uneix a receptors específics, els quals indueixen la despolarització de la membrana plasmàtica de l'element postsinàptic. El glutamat s'incorpora a l'interior de les vesícules sinàptiques mitjançant els transportadors vesiculars de glutamat (VGLUT) (Takamori 2006). Existeixen tres tipus diferents d'aquests transportadors: les cèl·lules piramidals de l'escorça cerebral expressen específicament VGLUT-1 als seus terminals axònics, mentre que les neurones excitadores amb somes situats fora de l'escorça cerebral, expressen VGLUT-2 als seus terminals (Varoqui et al. 2002). El VGLUT-3 és menys abundant que els altres dos i el trobem a les cèl·lules serotoninèrgiques del nucli de la rafe, en acetilcolinèrgiques de l'estriat i gabaèrgiques de l'hipocamp i escorça (Gras et al. 2002; Somogyi et al. 2004; Horváth et al. 2018), a més, VGLUT-3 no sols es troba als terminals axònics, sinó que també podem observar-lo al cos cel·lular i a les dendrites

d'algunes neurones. En la present tesi, utilitzem el VGLUT-1 com marcador de sinapsis excitadores procedents de cèl·lules piramidals de l'escorça cerebral.

Com fa palès la seua denominació, el cos cel·lular d'aquestes neurones té una morfologia piramidal (Figura 2). De la part basal ix un axó que produeix nombrosos contactes excitadors glutamatèrgics. Les vesícules sinàptiques s'acumulen en uns eixamplaments localitzats a la part terminal de l'axó (botons terminals) o al llarg de la seua trajectòria (botons de pas). Quant a les dendrites, trobem dos dominis diferents: les dendrites apicals, que emergeixen de l'àpex del soma i es bifurquen diverses vegades formant l'arbre dendrític apical, i les dendrites basals, que ixen de la base del soma i estan menys desenvolupades que les de l'arbre apical (Spruston 2008). La morfologia i l'estructura de les neurones piramidals i del seu arbre dendrític varia depenent de l'àrea cerebral a la qual pertany, i fins i tot existeixen morfologies variables a les diferents regions de l'escorça (Spruston 2008).

Les dendrites d'aquestes neurones tenen unes estructures especialitzades per a la recepció de contactes sinàptics, anomenades espines dendrítiques. Aquestes tenen un cap o part eixamplada on reben la majoria de les sinapsis excitadores que arriben a la cèl·lula (Chidambaram et al. 2019). Per contra, la tija (*shaft*) de la dendrita rep contactes majoritàriament inhibidors, els quals també son freqüents sobre els cossos neuronals, al voltant del soma, sobre la regió coneguda com a regió perisomàtica (Kubota 2014).

Les espines dendrítiques varien considerablement en la seua forma i grandària i són estructures molt plàstiques (Qiao et al. 2016). El nombre d'espines dendrítiques es considera una estimació del nombre de sinapsis excitadores que rep la neurona i pot canviar amb l'experiència de l'individu. Algunes patologies psiquiàtriques i neurològiques cursen amb anomalies en la morfologia i el nombre d'espines dendrítiques (Forrest et al. 2018; Chidambaram et al. 2019).

Les espines es classifiquen morfològicament en tres tipus: 1) Les anomenades fines o "*thin*", que són allargades i dinàmiques. Aquestes són espines transitòries que emergeixen i desapareixen contínuament. 2) Les espines més grans tenen forma de fong i són anomenades "*mushroom*". Aquestes són més estables i reben una major quantitat de contactes sinàptics. Tenen un cap gran i un coll estret i curt. 3) I, finalment, les "*stubby*", que tenen una morfologia intermèdia entre les dues anteriors. En aquestes no s'aprecia una clara diferència entre el cap i el coll (Chidambaram et al. 2019) A més, trobem els filopodis, que es consideren els precursors de les espines. Aquests són estructures semblants a les espines "*thin*" però la seua longitud és major i són molt més mòbils i inestables (Chidambaram et al. 2019). Les espines "*thin*", "*stubby*" i els filopodis són més prevalents durant el

desenvolupament i es consideren espines immadures i més plàstiques. Val a dir que l'activació repetida d'una espina promou l'augment de la seua grandària i estabilitat (Qiao et al. 2016).

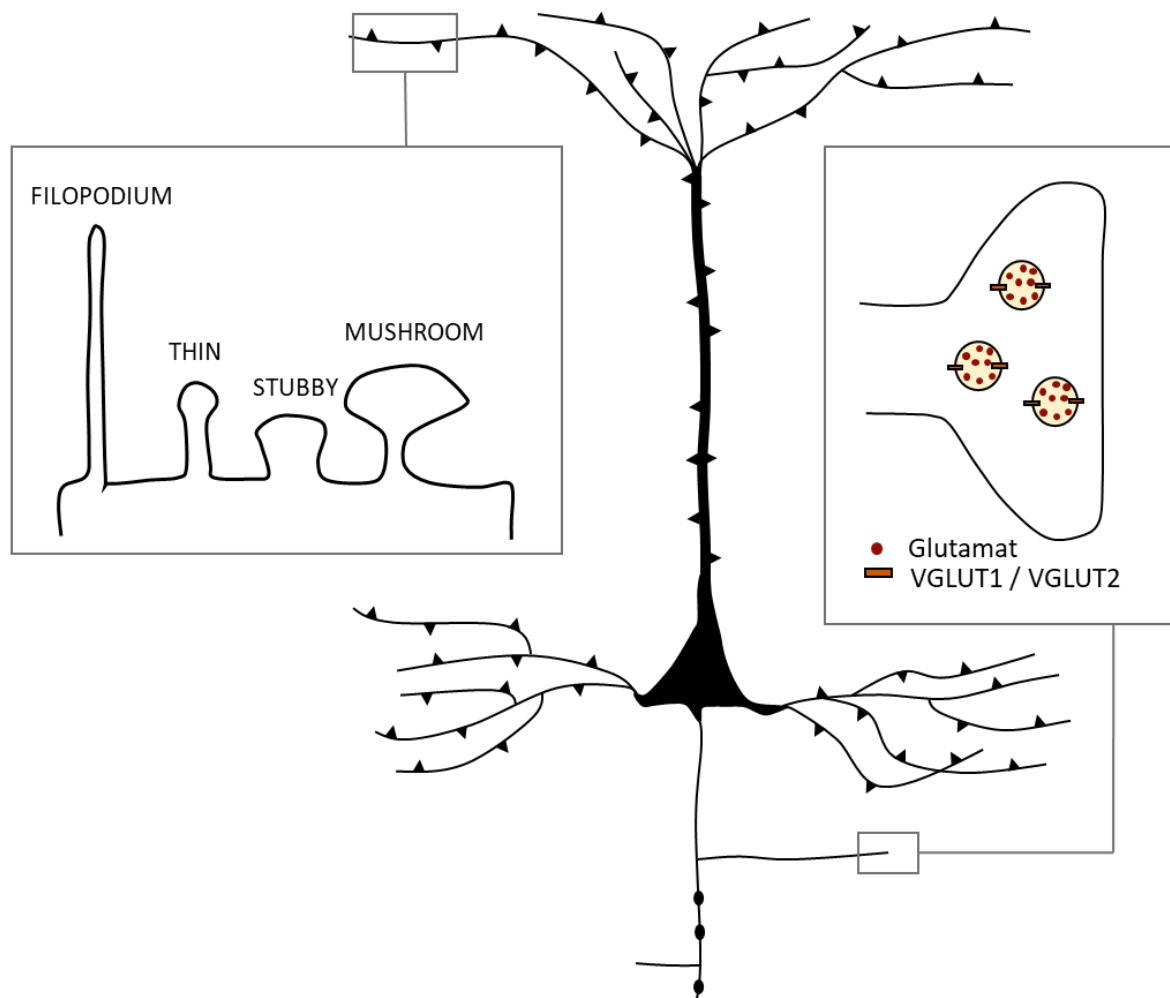


Figura 2: Representació gràfica de l'estructura d'una neurona piramidal, amb un soma en forma triangular, dos arbres dendrítics espinosos (apical i basal) i l'axó a la part basal, mostrant tres botons de pas. A l'esquerra, representació dels diferents tipus d'espines que trobem a les dendrites. A la dreta, un terminal axònic amb vesícules farcides de glutamat i amb el transportador vesicular corresponent depenent de si es una sinapsi d'una neurona cortical (VGLUT1) o extracortical (VGLUT2). VGLUT1/2: transportador vesicular de glutamat 1/2.

La plasticitat que caracteritza les neurones piramidals fa que siguin especialment susceptibles a alteracions en l'ambient. Poden adaptar o modificar les seues connexions i estructura responen a aquests canvis, particularment davant de les situacions estressants.

2.2. Interneurones

Tot i que la majoria de les cèl·lules del SNC són excitadores, també existeixen neurones inhibidores, les quals són essencials per al seu correcte funcionament. Aquest paper fonamental de les interneurones és evident perquè la seua estructura i fisiologia es troben alterades en diversos desordres neurològics i psiquiàtrics, com ara l'epilèpsia o l'esquizofrènia (van Bokhoven et al. 2018).

Les interneurones inhibidores constitueixen al voltant del 20-30% de les cèl·lules de l'escorça cerebral de mamífers (Hendry et al. 1987). Aquestes neurones regulen l'activitat de les cèl·lules piramidals. Fan servir a les seues sinapsis l'àcid gamma-aminobutíric (GABA), el neurotransmissor inhibitor per excel·lència (Kubota 2014). El GABA és sintetitzat a partir del glutamat per l'enzim glutamat-descarboxilasa (GAD). Aquest enzim té dues isoformes amb diferent pes molecular, anomenades GAD65 (65 KDa) i GAD67 (67 KDa). Ambdós enzims es troben en totes les cèl·lules GABAèrgiques, però la seua concentració varia depenent de la localització subcel·lular (Esclapez et al. 1994). Podem trobar, per tant, GAD67 al citoplasma dels cossos neuronals i GAD65 als terminals axònics (Esclapez et al. 1994). El GABA s'inclou a l'interior de vesícules sinàptiques amb l'ajuda del transportador vesicular de GABA (VGAT). El lliurament del GABA a l'espai sinàptic i la seua unió a receptors específics produeix la hiperpolarització de la membrana plasmàtica de la cèl·lula postsinàptica. En aquesta tesi hem utilitzat la detecció d'algunes d'aquestes molècules associades a la neurotransmissió GABAèrgica per a estudiar els efectes de l'estrès sobre les xarxes neuronals inhibidores.

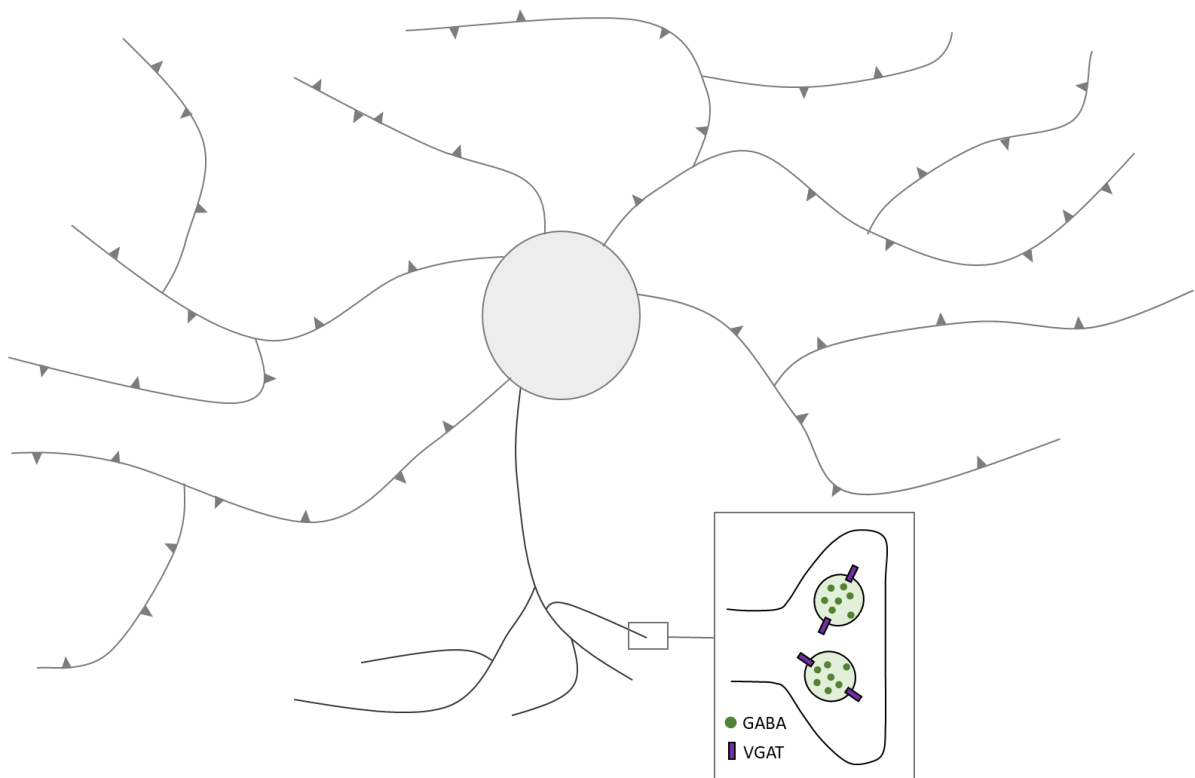


Figura 3: Representació gràfica de l'estructura d'una neurona inhibidora espinosa del SNC. Del soma ixen diferents prolongacions dendrítiques que es ramifiquen en totes direccions i presenten espines (triangles). A la part inferior trobem l'axó amb una representació del terminal axònic (quadre), on podem veure vesícules farcides amb neurotransmissor (GABA) i amb el transportador vesicular de GABA (VGAT) en la seua superfície. GABA: àcid gamma-aminobutíric. VGAT: transportador vesicular de GABA.

Encara que hi ha diversos tipus de neurones inhibidores a l'escorça cerebral, en aquesta introducció no farem una descripció de totes elles i ens centrarem únicament en les que són rellevants per a aquesta tesi.

Les interneurons es poden classificar per el territori que constitueix la seua diana postsinàptica; així trobarem neurones dels cistells (o *basket cells*), que tenen com a diana el soma de la cèl·lula postsinàptica, les interneurons canelobre (o *Chandelier cells*), que tenen com a diana el segment inicial de l'axó de la cèl·lula postsinàptica, i les interneurons *Martinotti* i interneurons *double bouquet*, que contacten amb les dendrites de les cèl·lules diana. Aquestes cèl·lules expressen diferents proteïnes d'unió al calci, com la parvalbúmina (PV), la calbindina (CB) i la calretinina (CR) així com neuropèptids com la somatostatina (SOM) i el polipèptid intestinal vasoactiu (VIP) o neurotransmissors no convencionals com l'òxid nítric (Benes and Berretta 2001). A més, aquestes interneurons es poden diferenciar per les propietats electrofisiològiques, que varien depenent de la subpoblació. El

percentatge de cadascuna d'aquestes varia segons l'espècie, la regió del cervell i la capa o nucli on estan situades (Markram et al. 2004).

Totes elles estan formades, com les neurones piramidals, per un soma o cos neuronal, un axó i un arbre dendrític. És interessant mencionar que sols algunes subpoblacions d'aquestes interneurons tenen espines a les dendrites (*Figura 3*) (Kisvárdy et al. 1990).

Es coneix que la majoria de les interneurons formen part de circuits locals, de manera que sols una petita proporció d'aquestes cèl·lules projecta cap a altres regions (Markram et al. 2004). Aquestes interneurons tenen com a funció principal mantenir l'estabilitat i el control del sistema. A fi d'assolir aquesta funció poden expressar diferents receptors, tant de neurotransmissors excitadors com inhibidors, als seus somes i dendrites, així com establir sinapsis amb neurones principals i altres interneurons. Algunes d'aquestes neurones també tenen receptors per a monoamines, neuropèptids, neurotransmissors no convencionals i hormones; totes aquestes molècules tenen papers molt rellevants en la regulació de la fisiologia interneuronal.

2.2.1. Interneurones *Martinotti* / O-LM

Es considera que el 20-30% de les interneurons del neocortex són del tipus *Martinotti* (Gonchar et al. 2008; Xu et al. 2010). Les trobem majoritàriament a les capes II i III, tot i que també estan presents, en menor mesura, a les capes IV, V i VI (Rudy et al. 2011; Yavorska and Wehr 2016). Els seus axons projecten, generalment, a la capa I, on s'arboritzen (Yavorska and Wehr 2016). A l'amígdala trobem també una subpoblació d'interneurones amb característiques semblants a les *Martinotti* d'escorça (McDonald and Mascagni 2002).

Tant les cèl·lules *Martinotti* com les homòlogues de l'amígdala es caracteritzen per l'expressió del pèptid SOM. Hi innerven generalment les parts distals de l'arbre dendrític de les cèl·lules piramidals (Kawaguchi and Kondo 2002; Markram et al. 2004; Wolff et al. 2014). També inhibeixen altres interneurons (Muller et al. 2007; Pfeffer et al. 2013) i reben inhibició recíproca d'aquestes (Yavorska and Wehr 2016). D'altra banda, es coneix que la majoria dels contactes que reben aquestes cèl·lules SOM+ procedeixen de cèl·lules piramidals situades al seus voltants (Riedemann 2019), tot i que les *Martinotti* de capes IV i V d'algunes regions de l'escorça, reben també innervació de cèl·lules excitadores situades al tàlem, projeccions colinèrgiques procedents del telencèfal (Obermayer et al. 2018) i projeccions serotoninèrgiques procedents del nucli del rafe (Riedemann 2019).

A l'hipocamp també trobem cèl·lules SOM+ amb una estructura i connectivitat semblants a les de les cèl·lules *Martinotti* del neocòrtex. Els somes d'aquestes cèl·lules generalment se situen a l'estrat *oriens* (O), on també trobem les seues dendrites. Per contra, la majoria dels seus axons s'estenen fins a l'estrat *lacunosum-moleculare* (LM) on s'arboritzen i on trobem els seus botons axonals. Per consegüent aquestes cèl·lules a l'hipocamp reben el nom de cèl·lules O-LM (Sik et al. 1995; Oliva et al. 2000). Les neurones O-LM estan innervades per neurones piramidals i reben el seu *input* sinàptic principal a l'estrat LM, lloc d'arribada de la via perforant procedent de l'escorça entorínica (EC), la qual cosa suggereix que aquestes cèl·lules controlen la informació procedent d'aquesta regió cortical (Sik et al. 1995).

Una característica fonamental de totes aquestes interneurons SOM+ que hem descrit, i que les diferencia de la major part d'altres subpoblacions d'interneurones, és que presenten nombroses espines dendrítiques. A banda de la seua participació en la circuiteria cortical, les interneurons SOM+ tenen un paper essencial en la maduració de l'escorça (Tuncdemir et al. 2016) i en altres moments del neurodesenvolupament, així com en la plasticitat neuronal i el desenvolupament d'algunes patologies cerebrals (Liguz-Leczna et al. 2016).

2.2.2. Interneurones de cistella (*Basket cells*)

Representen aproximadament el 50% de les interneurons corticals (Gonchar et al. 2008; Xu et al. 2010). Les cèl·lules de cistella expressen nombrosos neuropèptids, però es caracteritzen per l'expressió d'una de les dues proteïnes dependents de calci, PV o CB (Markram et al. 2004). La majoria de cèl·lules de cistella són de dispar ràpid (*fast-spiking*) i expressen PV, per contra, una fracció d'aquestes cèl·lules no té la propietat de dispar ràpid i es caracteritza per expressar colecistoquinina (CCK) i no PV. Les cèl·lules CCK positives expressen el receptor de serotonina tipus 3 (5-HT₃) (Morales and Bloom 1997) i, específicament en els seus terminals axònics, el receptor de cannabinoides de tipus 1 (CB₁R) (Katona et al. 1999; Freund 2003).

Les *basket cells* es troben majoritàriament a les capes III i IV del neocòrtex (Markram et al. 2004), tot i que també estan presents en menor mesura a la resta de capes (Yavorska and Wehr 2016). També es poden trobar cèl·lules de cistella a l'hipocamp (Freund 2003) i a l'amígdala (McDonald and Betette 2001; Rovira-Esteban et al. 2017).

Les neurones de cistella estan especialitzades en establir sinapsis amb el soma i les dendrites proximals de les cèl·lules piramidals (*Figura 4*). També fan aquest tipus de contactes sinàptics amb

altres interneurons (Pfeffer et al. 2013). Així doncs, s'anomenen cèl·lules de cistella per la morfologia característica dels seus terminals axònics, que envolten els somes de les cèl·lules diana, establint diversos contactes en una mateixa cèl·lula (Markram et al. 2004). Una altra característica fonamental d'aquesta subpoblació cel·lular és que cadascuna d'aquestes cèl·lules de cistella, estableix sinapsis amb els somes de diverses cèl·lules diana, particularment de neurones piramidals, de manera que contribueixen a la sincronització d'aquestes i al control del seu patró d'activació (Freund 2003; Kubota 2014).

Convé assenyalar que alguns treballs recents han mostrat com estímuls o experiències externes poden produir en aquestes cèl·lules de cistella diverses alteracions. Concretament en la subpoblació PV+ es pot produir remodelació axònica (Pieraut et al. 2014) i es pot alterar la plasticitat funcional en els contactes que reben i envien sobre les neurones excitadores (Seay et al. 2020). Les cèl·lules de cistella CCK+ presenten alteracions en els nivells de mRNA i en l'expressió d'algunes molècules rere diferents estímuls (Gruber et al. 2015). Tots aquests fets suggereixen que alteracions en aquest tipus neuronal poden tenir efectes notoris en la plasticitat global dels circuits en els quals estan implicades (Foggetti et al. 2019). Açò fa que l'estudi d'aquestes cèl·lules, tant les PV+ com les CCK+, siga d'especial interès per a nosaltres. En aquesta tesi he analitzat com afecta l'estrès a la seua morfologia i l'expressió de molècules relacionades amb la plasticitat.

2.2.3. Interneurones canelobre (Chandelier cells)

Són cèl·lules de dispar ràpid que expressen PV i CB. Les trobem majoritàriament en les capes II/III i V del neocòrtex i l'hipocamp (Inda et al. 2009) i a l'amígdala (McDonald and Betette 2001).

Els terminals axònics de les interneurons canelobre projecten sobre el segment inicial de l'axó de les piramidals (Somogyi 1977; Wang et al. 2016) (*Figura 4*), i constitueixen una font d'inhibició molt poderosa que té molta influència sobre la descàrrega d'aquestes neurones excitadores. L'activació d'aquestes cèl·lules es realitza de manera sincrònica i cadascuna d'elles innerva a diverses neurones piramidals, de manera que, com les neurones de cistella, també tenen un paper important en la sincronització d'aquestes (Taniguchi et al. 2013).

Totes aquestes subpoblacions neuronals que hem descrit fins ara estan relacionades entre si i el balanç entre el seu nombre, connexions i la seua activitat fa que siga possible el correcte funcionament dels circuits on estan implicades.

3. ÀREES IMPLICADES EN LA RESPOSTA A L'ESTRÈS

3.1 Escorça prefrontal

L'escorça prefrontal (PFC) és la part més anterior del neocòrtex. Està localitzada als lòbuls frontals del cervell, rostral respecte a l'escorça motora. Aquesta regió es troba estretament associada a la capacitat del control cognitiu, que entenem com a l'habilitat per executar voluntàriament un comportament concret, a fi d'arribar a un objectiu determinat en un entorn que pot variar (Luna et al. 2015). Açò inclou un ampli ventall de funcions, entre les que estan el control d'impulsos, la capacitat de fer plans a llarg termini, prendre decisions davant de diverses opcions (capacitat de judici), la resolució de problemes, la formació de la memòria de treball i el desenvolupament de les funcions executives (Leonard 2016; Carlén 2017; Kamigaki 2019). Així mateix, també té funcions relacionades amb la motivació i l'estat anímic (Dixon et al. 2017). Aquesta àrea neocortical rep i envia projeccions a escorces sensorials associatives, al sistema límbic (amígdala i el nucli septal, junt a la mateixa PFC) i al nucli dorsomedial del tàlem (Leonard 2016; Hika and Al Khalili 2020).

La PFC es divideix en l'escorça orbitofrontal (OFC) i l'escorça prefrontal medial (mPFC). La OFC és anàloga a l'àrea rhinal-insular en primats (Kolb et al. 2004) i està localitzada sobre les òrbites en què s'ubiquen els ulls. Aquesta regió està implicada en algunes funcions cognitives com la capacitat d'aprenentatge, en el processament emocional i en algunes funcions executives com la presa de decisions (Bechara et al. 2000; Kolb et al. 2004). La mPFC de rosegadors és anàloga a l'escorça dorsolateral i medial de primats. Aquesta regió està localitzada a la part frontal del neocòrtex, estableix connexions amb altres àrees corticals i extracorticals i està associada a funcions com la presa de decisions, la generació de memòries recents i antigues o la percepció sensorial (Brown and Bowman 2002; Dalley et al. 2004; Kolb et al. 2004).

En rosegadors, la mPFC està dividida en tres àrees: les escorces prelímbica, infralímbica i cingulada. L'escorça cingulada (Cg) (situada contigua al cos callós) rep connexions sensorials tant corticals com extracorticals i participa en la generació de regles associades a un ordre temporal i l'aprenentatge de la seqüenciació motora necessària per dur a terme una acció (Rolls 2019). L'escorça prelímbica (PrL) i l'escorça infralímbica (IL) formen l'anomenada mPFC ventral. Generalment es considera que la PrL (anàloga a la PFC dorsolateral en humans) està implicada en funcions executives, com són els processos atencionals o la memòria de treball, entre d'altres. A més, té un important paper en l'adquisició de la por (Granon and Poucet 2000; Sierra-Mercado et al. 2011). Finalment, la IL està associada al control autònom, a la generació de respostes i l'extinció de la por (Sierra-Mercado et al. 2011).

La configuració citoarquitectònica de la mPFC de rosegadors és similar a la d'altres mamífers i a la de la resta del neocòrtex. Consta de sis capes horitzontals, exceptuant la presència de la capa IV de cèl·lules granulars (Uylings et al. 2003), que en rosegadors és inexistent (*Figura 5*). Per tant, les capes que componen aquesta regió són:

- Capa I o capa molecular: És una capa que es caracteritza per la poca presència de cossos neuronals i una gran quantitat de dendrites apicals procedents de les capes profundes del neocòrtex. La majoria dels cossos neuronals que trobem a aquesta capa són d'interneurons. En aquesta capa les dendrites apicals de les piramidals reben aferències del tàlem i d'altres zones de l'escorça.

- Capa II o capa granular externa: En aquesta capa trobem majoritàriament neurones excitadores granulars. Les connexions d'aquesta capa són amb altres àrees corticals del mateix hemisferi cerebral.

- Capa III o capa piramidal externa: Es caracteritza per tenir neurones piramidals de talla mitjana, amb un arbre dendrític complex. Aquestes neurones projecten a altres àrees corticals i a la mateixa regió.

- Capa V o capa piramidal interna: Constituïda fonamentalment per neurones piramidals de gran mida. Aquestes neurones projecten fora de la regió, cap a altres àrees corticals o cap a estructures subcorticals.

- Capa VI o capa polimòrfica: Aquesta última capa és la més heterogènia de totes. En ella trobem algunes neurones piramidals que contacten amb neurones talàmiques. La complexitat d'aquestes neurones piramidals és menor que la de les que trobem en la capa III.

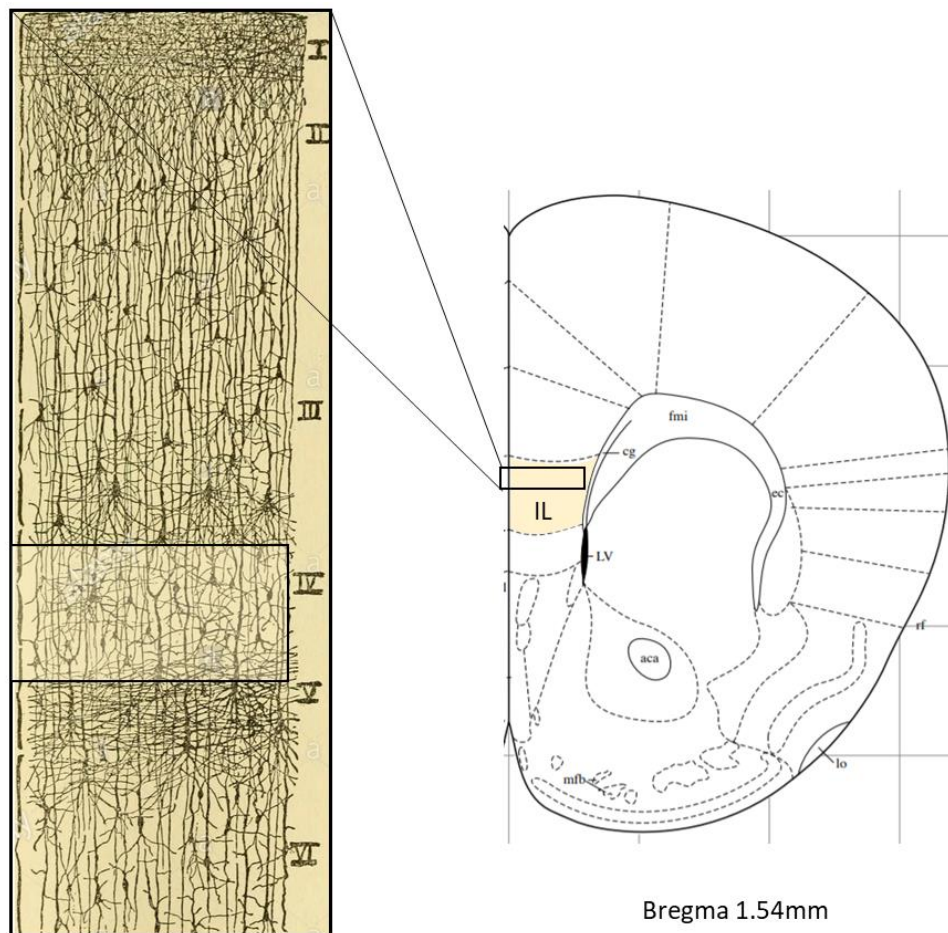


Figura 5: A la dreta representació gràfica de la situació de l'escorça infralímbica (IL) (Adaptació de Paxinos and Franklin's - 5th Edition) i l'esquerra la distribució cel·lular a les seues capes (Adaptació de Ramón y Cajal, 1909). Enquadrada la capa IV, que en rosegadors és inexistent. IL: escorça infralímbica.

La majoria de la informació procedent d'altres zones corticals arriba a les neurones piramidals de les capes V i VI (Dembrow et al. 2015).

El 80% de les neurones que trobem a la PFC són neurones piramidals glutamatèrgiques, el 20% restant són neurones inhibidores (Markram et al. 2004; Rudy et al. 2011). La població d'interneurones de l'escorça prefrontal és molt heterogènia (Wearne and Cornish 2019), però les més abundants i més interessants per a la present tesi són les cèl·lules PV+ i les SOM+ i, en menor mesura, les CCK+.

La PFC té un desenvolupament tardà respecte a la resta de regions cerebrals, acaba de desenvolupar-se durant l'adolescència. Aquest fet pot tenir conseqüències importants per a la cognició i el comportament, ja que la maduració estructural concorre junt a la maduració funcional. Per tant, durant l'adolescència, la PFC és particularment sensible a les experiències adverses, les quals poden

fins i tot promoure l'aparició de desordres psiquiàtrics com l'esquizofrènia o la depressió (Caballero and Tseng 2016; Shaw et al. 2020).

La gran presència de GR en aquesta àrea fa que siga evident la seua afectació amb l'estrès. Òbviament, els estressors tindran un major impacte durant les primeres fases de la vida (la infantesa i l'adolescència), quan està acabant-se de desenvolupar la PFC. Aquesta és la raó per la qual incloem la PFC com una de les àrees d'interès a la present tesi.

3.2 Hipocamp

L'hipocamp està localitzat a la regió medial del lòbul temporal. Està dividit en el gir dentat (DG) i en la banya d'Amon (CA). Aquesta darrera regió, a la seua vegada es divideix en quatre subregions (CA1-CA4).

Les subregions de la CA estan organitzades en diverses capes o estrats (*Figura 6*):

- *Oriens*: Capa on es troben les dendrites basals de les cèl·lules piramidals. Trobem també interneurons SOM i CB positives. També es poden trobar en aquest estrat les dendrites de les cèl·lules O-LM, els axons de les quals projecten a la capa de *Lacunosum-moleculare*.
- *Pyramidale*: formada majoritàriament per cèl·lules piramidals multipolars espinoses. Les dendrites basals d'aquestes són més curtes i projecten a l'estrat *Oriens*. Les dendrites apicals, són molt més llargues i travessen totes les capes de l'hipocamp fins arribar a la capa *Lacunosum-moleculare*. Trobem també interneurons CCK i PV positives.
- *Lucidum*: capa present únicament en CA3. És una capa estreta que es troba just baix de la capa de les piramidals i és el lloc d'arribada de les fibres molsoses.
- *Radiatum*: es troba baix de la capa piramidal en CA1 i CA2, i contigua a l'estrat *lucidum* en CA3. En aquest es poden trobar les sinapsis establertes pels axons de les neurones piramidals de CA3, les col·laterals de Shaffer.
- *Lacunosum-Moleculare*: a aquesta arriben les projeccions procedents de l'EC, així com els axons de les cèl·lules O-LM (Van Groen et al. 2002).

Així mateix, el DG també té una seqüència de capes característica:

- Molecular: està bàsicament constituïda per dendrites procedents de les neurones granulars i de les interneurons situades tant a la capa granular com a la polimòrfica. També trobem alguns cossos cel·lulars, principalment de interneurons VIP+, interneurons de cistella o interneurons canelobre.
- Granular: formada per cèl·lules granulars que projecten les seues dendrites apicals cap a la capa molecular. Els axons d'aquestes cèl·lules formen les fibres molsoses. Les dendrites de les neurones granulars també són espinoses.
- Capa polimòrfica o hilus: està formada per fibres axòniques que van al *lucidum* de CA3 (fibres molsoses) i per algunes interneurons. Entre l'hilus i la capa granular trobem interneurons de cistella que inhibeixen les cèl·lules granulars. També es troba una població de cèl·lules excitadores anomenades *mossy cells*, que envien axons cap a l'estrat molecular.

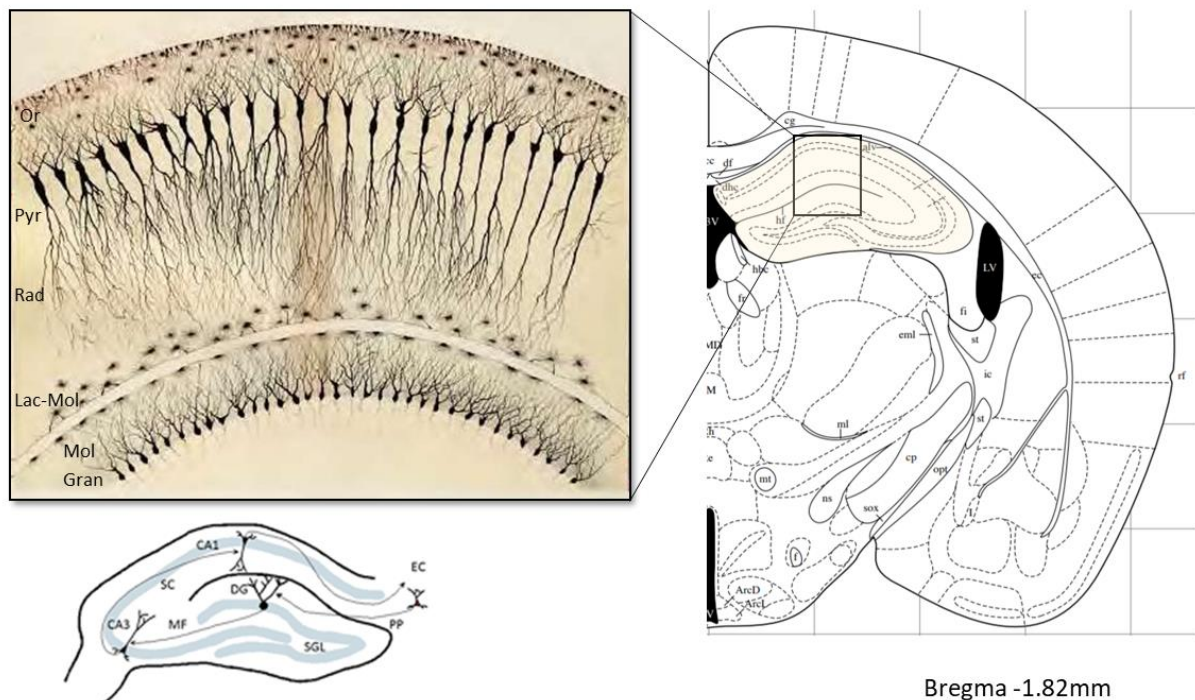


Figura 6: A la dreta representació gràfica d'un tall coronal on es pot veure l'estructura de l'hipocamp (Adaptació de Paxinos and Franklin's - 5th Edition). Dalt a l'esquerra dibuix de la distribució cel·lular a les capes de l'hipocamp de conill, similar a la distribució que trobem en rosegadors (Adaptació de GOLGI 1903). Baix a l'esquerra, circuiteria interna de l'hipocamp (Arslan-Ergul et al. 2013). Or: estrat oriens. Pyr: estrat piramidal. Rad: estrat radiada. Lac-Mol: estrat *lacunosum-moleculare*. Mol: estrat molecular. Gran: estrat granular.

L'hipocamp rep connexions aferents del septum, de l'hipotàlem (a través del fòrnix), de l'EC, el locus coeruleus, nuclis del rafe, nucli reuniens i de l'amígdala (Knierim 2015). Les seues projeccions eferents van al nucli accumbens (a través del fòrnix), al nucli septal, a l'amígdala, al nucli preòptic de l'hipotàlem, a l'estriat ventral i a altres porcions del lòbul frontal. També projecta cap a l'EC.

L'hipocamp té un característic circuit intern que comunica les subregions que el conformen. L'entrada principal de connexions que rep l'hipocamp prové de l'EC, per l'anomenada via perforant. La via perforant connecta l'EC amb les cèl·lules granulars del DG. El DG projecta a les cèl·lules piramidals de CA3, on s'estableix una segona sinapsi. En aquest cas, la via que connecta DG i CA3 s'anomena "via de les fibres molsoses" (Scharfman 2016). Les neurones piramidals de CA3 projecten a les de CA1 (tercera sinapsi) a través de les col·laterals de Schaffer i, finalment, les neurones piramidals de CA1 tanquen el circuit projectant novament a l'EC (Knierim 2015). Antigament es considerava que aquest circuit era unidireccional, però, estudis recents han mostrat com l'EC també projecta a CA3 i a CA1. És interessant esmentar que, encara que es pensava que la regió CA2 era una regió de transició entre CA1 i CA3, actualment se sap que té les seues pròpies funcions i és independent de les altres dues (Tzakis and Holahan 2019).

La regió hipocàmica té un paper fonamental en la generació de noves memòries i és una de les més afectades en les malalties neurodegeneratives.

L'hipocamp és una regió molt sensible a les situacions estressants a causa de la presència d'una gran densitat de GR, particularment presents al DG (Kirby et al. 2013). És per açò que hem considerat aquesta àrea una de les més interessants per al seu estudi i l'hem inclòs al nostre treball.

3.3. Amígdala

L'amígdala és una estructura localitzada en el lòbul temporal anterior del cervell (de bregma -0.18 a bregma -2.98). Està composta per diferents subnuclis interconnectats, cadascun amb una estructura i composició cel·lular específica.

L'amígdala forma part de l'anomenat sistema límbic, el qual és responsable del control de les emocions i dels comportaments associats, així com de la formació de memòries emocionals. A més, s'encarrega de la integració de l'entrada d'informació sensorial, la generació de respostes davant de situacions de por, la modulació d'aquestes respostes segons les circumstàncies en què es produeixen i l'extinció de la por (Sah et al. 2003). És també un centre important en el circuit del reforç (Janak and Tye 2015). L'amígdala s'encarrega de coordinar la resposta autonòmica, endocrina i de comportament

en els estímuls relacionats amb la por i l'ansietat. Molts d'aquests estímuls es consideren estressants i, per tant, aquesta regió es troba implicada en la resposta a l'estrès.

L'amígdala pot dividir-se en dues regions, l'amígdala basolateral (BLA) i l'amígdala central (CeA). La BLA està composta de diversos nuclis, com són el nucli lateral de l'amígdala (LA), el nucli basal (BA) i el nucli basomedial (BM) (Janak and Tye 2015). Aquests estan compostos per neurones principals glutamatèrgiques i algunes neurones inhibidores (Sah et al. 2003). La CeA està formada pel nucli central lateral (CeL) i el central medial (CeM) (Janak and Tye 2015). Aquesta darrera regió està composta per cèl·lules majoritàriament GABAèrgiques (Sah et al. 2003; Ehrlich et al. 2009).

D'altra banda, és conegut que l'amígdala està implicada en el processament i en la memòria olfactiva. En aquest sentit, lesions de la BLA produeixen una reducció de la resposta comportamental que es produeix com a conseqüència dels olors dels depredadors (Takahashi 2014). La fonamental implicació de l'amígdala en el sistema olfactiv li dona la capacitat de relacionar determinades olors amb situacions estressants i això fa que es desenvolupi la resposta a l'estrès sols amb la presència de l'olor en qüestió.

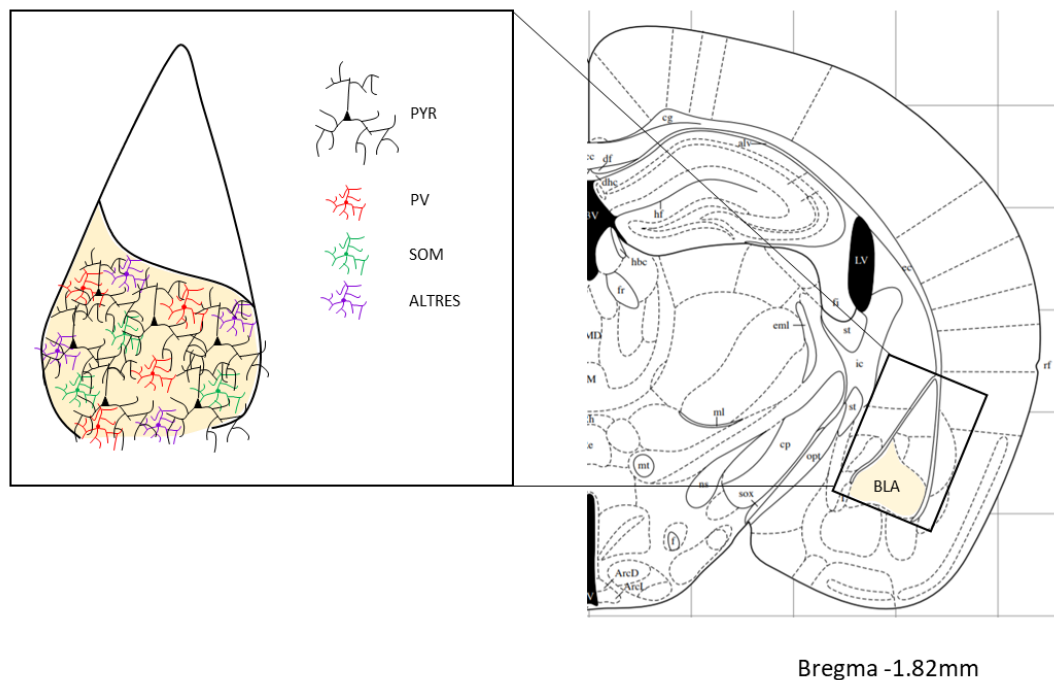


Figura 7: A la dreta representació gràfica d'un tall coronal on es pot veure l'amígdala, i assenyalada amb color salmó l'amígdala basolateral (BLA) (Adaptació de Paxinos and Franklin's - 5th Edition). A l'esquerra un esquema de les subpoblacions cel·lulars que trobem en aquesta regió, en negre les piramidals (PYR), en roig les interneurons PV+, en verd les interneurons somatostatina positives (SOM) i en morat es representen la resta de subpoblacions d'interneurons presents.

Se sap que el 50% de les interneurons que trobem a l'amígdala són PV+ (Rainnie et al. 2006), tot i que també se'n poden trobar SOM+ (Muller et al. 2007) (*Figura 7*).

Les connexions eferents internes de l'amígdala van de LA a BA i de CeL a CeM. Així mateix, se sap que la BLA projecta a la CeA (Ehrlich et al. 2009). CeM envia connexions a l'hipotàlem i al tronc cerebral, les quals estan implicades en els processos de coordinació de la resposta autonòmica i motora. A més, l'amígdala projecta i rep projeccions del tàlem, dels nuclis septals, del nucli accumbens, de la PFC i de l'hipocamp (Sah et al., 2003; Pitkänen, 2000).

Aquesta àrea ha sigut inclosa al nostre treball, ja que es troba estretament interconnectada amb l'hipocamp i amb la mPFC. A més, és una regió particularment sensible als efectes de l'estrès.

3.4. Nucli Reticular Talàmic

El nucli reticular talàmic (TRN) prové de l'anomenat tàlem ventral (Pinault 2004), i està localitzat entre la càpsula interna i la lamina medular externa (Gerardo and Manuel 2020). El TRN constitueix l'única porció del tàlem que no projecta a l'escorça, tot i que sí rep connexions glutamatèrgiques de la capa VI d'aquesta. També rep projeccions del tronc cerebral i projecta a altres parts del tàlem, concretament a nuclis específics del tàlem dorsal. Es considera que el TRN és bàsicament un punt de regulació de les connexions que van del tàlem dorsal al neocòrtex (Ferrarelli and Tononi 2011; Pratt and Morris 2015) (*Figura 8*).

La funció d'aquest nucli és modular l'activitat del tàlem dorsal exercint l'anomenada inhibició lateral, que permet modular les connexions talamo-corticals, fent que s'amplifiqui la informació rellevant i es reduïska la informació irrellevant (Ferrarelli and Tononi 2011; Pratt and Morris 2015). El TRN està format pràcticament en la seua totalitat per cèl·lules GABAèrgiques (de Biasi et al. 1986; Ferrarelli and Tononi 2011) majoritàriament PV+ (Steullet et al. 2018).

3.5. Habènula

És una regió bilateral que, junt amb la glàndula pineal, forma l'epitàlem (*Figura 8*). Es divideix en l'habènula medial (MHb) i la lateral (LHb) (Concha and Wilson 2001; Aizawa et al. 2011).

L'habènula s'encarrega de modular els circuits dopaminèrgics i serotoninèrgics del mesencèfal (Aizawa et al. 2011; Stephenson-Jones et al. 2012), promovent o inhibint la síntesi d'aquestes

monoamines. Açò és possible a causa de que l'habènula es troba connectada amb l'àrea ventral tegmental (VTA) i el nucli del rafe (RN) (Herkenham and Nauta 1979; Lecourtier et al. 2008; Aizawa et al. 2011). A més, l'habènula rep projeccions procedents del sistema límbic i dels ganglis basals, i té una connexió recíproca amb la glàndula pineal (Herkenham and Nauta 1977; Aizawa et al. 2011).

Aquests circuits dels quals l'habènula en forma part, estan implicats en una gran quantitat de fenòmens fonamentals, com la son, el control motor i l'aprenentatge per recompensa-càstig entre d'altres (Hikosaka 2010).

Així doncs, les neurones de l'habènula s'hiperactiven amb una gran varietat d'estressors (Wirtshafter et al. 1994; Metzger et al. 2019). Els efectes d'aquesta hiperactivació neuronal poden provocar la reducció de l'activitat dels ganglis basals, així com la menor síntesi de dopamina, cosa que pot comportar una falta de motivació i una reducció de l'activitat motora (Metzger et al. 2017, 2019). Per tant, l'activació d'aquestes neurones produeix respostes autonòmiques similars a les que ocorren en l'estrès emocional (Ootsuka and Mohammed 2015; Jacinto et al. 2017; Metzger et al. 2019).

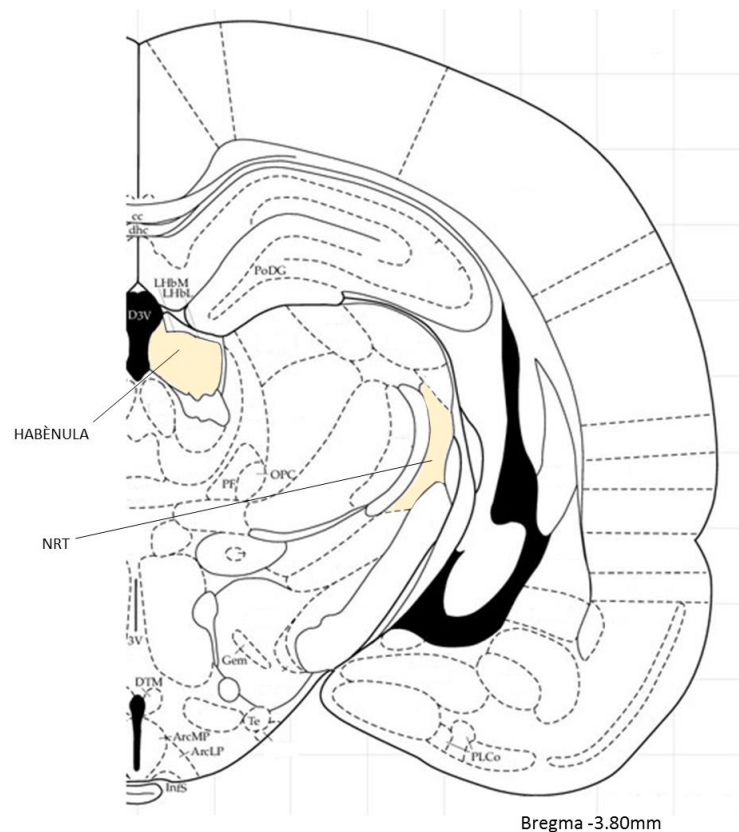


Figura 8: Representació gràfica d'un tall coronal on es pot veure l'habènula i el nucli reticular talàmic (TRN) remarcats en color salmó (Adaptació de Paxinos and Franklin - 5th Edition).

4. PLASTICITAT DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

Al llarg de les últimes dècades, la visió clàssica sobre l'estabilitat i la poca flexibilitat del sistema nerviós adult trontolla perquè diversos estudis han demostrat que els circuits neuronals són extremadament dinàmics i poden ser remodelats a través de les experiències (Fu and Zuo 2011; Nacher et al. 2013). Els efectes d'aquests estímuls recauen sobre diverses poblacions neuronals i es donen tant a nivell estructural (fent que varie el nombre d'espines dendrítiques, la morfologia dels arbres dendrítics o la densitat de botons axònics) com a nivell sinàptic (canvis en l'expressió de molècules relacionades amb l'eficiència de la neurotransmissió). A més, aquest remodelat pot ser ben diferent depenent de la regió cerebral que hi considerem (McEwen and Morrison 2013). L'habilitat dels circuits neuronals d'adaptar la seua connectivitat en funció d'estímuls o experiències s'anomena plasticitat. Convé assenyalar que la plasticitat del sistema és ben complexa i pot tenir efectes en algunes funcions cognitives.

En aquest treball hem volgut entendre com afecten diferents tipus d'estressors crònics a la plasticitat estructural del SNC d'individus adults i juvenils, especialment a les neurones inhibidores.

4.1. Plasticitat estructural

La plasticitat estructural es pot definir com el conjunt de canvis morfològics que experimenten les neurones sota els efectes de diferents estímuls. Aquests canvis morfològics són el resultat d'adaptacions a nivell molecular, com poden ser canvis en l'expressió de proteïnes de citoesquelet, de molècules d'adhesió o alteracions en els components de la matriu extracel·lular.

Tant l'estudi de la complexitat de l'arbre dendrític (analitzada habitualment amb el mètode de *Sholl*; (Sholl 1953)), com l'estudi de la densitat, morfologia i dinàmica de les espines dendrítiques o de la densitat i grandària dels botons axònics, són paràmetres que ens donen una visió prou acurada de com es veu afectada estructuralment l'entrada d'informació en la cèl·lula diana (Forrest et al. 2018).

Diversos estudis han mostrat com l'estrès crònic produeix efectes sobre l'estructura tant de neurones excitadores (McEwen 1999) com de neurones inhibidores (Gilabert-Juan et al. 2013). En aquesta tesi hem fet servir el mètode de *Sholl* per a realitzar l'anàlisi de l'arborització dendrítica i hem estudiat la densitat d'espines dendrítiques per a entendre com afecta l'estrès crònic a l'estructura de diverses subpoblacions cel·lulars.

4.2. Connectivitat

Com ja he assenyalat prèviament, els diferents estímuls poden tenir un efecte en la connectivitat entre les cèl·lules del sistema. En aquest cas diversos paràmetres poden ser estudiats per a entendre com es veuen afectats diferents nivells de la neurotransmissió. Actualment, la majoria dels treballs realitzen estudis sobre la densitat de receptors de neurotransmissors excitadors o inhibidors en l'element postsinàptic, estudis dels transportadors vesiculars de l'element presinàptic, estudis del nombre de sinapsis actives en el sistema i estudis sobre els enzims que sintetitzen els neurotransmissors en l'element presinàptic, entre d'altres opcions (*Figura 9*).

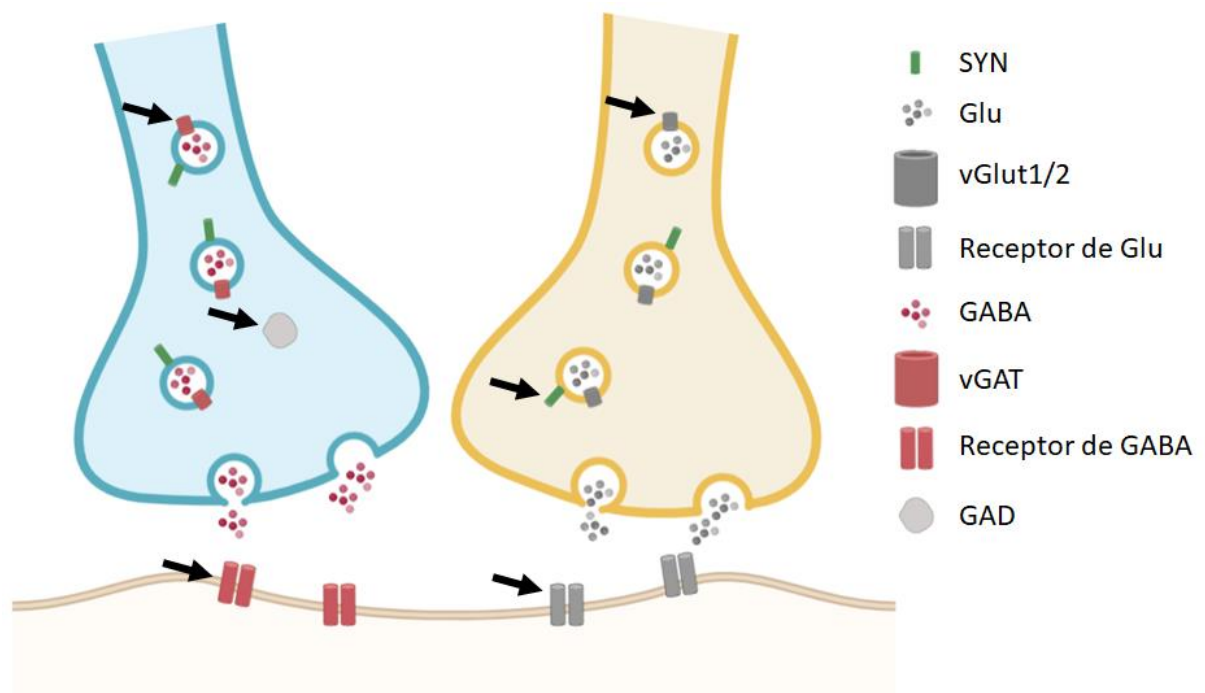


Figura 9: Esquema on es mostra una sinapsi GABAèrgica (blava) i una glutamatèrgica (grogua). Totes les proteïnes vesiculars i enzims d'interès per a aquesta tesi es troben esquematitzats al diagrama. SYN: sinaptofisina. Glu: Glutamat. vGlut1/2: transportadors vesiculars de glutamat. GABA: àcid gamma-aminobutíric. vGAT: transportador vesicular de GABA. GAD: enzim àcid glutàmic-descarboxilasa.

Per a l'estudi de la connectivitat fem servir diverses molècules presents específicament en els elements de la neurotransmissió excitadora o inhibidora que ja hem comentat en l'apartat 2.1 i 2.2 d'aquesta tesi.

4.3. Molècules relacionades amb la plasticitat

Actualment es coneixen diverses molècules relacionades amb la plasticitat, com és el cas de la forma polisialitzada de la molècula d'adhesió cel·lular neuronal (PSA-NCAM). Aquesta molècula és el resultat de l'addició de l'àcid polisialílic (PSA), que està carregat negativament, a la molècula d'adhesió cel·lular neural (NCAM), procés que duen a terme els enzims polisialiltransferases (ST8SialII i ST8SialIV) (Figura 10). NCAM és una immunoglobulina que es troba situada a la membrana cel·lular i estableix contactes cèl·lula-cèl·lula a través dels seus dominis externs. La polisialització de NCAM genera una molècula carregada negativament amb propietats antiadhesives, que faciliten la plasticitat estructural en el SNC (Rutishauser 2008).

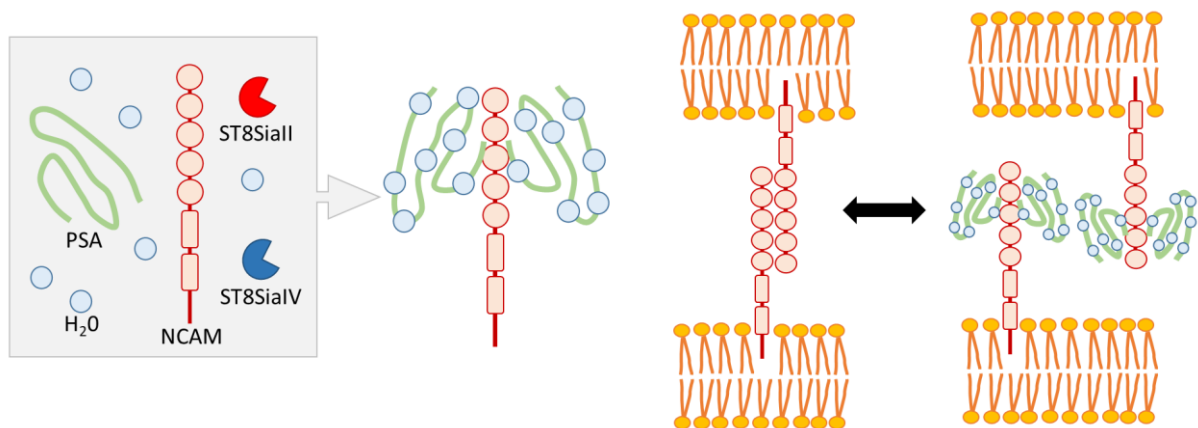


Figura 10: A l'esquerra, representació esquemàtica dels components que formen part de la polisialització de NCAM i la seua conformació final després de l'actuació dels enzims (ST8SialII i ST8SialIV). A la dreta, esquema d'una unió homotípica entre dues NCAM i com la incorporació de PSA produeix la separació de les dues molècules de NCAM. PSA: àcid polisialílic. NCAM: molècula d'adhesió cel·lular neural.

La PSA-NCAM s'expressa abundantment durant el desenvolupament, moment en què està implicada en processos com la migració neuronal, la sinaptogènesi o l'extensió de les neurites (Rutishauser 2008). En el SNC adult, la seua expressió és molt més reduïda: Podem trobar-la en neurones immadures de les zones neurogèniques i en una subpoblació de cèl·lules situades en la capa II de l'escorça, però també hi trobem PSA-NCAM en algunes neurones GABAèrgiques madures situades

al neocòrtex, a l'hipocamp i a l'amígdala (Nacher, Lanuza, et al. 2002; Varea et al. 2005; Nacher et al. 2013). De fet, estudis portats a terme al nostre laboratori demostren que les neurones principals excitadores madures de l'escorça cerebral adulta no expressen PSA-NCAM (Gómez-Climent et al. 2011), exceptuant algunes subpoblacions situades a l'hipocamp, que expressen aquesta molècula en els seus axons (Seki and Arai 1999).

Quant a les interneurons madures de l'escorça, se sap que aquelles que presenten PSA-NCAM reben menys connexions perisomàtiques, el seu arbre dendrític és més reduït i tenen una menor presència d'espines dendrítiques quan comparem amb interneurons que no expressen aquesta molècula (Gómez-Climent et al. 2011).

Recentment s'ha vist que la depleció de la PSA que es troba unida a la NCAM, mitjançant l'ús d'enzims com l'Endoneuraminidasa-N (EndoN), produeix plasticitat estructural i altera la connectivitat d'aquestes interneurons (Castillo-Gómez et al. 2016). Així mateix, l'expressió de la PSA-NCAM es troba alterada en alguns desordres neuropsiquiàtrics (Nacher et al. 2013). És per això que es considera que la PSA-NCAM es troba mitjançant la plasticitat estructural en les interneurons de l'escorça d'individus adults i és d'especial interès l'estudi dels efectes de l'estrès sobre aquesta molècula.

4.4. Matriu extracel·lular

Unes altres estructures que es troben molt relacionades amb la plasticitat del sistema nerviós central són les xarxes perineuronals (PNNs), les quals són regions especialitzades de la matriu extracel·lular (ECM) del SNC que envolten de manera estreta alguns tipus de neurones (Wang and Fawcett 2012; Testa et al. 2019). Les PNNs van ser descrites per primera vegada per Camillo Golgi al 1882. Des d'ençà s'han realitzat nombrosos estudis per a esbrinar la seua composició i les seues funcions. Aquestes estan compostes per un esquelet d'àcid hialurònic (HA), que té ancorades una família de quatre proteoglicans de condroitinín-sulfat (CSPGs): agregà, neurocà, brevicà i versicà. També presenten tenascina-R, una glucoproteïna que uneix els CSPGs entre ells per a formar una estructura més estable juntament amb altres proteïnes que contribueixen a la unió de tots els components, com l'àcid hialurònic-sintasa, que uneix l'esquelet amb la superfície de les cèl·lules o l'HAPLN2 (proteïna d'unio a l'HA número 2), que uneix els CSPGs a l'HA (Testa et al. 2019) (*Figura 11*). Tot i això, cal remarcar que la composició de les PNNs varia depenent de la regió cerebral (Dauth et al. 2016).

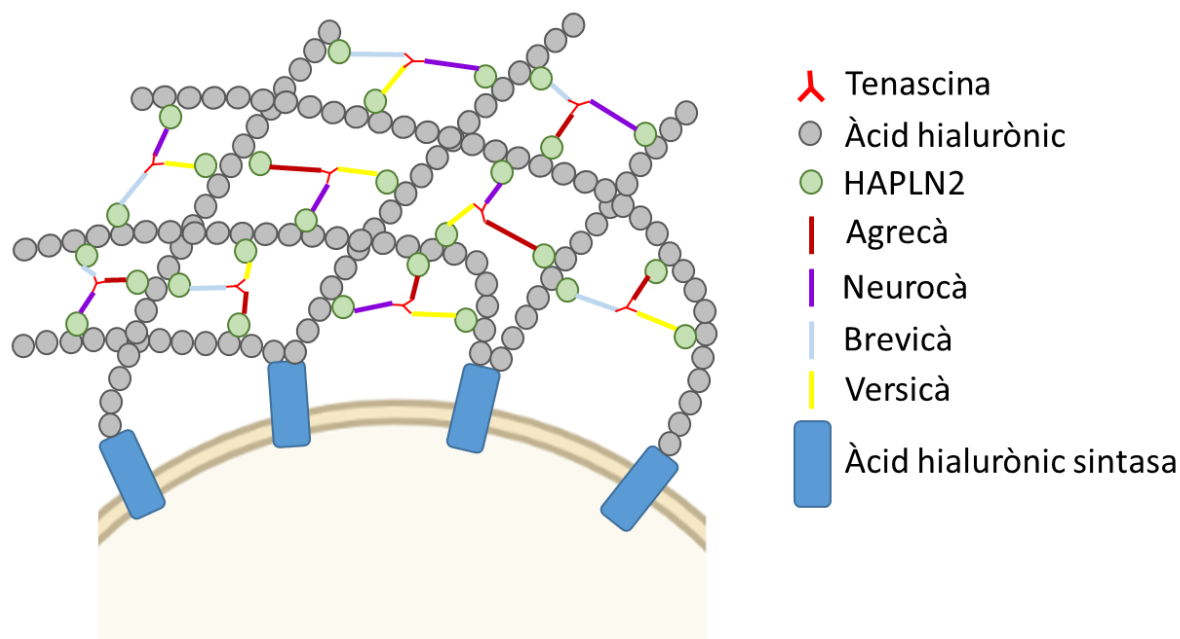


Figura 11: Representació esquemàtica dels components de les xarxes perineuronals (PNNs) i la seva distribució i organització. HAPLN2: proteïna d'unió a l'àcid hialurònic número 2.

Existeixen diversos mètodes per visualitzar les PNNs. En aquesta tesi, nosaltres fem servir la lectina de l'aglutinina *Wisteria floribunda* (WFA), la qual té afinitat pels residus de N-acetilgalactosamina presents als CSPGs (Young and Williams 1985; Nakagawa et al. 1986).

Podem trobar PNNs al voltant d'algunes neurones piramidals situades en les capes profundes del neocòrtex, però, la gran majoria d'elles es troben associades a les cèl·lules que expressen PV (Härtig et al. 1992a; Brückner et al. 1993; Alpár et al. 2006; Spijker et al. 2020). Específicament, les trobem envoltant el soma, el segment inicial de l'axó i els segments proximals de les dendrites de les interneurons PV+ (Wang and Fawcett 2012).

L'aparició de les PNNs té lloc al final del desenvolupament cerebral, quan la majoria de les connexions es troben establertes i es produeix l'estabilització, la sinaptogènesi, el refinament sinàptic, la mielinització i la maduració dels circuits del SNC. Malgrat que no està clara la seua funció, el seu període d'aparició suggereix que les PNNs estan implicades en la protecció, desenvolupament i plasticitat neuronal i en l'estabilització sinàptica (Wang and Fawcett 2012).

És ben sabut que la depleció o la disrupció de les PNNs mitjançant un enzim anomenat condroitinasa ABC (ChABC), el qual degrada el condroitin-sulfat dels CSPGs, produeix efectes en l'activitat cel·lular i afecta la capacitat d'aprenentatge i de memòria (Testa et al. 2019). De fet, s'ha vist

que alteracions en les PNNs estan presents en alguns dels desordres psiquiàtrics més comuns, com són l'esquizofrènia, la depressió i el desordre bipolar (De Luca and Papa 2016; Pantazopoulos and Berretta 2016; Alcaide et al. 2019).

La seua gran implicació en l'estabilització i maduració dels circuits del SNC juntament amb l'evident necessitat de la seua presència per al correcte funcionament neuronal, fan que siga extremadament interessant estudiar com estan afectades després de diversos processos d'estrès i quines són les conseqüències d'aquestes alteracions.

5. IMPACTE DE L'ESTRÈS SOBRE EL SISTEMA NERVIÓS

5.1. Impacte de l'estrès sobre el sistema nerviós adult

Tot i que l'estrès crònic afecta tant a les neurones principals com a les interneurons, la majoria d'estudis s'han focalitzat a entendre què és el que passa amb les neurones excitadores. Se sap que l'estructura de les neurones piramidals es troba alterada en individus que han patit llargs períodes d'estrès. Aquesta experiència adversa produeix atròfia dendrítica i disminueix la densitat d'espines dendrítiques en neurones principals de la mPFC (Radley et al. 2004, 2005) i de l'hipocamp (Sousa et al. 2000; Chidambaram et al. 2019). Per contra, produeix els efectes oposats en les neurones principals de la BLA (Vyas et al. 2002).

D'altra banda, l'estrès crònic afecta de manera diferencial a diverses subpoblacions d'interneurons. Concretament, s'han vist efectes en les interneurons PV+, les quals constitueixen la subpoblació majoritària en les principals àrees d'interès d'aquesta tesi. Individus estressats crònicament mostren una disminució del nombre de cèl·lules PV+ en l'hipocamp i una disminució de l'àrea ocupada per de les dendrites d'aquestes cèl·lules (Milner et al. 2013; Csabai et al. 2017). En la regió IL de la PFC es produeix també una disminució d'aquesta subpoblació de cèl·lules (Czéh et al. 2018). Finalment, se sap que l'activació d'aquestes cèl·lules i la seua funcionalitat també es pot veure afectada per l'estrès: a la PFC l'activació de les cèl·lules PV+ és major en individus estressats (Page and Coutellier 2019).

Altres subpoblacions d'interneurons, com són les SOM positives, també mostren alteracions en animals sotmesos a situacions estressants cròniques. Czéh i col·laboradors (Czéh et al. 2015) trobaren que a l'hipocamp la densitat de cèl·lules SOM disminueix en individus estressats crònicament durant la vida adulta. Estudis previs al nostre laboratori basats en un protocol d'immobilització crònica d'individus adults, han posat de manifest que a la PFC també hi ha una menor densitat de cèl·lules SOM+ i que l'estructura d'aquestes interneurons també es veu afectada en situacions d'estrès crònic, exhibint un augment de la seua arborització dendrítica en la PFC (Gilabert-Juan et al. 2013) i una disminució d'aquesta en l'amígdala (Gilabert-Juan et al. 2011). Actualment, no existeix cap estudi on es reflectisca què és el que passa amb l'estructura de les neurones SOM+ a l'hipocamp, una àrea especialment afectada per l'estrès crònic, així que aquest aquest ha sigut un dels objectius de la present tesi.

Ara bé, canvis com els prèviament esmentats, els quals afecten a l'estructura, la connectivitat i la fisiologia de les interneurons contribueixen a produir variacions en els contactes sinàptics tant inhibidors com excitadors que reben les neurones piramidals (Zaletel et al. 2016).

A més, l'estrès crònic produeix alteracions sobre les molècules relacionades amb la plasticitat neuronal. Per consegüent, trobem augments en l'expressió de PSA-NCAM en l'hipocamp d'individus estressats (Sandi et al. 2001; Sandi 2004) mentre que a l'amígdala els nivells d'aquesta molècula es troben reduïts (Castillo-Gómez et al. 2017). Les PNNs també són sensibles a l'estrès, i mostren alteracions en individus crònicament estressats: es percep un increment del nombre d'aquestes estructures a la regió CA1 de l'hipocamp i, també, específicament, un augment del nombre d'interneurons PV+ envoltades per PNNs (Riga, Kramvis, et al. 2017).

Totes aquestes perturbacions induïdes per l'estrès crònic generen desequilibris en els nivells d'excitació i inhibició dels circuits neuronals afectats. L'equilibri d'aquest balanç d'excitació i inhibició és extremadament important per al correcte funcionament del cervell.

Totes les alteracions en el camp neuroquímic, estructural i fisiològic poden arribar a exterioritzar-se provocant comportaments poc comuns en individus sans. Les situacions d'estrès crònic produeixen comportaments ansiosos i relacionats amb la depressió, com un augment de la immobilitat (Mudra Rakshasa and Tong 2020), una reducció de la locomoció dels individus estressats i del seu caràcter explorador (Palanza 2001), anhedònia (Csabai et al. 2018) i una tendència a evitar espais oberts i lluminosos (Stairs et al. 2020).

5.2. Impacte de l'estrès sobre el sistema nerviós juvenil

Els individus juvenils i els adults no reaccionen de la mateixa manera a l'estrès. Així, les adaptacions que es produeixen davant dels estressors en etapes juvenils incrementen el risc del desenvolupament de psicopatologies en adults (McCormick and Green 2013; Juruena et al. 2020). En ratolins, la infantesa es considera des del naixement fins a P21. L'etapa peripubertal va de P21 fins a P46, tot i que la maduresa sexual no s'assoleix fins a P60, moment a partir del qual són considerats individus adults. Entre P47 i P59 es considera que es troben en el període d'adolescència tardana (Tirelli et al. 2003).

En rosegadors existeix una major quantitat de GR en els individus juvenils (P0-P89) que als adults (>P90) i açò és en part responsable de la major vulnerabilitat als estressors (Murphy et al. 2002). El desenvolupament tardà de la PFC, que es dona en gran mesura en les etapes pubertals (P21-P46) (Shaw et al. 2020), també és un candidat a ser responsable de que la susceptibilitat siga major en les primeres etapes de la vida. Durant la pubertat, alteracions en aquesta regió cortical poden produir un desenvolupament incorrecte de les connexions que les seues cèl·lules estableixen entre elles i amb altres regions cerebrals.

En etapes juvenils, l'estrès també afecta tant a les neurones excitadores, o principals, com a les inhibidores (o interneurons), sobre les quals produeix efectes diferencials depenent de la subpoblació estudiada.

Quant a les neurones excitadores, s'ha vist que rere un període d'estrès crònic en la pubertat, es troba reduït l'espai sinàptic en les neurones piramidals de capa III de la mPFC en mascles. Açò té lloc específicament en les porcions distals de les branques apicals. A més a més, es troba reduïda l'arborització dendrítica d'aquestes neurones, i s'estima que un total del 30% de les sinapsis axoespinoses es perden (Radley et al. 2005, 2006, 2008; Bloss et al. 2010, 2011). La dramàtica pèrdua d'aquestes sinapsis i els efectes estructurals es poden recuperar després de tres setmanes en animals joves, encara que normalment es recuperen millor en regions proximals que en distals (Goldwater et al. 2009; McEwen et al. 2015). Aquesta recuperació no es pot veure quan l'estrès es produeix en etapa adulta (Bloss et al. 2010). Farrell i col·laboradors (Farrell et al. 2016) van desenvolupar un protocol d'estrès en etapes primerenques de la vida (P2-P20) en rata, on veieren que la morfologia de les cèl·lules piramidals de la IL es trobava afectada en els animals estressats, mostrant aquests una major longitud de les dendrites apicals que les cèl·lules dels animals controls (Farrell et al. 2016).

Hi ha evidències que demostren que en alguns models on se sotmet als individus a adversitats en etapes primerenques, les interneurons es troben afectades. De la mateixa manera que en adults, la subpoblació d'interneurons PV+ és extremadament sensible a aquests estímuls, cosa que fa que

trobem alteracions en diferents paràmetres relacionats amb aquesta subpoblació després de sotmetre els animals a períodes llargs d'estrès en les primeres fases de la vida. Protocols d'estrès perinatal produeixen un augment en la densitat d'aquestes cèl·lules PV+ en BLA i CA1 però, per contra, al DG i a la IL trobem una reducció (Seidel et al. 2008; Murthy et al. 2019; Gildawie et al. 2020; Ohta et al. 2020). Pel que fa a la subpoblació d'interneurons SOM+, un treball del nostre laboratori ha fet palès que aquestes varien també la seua estructura en animals aïllats des de l'etapa juvenil fins a l'adult (P21-P90). Aquest tipus d'estrès produeix un augment en la densitat d'espines dendrítiques de les cèl·lules SOM+ en la PFC, tot i que no altera l'estructura de les de l'amígdala (Castillo-Gómez et al. 2017).

La plasticitat neuronal i les molècules relacionades amb ella també es veuen afectades per l'estrès en etapes primerenques. Respecte a la PSA-NCAM, un estudi on es va aplicar un protocol d'estrès en l'etapa juvenil (P27-P29), mostrà com augmentava l'expressió d'aquesta molècula a l'hipocamp i la BLA just després del protocol d'estrès i aquest efecte perdurava fins a la vida adulta (Tsoory et al. 2008). Les PNNs també es veuen afectades per aquest tipus d'estrès en etapes primerenques: en la PFC, després de curts períodes d'estrès (P28-P35), el nombre de PNNs és major en els animals estressats, però, si augmentem el període d'estrès fins a 15 o 35 dies, les PNNs disminueixen (de Araújo Costa Folha et al. 2017). A més, la intensitat de fluorescència de les PNNs es veu reduïda a l'hipocamp i a la IL en animals estressats durant la pubertat (P21-P30) (Ueno et al. 2018).

De la mateixa manera que les alteracions que es produeixen sobre les neurones excitadores, modificar l'estructura, activació o connectivitat de les interneurons també contribueix al desequilibri entre l'excitació i la inhibició del sistema. Actualment se sap ben poc sobre com afecta l'estrès crònic en etapes primerenques a l'equilibri entre excitació i inhibició. Aquest és un dels punts que mirarem a la present tesi, ja que diversos treballs realitzats en individus adults on el desequilibri està relacionat amb malalties neuropsiquiàtriques fan evident la importància de la correcta proporció entre els components excitadors i els inhibidors (Page and Coutellier 2019).

Finalment, hi ha evidències que aquest tipus d'estrès en etapes primerenques (P21-P30) produeix hiperlocomoció (i, per tant, una major distància recorreguda), al contrari que en el cas dels adults estressats (Ueno et al. 2018; Safari et al. 2020). Estudis recents mostren com adults que van ser estressats en etapa peripubertal han reduït el seu comportament explorador respecte als que no foren estressats (Tsoory et al. 2008).

Com es mostra en el present punt, la majoria dels estudis realitzats fins a l'actualitat es desenvolupen quan els individus estan en la seua infantesa (P0-P20) i només uns pocs treballs han sigut desenvolupats en les etapes peripubertals. En aquesta tesi ens centrem en l'estudi d'individus

juvenils en l'etapa peripubertal, que es troben entre els dies 21 i 46 de vida. És conegut que l'exposició repetida a diferents estressors durant el període peripubertal produeix un augment de l'ansietat i de comportaments depressius quan aquests individus són adults (McCormick and Green 2013) i és per això que considerem que aquesta etapa és d'especial interès.

6. DIFERENCIES SEXUALS EN LA RESPOSTA A L'ESTRÈS

El sexe, de la mateixa manera que l'edat, juga un paper important en la vulnerabilitat a l'estrès. De fet, les dones són més susceptibles que els homes a desenvolupar desordres psiquiàtrics en els que l'estrès es considera un factor de precipitació, com són la depressió o l'ansietat (Kessler 2003; Bangasser and Valentino 2014). El risc de patir depressió en dones, tant adolescents com adultes, és prop de dues voltes major que en homes (Waraich et al. 2004). S'ha vist que els nivells de cortisol en pacients que pateixen depressió són més alts en dones que en homes (Nandam et al. 2020). Açò és degut a que els estrògens augmenten la sensibilitat a l'ACTH, cosa que contribueix a incrementar la síntesi de corticosterona en les femelles (Figueiredo et al. 2007). Estudis de neuroimatge han mostrat com respostes a estímuls emocionals són també diferents en homes i en dones, de manera que davant d'estímuls aversius l'amígdala té una major activació en les primeres (Lebron-Milad et al. 2012).

És evident que els efectes diferencials que es donen per l'estrès, tant a nivell comportamental com a nivell morfològic, són dependents del sexe. Però, actualment no hi ha molts treballs que mostren com afecta el mateix tipus d'estrès a individus de diferent sexe. La majoria dels estudis que trobem publicats s'han realitzat en models animals.

A nivell de l'estructura neuronal és ben conegut que la maduració dendrítica de les neurones piramidals de la PFC ocorre més prompte en les femelles que en els mascles (Markham et al. 2013). També se sap que els mascles tenen dendrites més complexes i un major nombre d'espines dendrítiques en les neurones piramidals de la mPFC que les femelles (Markham et al. 2013). Podem dir amb certesa que aquest efecte és hormonal, ja que si castrem o ovariectomitzem els animals quan són neonats no trobem aquestes diferències (Kolb et al. 2004). Així mateix, altres estudis mostren com la mPFC té un volum major en homes (Ball et al. 2012; Ruigrok et al. 2014). Aquest dimorfisme sexual reflecteix les diferències en la distribució de receptors d'hormones sexuals i implica que idèntics tractaments o estimulacions poden generar respostes o canvis diferents en mascles i en femelles.

Açò fa que siga d'especial interès realitzar els estudis en individus de tots dos sexes i entendre com diferents protocols d'estrès poden afectar de manera diferencial a cadascun dels grups.

En la present tesi he realitzat els darrers treballs partint d'aquesta premissa, tot i que els treballs realitzats amb anterioritat al laboratori no han pogut ampliar-se per tal de completar l'estudi amb mascles i femelles.

7. MODELS EXPERIMENTALS UTILITZATS

L'ús de models animals és imprescindible per a poder entendre els canvis moleculars i estructurals que es donen en el cervell en situacions d'estrès prolongat o depressió. El millor model de depressió és aquell que simula la etiologia d'aquest desordre i que replica els símptomes, el desenvolupament i el tractament de la depressió humana (Vollmayr and Henn 2003).

Malauradament no existeix un model animal que siga completament equivalent a aquesta patologia humana. En aquest sentit es fan servir diferents mètodes per a simular els factors o esdeveniments que promouen el desenvolupament del desordre psiquiàtric, i que produeixen l'aparició de diversos aspectes específics del comportament o dels símptomes típics d'aquest.

Actualment hi ha una gran varietat de models animals de depressió que es troben acceptats per la comunitat científica com a estratègies d'estudi d'aquesta psicopatologia. Tots ells utilitzen estímuls estressants que no són controlables per part dels individus que els pateixen i que es prolonguen durant una gran quantitat de dies. La natura dels estímuls aversius, la seua variabilitat dins del mateix protocol i la durada tant de les sessions individuals com del protocol complet són els factors fonamentals que varien entre els diferents models acceptats (Czéh et al. 2016).

En la present tesi he utilitzat dos models diferents d'estrès crònic; l'estrès per restricció i l'estrès impredecible. El primer dels dos l'hem fet servir en dos treballs diferents variant la durada del protocol. Tots dos models tenen l'objectiu comú d'entendre com diferents situacions d'estrès crònic afecten al SNC, i concretament quins són els seus efectes sobre les interneurons i la seua plasticitat.

7.1. Estrès per restricció

Aquest model consisteix a realitzar una immobilització o restricció de la mobilitat dels individus durant un temps determinat i repetir la restricció al llarg d'un període de temps concret.

Al 1959 Renaud va realitzar el primer protocol d'estrès crònic predecible per *restraint* per tal d'estudiar la necrosi cardíaca (Renaud 1959) que posteriorment va ser modificat per altres autors fins arribar a ser actualment, el model més estès i acceptat per la comunitat científica.

Generalment, aquest protocol es realitza tots els dies i té una durada que pot estar entre 1 i 7 setmanes i des d'1 hora fins a 6 hores al dia. La durada del protocol dependrà dels objectius de l'estudi. Així, al final de la primera setmana, els individus sotmesos a aquest tipus d'estrès no mostren cap

diferència comportamental respecte als individus controls i, per aquesta raó la majoria de protocols busquen allargar l'aplicació de l'estímul estressant fins a un mínim de 10 dies consecutius (Wood et al. 2003).

Els resultats d'aquest model són variats: s'ha vist que produeix alteracions en la morfologia i funcionalitat tant de cèl·lules excitadores com d'inhibidores de diverses àrees cerebrals (Conrad et al. 1999; Gilabert-Juan et al. 2011, 2013), augmenta els nivells de corticosteroides i promou l'aparició de comportaments agressius (Wood et al. 2003), així com depressius, juntament amb la mort cel·lular per apoptosi (Zhang et al. 2014).

Es considera que aquest és un bon model que simula les experiències estressants predictibles que pateixen les persones de manera contínua, dia rere dia, com podrien ser situacions estressants socials, familiars o en el treball (Wang et al. 2017).

En aquesta tesi hem fet servir dues versions d'aquest model.

7.1.1. Restricció al llarg de 21 dies (1h/dia)

En el primer dels treballs, realitzàrem un protocol d'estrès crònic per restricció durant 1 hora al dia al llarg de 21 dies.

Per a aquest treball férem servir una soca de ratolins transgènics Tg(GadGFP-45704Swm) que expressa EGFP sota el promotor modificat de GAD67, cosa que permet veure marcada una subpoblació específica d'interneurones que expressen SOM (Oliva et al. 2000; Gilabert-Juan et al. 2013).

El protocol es va realitzar en ratolins mascles de 3 mesos, els quals van ser introduïts en un tub transparent de plàstic de 50mL. La grandària del tub no permetia als animals moure's amb facilitat, de manera que aquests es trobaven immobilitzats durant el temps acordat. Els animals del grup control foren manipulats durant 1 minut amb l'objectiu d'evitar els possibles efectes que pot produir la manipulació dels animals per part dels investigadors.

Vint-i-quatre hores després de l'última sessió de restricció, tots els animals (tant controls com estressats) van ser eutanitzats i perfosos transcardialment (*Figura 12*).

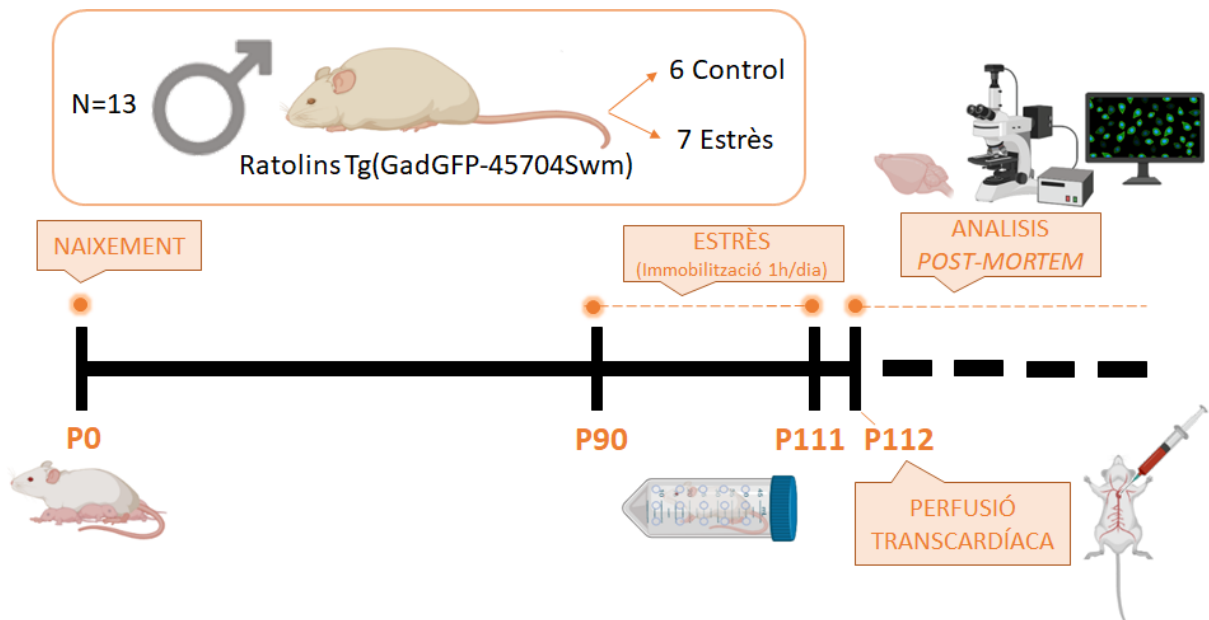


Figura 12: Representació esquemàtica del protocol experimental desenvolupat.

Posteriorment es va procedir a realitzar les següents anàlisis, que trobem redactades i publicades en el capítol 1 de la present tesi:

- Estudi de la complexitat de l'arbre dendrític de les interneurons SOM+ de la capa *Oriens* de les regions CA1 i CA3 de l'hipocamp.
- Estudi de la densitat d'espines dendrítiques de les interneurons SOM+ de la capa *Oriens* de les regions CA1 i CA3 de l'hipocamp.
- Estudi de la expressió de les molècules GAD67, PSA-NCAM i sinaptofisina (SYN) en les diferents capes que componen les regions CA1 i CA3 de l'hipocamp.

7.1.2. Restricció al llarg de 10 dies (6h/dia)

Al segon treball realitzarem el mateix protocol d'estrès crònic, però, aquesta vegada la restricció va ser de 6 hores al dia al llarg de 10 dies consecutius.

Els animals utilitzats per a aquest treball foren rates mascles Sprague-Dawley de 13 setmanes de vida (adults).

Per a fer la restricció, en aquest cas fem servir malles metàl·liques que tancaven pels dos extrems. Les rates immobilitzades es van situar a les seues caixes habituals durant tot el protocol d'estrès. Els animals controls foren manipulats pels investigadors durant 1 minut els dies corresponents al protocol d'estrès.

Vint-i-quatre hores després de l'última sessió de restricció, tots els animals (tant controls com estressats) van ser eutanitzats i perfosos transcardialment (*Figura 13*).

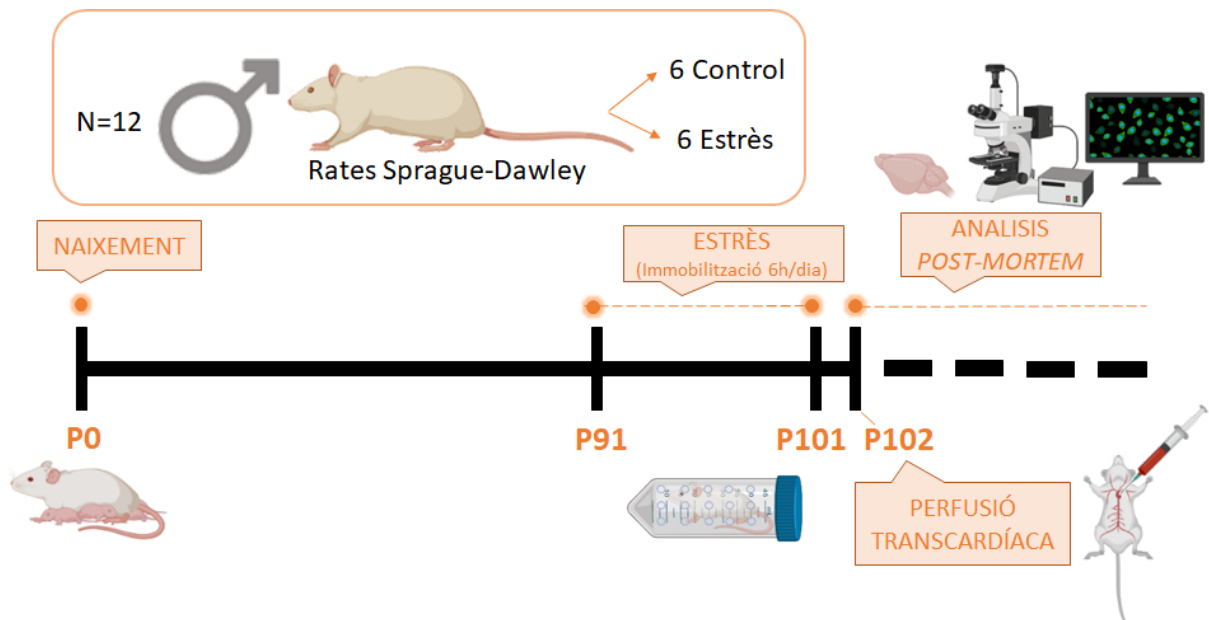


Figura 13: Representació esquemàtica del protocol experimental desenvolupat.

Posteriorment es va procedir a realitzar les següents anàlisis, que les trobem redactades i publicades en el capítol 2 de la present tesi:

- Quantificació dels nivells de expressió de PSA-NCAM en hipocamp dorsal/ventral, PrL, IL, Cg1 i amígdala.
- Quantificació del nombre de cèl·lules PV+ en la mPFC (PrL, IL, Cg1), BLA, hipocamp (CA1) i TRN.

- Quantificació del nombre de PNNs en la mPFC (PrL, IL, Cg1), BLA, hipocamp (CA1), TRN i habènula.
- Quantificació del nombre de cèl·lules PV+ rodejades de PNNs en la mPFC (PrL, IL, Cg1), BLA i hipocamp (CA1).
- Anàlisi de la innervació perisomàtica sobre les neurones excitadores de BLA i mPFC. Estudi de la presència/absència de PV als contactes SYN+.

7.2. Estrès crònic impredecíble (UCMS)

En aquest cas, el protocol d'estrès és ben diferent de l'anterior. Es busca tenir una gran varietat d'estímuls estressants i es combinen entre ells de manera semialeatòria. Generalment, s'aplica més d'un mateix estressor en cada sessió. El principal tret d'aquest model és el fet que els estímuls aversius no segueixen cap ordre predictible per a l'individu que els pateix, de manera que generen un estat d'ansietat pel desconeixement. A més, moltes voltes no es realitzen sessions d'estrès tots els dies consecutius, és a dir, es pot deixar algun dia sense sessió per tal d'augmentar la impredecibilitat i disminuir el procés d'adaptació dels individus.

Al 1981 Katz va realitzar el primer protocol d'estrès crònic impredecíble (Katz 1981). Posteriorment, Willner i col·laboradors van adaptar aquest model i van generar un amb microestressors, un tant més ètic i vàlid etiològicament (Willner et al. 1987; Willner 2005). A partir d'aquest moment, diferents autors utilitzaren aquesta i altres combinacions d'estímuls estressants per a generar els diferents models que s'han utilitzat fins ara.

Aquest model generalment s'utilitza en animals en etapa pubertal tot i que també és un model vàlid per a animals adults (Hollis et al. 2013). El protocol sol tenir una durada d'entre 2 i 8 setmanes i cada dia se solen realitzar dues sessions d'estrès amb més d'un estimul aversiu per sessió (Hill et al. 2012).

L'aplicació d'aquest model d'estrès crònic durant l'etapa peripubertal és especialment interessant a causa del moment del desenvolupament cerebral en que es troben els individus i la gran vulnerabilitat del SNC en aquesta etapa.

Després de l'aplicació dels diferents estressors de manera impredecíble, se sap que els individus desenvolupen comportaments depressius i ansiosos (Papp et al. 1991) i s'ha vist que quan l'etapa estressant es produeix durant el període peripubertal (PPS), els canvis comportamentals perduren fins

que els individus són adults (Walker and Sandi 2018). Així mateix, altres models de PPS també mostren alteracions en l'expressió de receptors cel·lulars, en la funció mitocondrial (Papilloud et al. 2018) i en l'expressió de gens relacionats amb l'excitació i la inhibició del sistema (Tzanoulinou, Riccio, et al. 2014).

En la present tesi, fem ús d'un protocol desenvolupat al laboratori de la professora Carmen Sandi, del EPFL de Lausanne, Suïssa, en el qual seguint les premisses dels estudis realitzats anteriorment pel seu grup, s'han realitzat diverses modificacions per tal d'adaptar els protocols de PPS impredecible en rates (Tzanoulinou, Riccio, et al. 2014; Papilloud et al. 2018) per a aplicar-lo en ratolins. Així doncs, tant el nostre grup de treball com el de la professora Sandi hem dut a terme el mateix protocol, mostrat a l'últim treball d'aquesta tesi, amb l'objectiu de comparar els resultats i entendre com afecta el PPS impredecible als individus adults.

Aquest model pretén simular els estressors forçats que viuen els éssers humans en el seu dia a dia de manera més realista, on no sempre l'estímul estressant és el mateix i no sempre es produeix en un moment esperat per l'individu.

7.2.1. Estrès peripubertal impredecible

L'últim dels treballs que es presenten en aquesta tesi consisteix a realitzar un protocol d'estrès impredecible tant a ratolins mascles com femelles en l'etapa peripubertal (entre P28 i P42). Durant aquest període els animals van ser sotmesos a diversos estressors diferents, distribuïts en dies no contigus (Figura 14). Els individus dels grups control foren manipulats durant 1 minut pels investigadors en cadascuna de les sessions d'estrès.

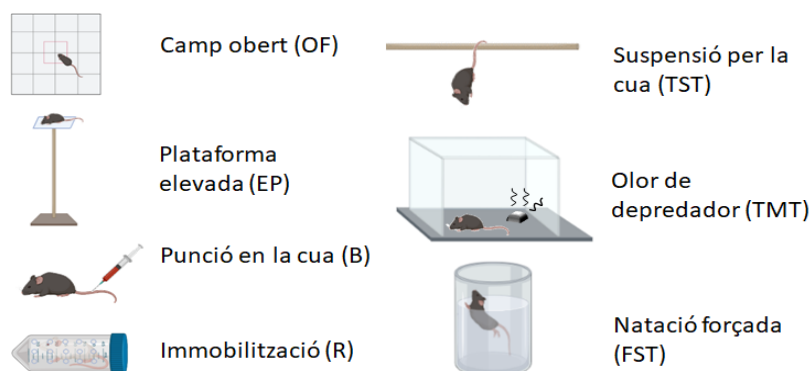


Figura 14: Definició gràfica dels estressors utilitzats durant el protocol d'estrès peripubertal.

Tres dies després de la fi del protocol d'estrès (P45), tant els animals estressats com els controls van passar dos tests de comportament: open field (OF) i splash sucrose test (SPLASH).

Posteriorment vam deixar passar 40 dies sense manipular als animals i ja quan eren adults tornarem a realitzar tots dos tests comportamentals (P84) (Figura 15).

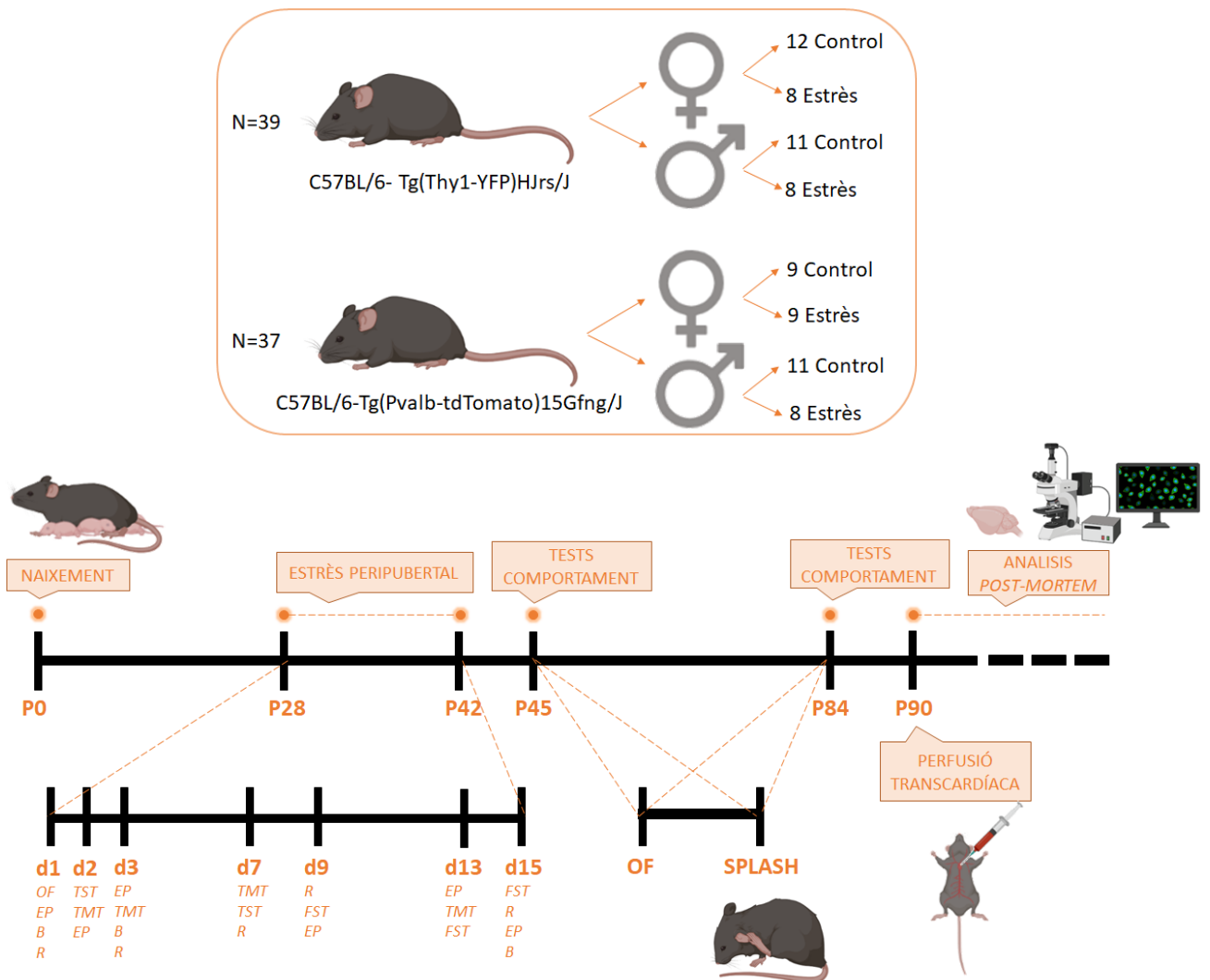


Figura 15: Representació esquemàtica del protocol experimental desenvolupat.

Finalment els animals foren eutanitzats i perfosos transcardialment a P90. En el cas de les femelles, vam realitzar prèviament un frotis vaginal per a comprovar el moment del cicle estral en què es trobaven. Les vam eutanasiar i les vam perfondre en l'etapa de Diestre (entre P90 i P95).

Amb el teixit *postmortem* es va procedir a realitzar les següents anàlisis, que les trobem redactades en el capítol 3 de la present tesi:

- Estudi dels efectes de l'estrès peripubertal en els tests comportamentals de l'OF i SPLASH tant en animals juvenils com en adults.
- Anàlisi de la densitat de puncta vGLUT+ i vGAT+ i com es troba afectada per l'estrès la relació entre totes dues proteïnes a la IL.
- Quantificació del nombre de cèl·lules PV+ en la IL.
- Estudi dels efectes de l'estrès peripubertal en la complexitat de l'arbre dendrític i en la densitat d'espines dendrítiques de les cèl·lules PV+ de la IL.
- Anàlisi de la innervació perisomàtica sobre les neurones piramidals de la IL. Estudi de la densitat de puncta PV+ i CB1R+.
- Anàlisi de la innervació perisomàtica sobre les interneurons PV+ en la IL. Estudi de la densitat de puncta CB1R+.
- Estudi de la densitat d'espines dendrítiques de les neurones piramidals de la IL.
- Estudi de la densitat de PNNs, de les cèl·lules PV+ envoltades per PNNs i de la densitat de cèl·lules PSA-NCAM+.

Amb la recopilació de les dades obtingudes amb els diferents protocols resumits prèviament, es pretén entendre com afecten diferents protocols d'estrès crònic a l'estructura de diferents subpoblacions d'interneurons, a la connectivitat d'aquestes amb les neurones piramidals i a la plasticitat del sistema.

II. OBJECTIUS

Objectiu principal general

Entendre com afecten diferents protocols d'estrès crònic (tant desenvolupats en adult com en etapa juvenil) a diverses àrees del cervell que estan estretament lligades a la resposta front a l'estrès.

Objectius secundaris generals

- Entendre com l'estrès crònic afecta a diverses subpoblacions de neurones inhibidores del SNC.
- Entendre com l'etapa de la vida en que s'indueix l'estrès té una influència en els efectes que aquest provoca.
- Entendre com afecta l'estrès tenint en compte el sexe dels individus.
- Entendre com l'estrès crònic afecta a la plasticitat neuronal i a les molècules relacionades amb aquesta en diverses àrees del SNC.

Objectius específics

- Entendre com afecta l'estrès crònic de 21 dies per restricció d'1 hora al dia a l'estructura de la subpoblació de cèl·lules inhibidores SOM+ de la capa *Oriens* de l'hipocamp.
- Entendre com afecta l'estrès crònic de 21 dies per restricció d'1 hora al dia a diverses molècules d'interès en les diferents capes que conformen l'hipocamp.
- Quantificar els nivells d'expressió de molècules relacionades amb la plasticitat a diverses àrees del cervell en rates mascle adultes sotmeses a estrès crònic de 10 dies per restricció.
- Quantificar la densitat de cèl·lules PV+ a diverses àrees del cervell en rates mascle adultes sotmeses a estrès crònic de 10 dies per restricció i fer un estudi de la presència de molècules relacionades amb la plasticitat associades a aquestes i altres interneurons.
- Analitzar la innervació perisomàtica sobre les neurones excitadores de diverses àrees del cervell en rates mascle adultes sotmeses a estrès crònic de 10 dies per restricció.

- Entendre com afecta l'estrès peripubertal a la locomoció i comportaments relacionats amb l'ansietat de ratolins mascles i femelles tant juvenils com adults.
- Entendre com afecta l'estrès peripubertal a la densitat de cèl·lules PV+ en la IL de ratolins mascles i femelles adults.
- Entendre com afecta l'estrès peripubertal a l'equilibri entre l'excitació i l'inhibició en la IL de ratolins mascles i femelles adults.
- Entendre com afecta l'estrès peripubertal a l'estructura de les cèl·lules PV+ i a la seua innervació perisomàtica en la IL de ratolins mascles i femelles adults.
- Entendre com afecta l'estrès peripubertal a la densitat d'espines dendrítiques de les neurones piramidals i a la seua innervació perisomàtica en la IL de ratolins mascles i femelles adults.
- Quantificar la densitat de cèl·lules PV+ i fer un estudi de la presència de molècules relacionades amb la plasticitat associades a aquestes i altres interneurones en la IL de ratolins mascles i femelles adults sotmesos a estrès peripubertal.

III. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS EN REVISTES INDEXADAS

ARTICLE 1

Arborització dendrítica interneuronal reduïda en la regió CA1 però
no en la CA3 de ratolins sotmesos a estrès crònic lleu

Revista: Brain and Behavior

Autors: Clara Bueno-Fernandez*, Javier Gilabert-Juan*, Esther Castillo-Gomez, Juan Nacher

Data de publicació: 9 de Juny de 2016

Arborització dendrítica interneuronal reduïda en la regió CA1 però no en la CA3 de ratolins sotmesos a estrès crònic

Ileu

Clara Bueno-Fernandez, Javier Gilabert-Juan, Esther Castillo-Gomez, Juan Nacher.

ABSTRACT

Introducció: L'estrès crònic indueix l'atròfia dendrítica i disminueix la densitat d'espines en neurones excitadores de l'hipocamp, tot i que també hi ha una gran evidència que indica que el sistema GABAèrgic està alterat a l'hipocamp després d'aquesta experiència aversiva. L'estrès crònic provoca una remodelació dendrítica tant en neurones excitadores com en interneurons a l'escorça prefrontal medial i l'amígdala.

Mètodes: Per a saber si també té un impacte en l'estructura i la neurotransmissió de les interneurons hipocampals, hem analitzat l'arborització dendrítica, la densitat d'espines i l'expressió de marcadors de sinapsis inhibidores i plasticitat en l'hipocamp de ratolins sotmesos a 21 dies d'estrès crònic per immobilització parcial. Les anàlisis es van realitzar en ratolins GIN, una soca que mostra les interneurons marcades amb EGFP.

Resultats: Es va observar una disminució significativa de l'arborització dendrítica de les interneurons de la regió CA1 de l'hipocamp, cosa que no es va produir en les de CA3. No trobàrem canvis en la densitat d'espines dendrítiques en cap d'aquestes regions ni alteracions en el nombre d'interneurons EGFP positives. No obstant això, l'expressió de la descarboxilasa d'àcid glutàmic 67 es va reduir en diferents capes de les regions CA1 i CA3 de l'hipocamp. No es van trobar canvis significatius en l'expressió de la forma polisialitzada de la molècula d'adhesió de cèl·lules neurals (PSA-NCAM) o la sinaptofisina.

Conclusions: L'estrès crònic redueix l'arborització dendrítica de les interneurons de CA1 de l'hipocamp, però no de les de CA3.

INTRODUCCIÓ

L'estrès crònic altera l'estructura neuronal en diferents regions cerebrals. Diversos estudis sobre models animals han demostrat que aquesta experiència aversiva causa atrofia dendrítica i disminueix la densitat d'espines en les neurones principals de l'hipocamp i de l'escorça prefrontal medial (mPFC) (Watanabe et al. 1992; Sousa et al. 2000; Cook and Wellman 2004; Radley et al. 2004, 2006). Per contra, a l'escorça orbitofrontal i a l'amígdala basolateral, l'efecte de l'estrès crònic és el contrari, és a dir, augmenta la densitat d'espines i l'arborització dendrítica (Vyas et al. 2002; Liston et al. 2006).

A més, d'aquests estudis estructurals centrats en les neurones principals, durant els últims anys el nostre laboratori ha analitzat els efectes de l'estrès crònic en la remodelació d'interneurones. Hem centrat els nostres estudis en una subpoblació d'interneurones espinoses, que expressen principalment somatostatina (SOM) i que es poden classificar com a cèl·lules Martinotti (Oliva et al. 2000). Hem demostrat que l'estrès crònic induïx una disminució de l'arborització dendrítica d'interneurones de l'amígdala lateral i basolateral de ratolins adults (Gilabert-Juan et al. 2011) i aquest paràmetre augmenta en interneurones de la mPFC (Gilabert-Juan et al. 2013). Curiosament, aquests canvis es produeixen en el sentit contrari als observats en les neurones principals d'aquestes regions (Vyas et al. 2002; Radley et al. 2004). Tot i això, malgrat els efectes dramàtics de l'estrès crònic en l'estructura de les neurones principals de l'hipocamp, encara no hi ha estudis sobre el seu impacte en l'estructura de les interneurones de l'hipocamp. El desenvolupament de la investigació sobre aquest tema és especialment interessant perquè trobem diferents evidències que indiquen que l'estrès crònic també té un impacte important en altres característiques de les neurones hipocampals inhibidores. Aquesta experiència aversiva redueix la densitat de diferents poblacions d'interneurones de diferents subregions hipocampals (Czeh et al. 2005; Hu et al. 2010; Czéh et al. 2015).

L'objectiu principal d'aquest estudi va ser identificar alteracions estructurals (arborització dendrítica i densitat d'espines) en les interneurones GABAèrgiques de l'hipocamp de ratolins estressats crònicament i relacionar aquests canvis amb alteracions en l'expressió de molècules implicades en la neurotransmissió inhibidora i la plasticitat neuronal, com ara la forma polisialitzada de la molècula d'adhesió de cèl·lules neurals (PSA-NCAM), la descarboxilasa d'àcid glutàmic 67 (GAD67) o el marcador de sinapsis, sinaptofisina (SYP). En l'hipocamp adult PSA-NCAM s'expressa fortament en neurones granulars immadures, però el nostre laboratori també va trobar aquesta molècula en una subpoblació d'interneurones hipocampals (Nacher, Blasco-Ibáñez, et al. 2002). Aquestes interneurones mostren una reducció de l'arborització dendrítica i de la densitat d'espines, així com una disminució en la densitat d'innervació perisomàtica en comparació amb les interneurones

que no tenen expressió de PSA-NCAM (Gómez-Climent et al. 2011). En conseqüència, aquesta molècula pot tenir un paper aïllant, modulant la connectivitat d'aquestes cèl·lules inhibidores.

MATERIAL I MÈTODES

En aquest experiment es van utilitzar 13 ratolins GIN (Tg(GadGFP- 45704Swn)) mascles adults (3 mesos), en els quals l'expressió EGFP es troba sota el promotor GAD67 (laboratoris Jackson, Bar Harbor, ME, EUA). Els animals es van allotjar en condicions estàndards, tal com s'ha descrit anteriorment (Gilbert-Juan et al. 2013). Tota l'experimentació amb animals es va dur a terme en conformitat amb la Directiva 2010/63/UE del Parlament Europeu i del Consell, del 22 de setembre de 2010, sobre la protecció dels animals destinats a finalitats científiques i va ser aprovada pel Comitè de Bioètica de la Universitat de València.

El procediment d'estrès crònic per restricció i les tècniques histològiques es van realitzar com es va descriure anteriorment (Gilbert-Juan et al. 2011, 2013). Breument, s'immobilitzaren ratolins (n = 7) durant una hora al dia al llarg de 21 dies (d'11.00 a 12.00 hores) en tubs cònics transparents de 50 ml de plàstic amb molts forats per tal de permetre la ventilació. Els animals de control (n = 6) es manejaven diàriament durant 1 minut, i posteriorment es retornaven, sense molèsties, a les seues gàbies.

Els ratolins es van eutanasiar 24 hores després de la darrera sessió d'estrès en un ordre aleatori, en una habitació diferent d'aquella en què es va dur a terme la restricció. Els animals van ser perfosos de forma transcardial amb un 4% de *paraformaldehid* en tampó fosfat (0,1 M, pH 7,2). L'hemisferi dret es va crioprotègir en una solució de sacarosa al 30% en PB i es va tallar en un micròtom de congelació a 50 µm. Aquestes seccions estaven destinades a l'anàlisi immunohistoquímic. L'hemisferi contralateral es tallà en seccions de 100 µm amb un vibràtom i les seccions resultants s'empraren per a analitzar la densitat d'espines dendrítiques en les interneurons que expressen GFP.

La immunohistoquímica per a la microscòpia òptica convencional es realitzà en tres subsèries (50 µm de gruix) de cada animal i es van utilitzar els anticossos anti-PSA-NCAM (AbCys, 1: 700, Cortabouef, França), anti-GAD67 (Chemicon, 1: 500, Millipore EMB, Bedford, MA) i anti-SYP (Sigma, 1: 200, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Per tal d'amplificar el senyal fluorescent EGFP en interneurons destinades a l'anàlisi morfològic (densitat d'espines dendrítiques i arborització dendrítica), es feu una immunohistoquímica fluorescent senzilla contra EGFP amb l'anticòs anti-GFP (Millipore, 1: 1.000, Millipore EMB, Bedford, MA).

Les seccions amb les quals es va portar a terme la immunohistoquímica per a microscòpia convencional s'examinaren amb un microscopi *Olympus CX41* sota il·luminació de camp clar, il·luminades i digitalitzades de forma homogènia mitjançant una càmera CCD. Les fotografies de les diferents àrees i capes es feren amb l'objectiu de 20x. També es van mesurar els nivells de gris mitjançant el programa *Image J* (NIH).

Es va estudiar l'arborització dendrítica i la densitat d'espines en neurones localitzades a la capa oriens de les regions CA1 i CA3. Vam seleccionar aleatòriament només 6 neurones GAD-GFP aïllades per animal i regió, tal com es va descriure anteriorment (Gilabert-Juan et al. 2011, 2013; Gómez-Climent et al. 2011). Per poder analitzar les cèl·lules que expressaven GAD-GFP havien de complir les següents característiques: (1) la cèl·lula no havia de mostrar dendrites truncades, (2) l'arbre dendrític de la cèl·lula havia de mostrar almenys un procés amb una longitud superior a 150 µm i (3) el soma havia d'estar situat a almenys 30 µm de profunditat de la superfície del teixit. A continuació, es processaren les imatges obtingudes mitjançant el programari FIJI (*ImageJ*) (NIH) per tal de fer reconstruccions en 3D. Les neurones es van traçar mitjançant el *plugin* del *ImageJ* de "*Simple neurite tracer*", que ens permeté analitzar el seu perfil de Sholl en 3D (Longair et al. 2011). Les espines es definiren com qualsevol tipus de protuberància que es trobava en una dendrita i es quantificaren en tres segments successius de 50 µm de longitud fins a una longitud total de 150 µm. Tots dos paràmetres estructurals s'estudiaren amb un microscopi confocal (Leica, SPE, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanya), que ens va permetre seguir en profunditat les dendrites de forma imparcial.

Vam estimar el nombre de cèl·lules que expressen GAD67-EGFP al soma neuronal a l'hipocamp complet i distingint per capes (*oriens, lucidum i radiatum*) i regions (CA1 i CA3) mitjançant una versió modificada del mètode fraccionador (West et al. 1991), tal com s'ha descrit abans (Varea, Blasco-Ibáñez, et al. 2007; Castillo-Gómez et al. 2011). Breument, l'esquema de mostreig fraccionador fa referència a la metodologia d'examinar una de cada 6 seccions cerebrals. Es va triar aleatòriament una de les 6 subsèries, i s'analitzaren les seccions que cobreixen tota l'extensió, de rostral a caudal, de l'hipocamp en un microscopi de fluorescència *Olympus BX61* recomptant les cèl·lules GAD67-EGFP. Els somes cel·lulars es van identificar i es van comptar amb un objectiu 40x. S'ometeren les cèl·lules que apareixien en el pla focal superior per tal d'evitar el recompte de cèl·lules incompletes.

Es determinaren les mitges per a cada grup experimental i les dades es van analitzar mitjançant l'anàlisi estadística de la prova de *t-Student* per mitjà del programa estadístic SPSS (IBM, versió 19, IBM-Deutschland GmbH, Munic, Alemanya).

RESULTATS

L'anàlisi de *Sholl* va mostrar una disminució de l'arborització dendrítica en neurones que expressaven GAD67-EGFP a la regió CA1 de ratolins estressats (*Figura 1*), però no en els de CA3 (*Figura 2*). Aquestes diferències en CA1 eren estadísticament significatives en dos dels segments analitzats de distància de 20 μm de longitud del soma: al segment de 0–20 μm ($p = 0.0034$) i al segment de 40–60 μm ($p = 0.0493$), i es va observar una tendència a la reducció a la resta de segments. No es trobaren diferències significatives en la densitat d'espines dendrítiques en cap segment dels analitzats de les interneurons de les regions CA1 o CA3 (*Figures 1 i 2*).

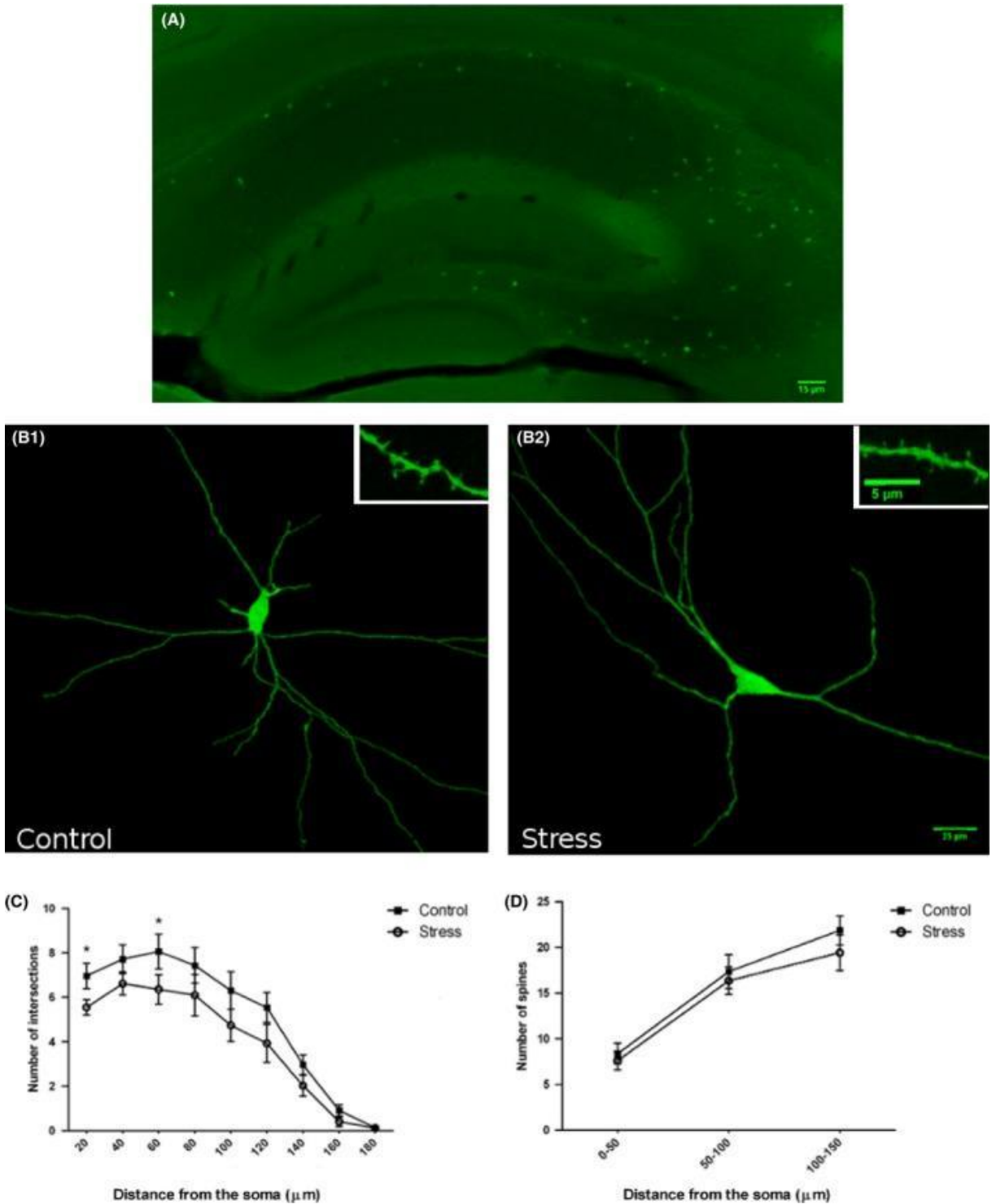


Figura 1: (A) Patró i distribució de cèl·lules eGFP+ a l'hipocamp. (B) Projeccions 2D d'una interneurona que expressa GAD67-EGFP en la capa d'Oriens de CA1 d'un individu control (B1) i d'un individu estressat crònicament (B2). Les figures inserides B1 i B2 mostren una visió magnificada de segments dendrítics portadors d'espines. (C) Anàlisi de *Sholl* de les interneurons que expressen GAD67-EGFP, que mostra el nombre d'interseccions per cada 20 μm com a unitat de distància radial del soma. El test de *t-Student* presentà una reducció significativa de l'arborització dendrítica en ratolins estressats ($p < .05$) en els segments de 20 i 60 μm. (D) La densitat d'espines dendrítiques es va determinar en 3 segments de longitud de

50 μm , situats entre 0–50, 50–100 i 100–150 μm del soma, respectivament. El test de *t-Student* no mostrà diferències estadísticament significatives en cap dels segments analitzats. Barra d'escala 15 μm per a A1, 25 μm per a B1 i B2; 5 μm per als inserts.

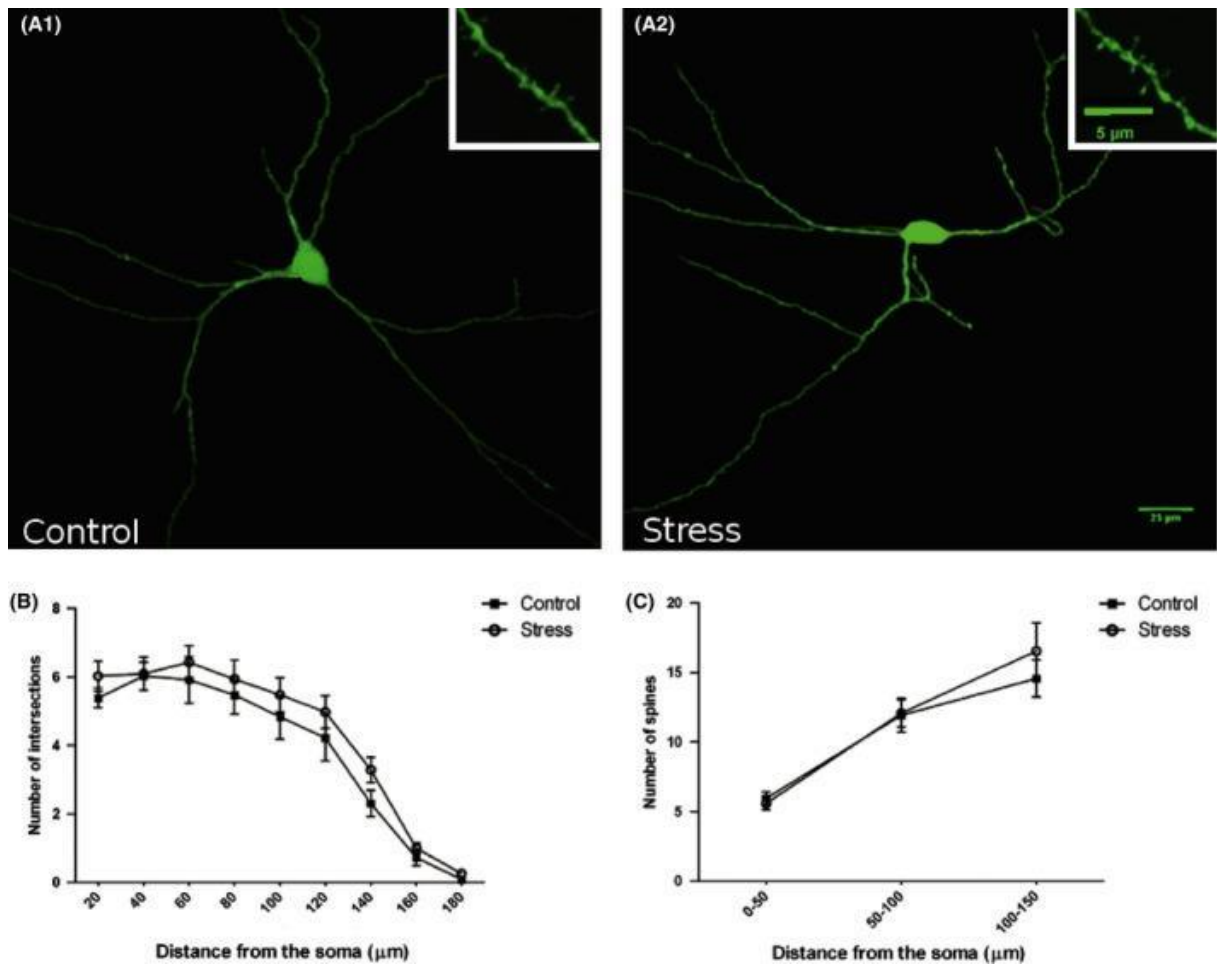


Figura 2: Projeccions 2D d'una interneurona que expressa GAD67-EGFP en la capa d'Oriens de CA3 d'un individu control (A1) i d'un individu estressat crònicament (A2). Els inserts de les figures A1 i A2 mostren una visió magnificada de segments dendrífics portadors d'espines de cèl·lules GAD67-EGFP positives. (B) Anàlisi de *Sholl* d'interneurones que expressen GAD67-EGFP, mostrant el nombre d'interseccions per cada 20 μm com a unitat de distància radial del soma. El test *t-Student* no reportà diferències estadísticament significatives. (C) La densitat d'espines dendrífiques es va determinar en 3 segments de longitud de 50 μm situats entre 0–50, 50–100 i 100–150 μm del soma, respectivament. El test *t-Student* no va manifestar diferències estadísticament significatives en cap dels segments analitzats. Barra d'escala 25 μm per a A1 i A2; 5 μm per als inserts.

No es van observar diferències significatives en el nombre de somes que expressen GAD67-EGFP en cap regió o capa d'interès, cosa que indica que el nombre d'aquesta subpoblació d'interneurones no està alterat en condicions d'estrès.

Es realitzà la quantificació de la immunoreactivitat al neuròpil per a cada immunomarcador (GAD67, PSA-NCAM i SYP), tal com es descrigué anteriorment (Gilabert-Juan et al., 2011). Es van seleccionar les diferents capes de regions CA1 i CA3 per mesurar la immunoreactivitat (Taula 1). En els ratolins estressats, l'expressió de GAD67 es va reduir significativament en l'estrat *lacunosum-moleculare* de CA1 ($p = 0.048$) i en l'estrat *lucidum* ($p = 0.004$) i *radiatum* ($p = 0.005$) de CA3. En l'expressió de SYP o PSA-NCAM no es van observar canvis significatius induïts per l'estrès en les diferents capes i regions estudiades. També s'analitzà la immunoreactivitat del neuròpil en les diferents capes del gir dentat, però no es trobà cap diferència significativa induïda per l'estrès (dades no mostrades).

Region	Layer	Control	Stress	p-value
GAD67				
CA1	Oriens	121.633 ± 8.720	116.366 ± 3.917	.220
	Pyramidal	147.966 ± 9.196	140.533 ± 3.221	.091
	Radiatum	116.933 ± 7.216	113.933 ± 7.216	.399
	Lacunosum-Molec.	128.466 ± 9.931	117.766 ± 6.033	.048*
CA3	Oriens	137.100 ± 14.419	135.133 ± 7.934	.778
	Pyramidal	151.366 ± 9.341	144.400 ± 3.530	.118
	Lucidum	171.266 ± 4.679	163.000 ± 2.561	.004*
	Radiatum	132.900 ± 5.274	123.666 ± 3.545	.005*
	Lacunosum-Molec.	140.200 ± 3.008	138.543 ± 4.853	.786
PSA-NCAM				
CA1	Oriens	121.006 ± 7.258	115.857 ± 4.350	.138
	Pyramidal	133.800 ± 3.706	126.943 ± 2.318	.134
	Radiatum	119.266 ± 6.180	116.371 ± 4.668	.375
	Lacunosum-Molec.	133.933 ± 4.668	136.771 ± 15.247	.735
CA3	Oriens	137.400 ± 7.767	134.914 ± 7.615	.573
	Pyramidal	127.650 ± 1.877	128.029 ± 2.692	.913
	Lucidum	175.566 ± 11.608	165.687 ± 5.728	.099
	Radiatum	124.733 ± 7.355	121.228 ± 1.682	.301
	Lacunosum-Molec.	157.400 ± 3.042	150.314 ± 1.757	.063
SYP				
CA1	Oriens	142.466 ± 10.379	136.00 ± 12.373	.334
	Pyramidal	85.500 ± 4.809	82.571 ± 4.176	.653
	Radiatum	132.266 ± 12.757	125.314 ± 13.485	.363
	Lacunosum-Molec.	102.700 ± 17.850	94.742 ± 13.816	.384
CA3	Oriens	145.880 ± 3.537	141.914 ± 12.243	.503
	Pyramidal	89.067 ± 5.739	84.171 ± 4.255	.499
	Lucidum	143.433 ± 10.074	140 ± 7.185	.555
	Radiatum	132.600 ± 11.625	125.685 ± 11.733	.310
	Lacunosum-Molec.	132.567 ± 5.387	131.000 ± 3.821	.8129

Taula 1: Intensitat de la tinció de les molècules de GAD67, PSA i SYP a les diferents capes de l'hipocamp mesurades en unitats arbitràries.

DISCUSSIÓ

Els animals utilitzats en aquest estudi no presentaven canvis induïts per l'estrès en el pes corporal (Gilabert-Juan et al. 2011), al contrari del que s'ha trobat en altres soques (Chmielarz et al. 2016). Malgrat que no hi ha altres experiments d'estrès de restricció crònica que utilitzen aquesta soca, és possible que pugui ser particularment resistent als canvis de pes, ja que altres estressors crònics, com

l'aïllament social, tampoc induïren canvis en el pes corporal (Volden et al. 2013). Els futurs estudis han de mesurar els nivells de corticosterona i els pesos de les suprarenals per tal de revelar canvis fisiològics associats a la plasticitat neuronal induïda per l'estrès.

Els nostres resultats mostren una reducció de l'arborització dendrítica d'interneurons a la regió CA1, però no a la CA3, després de l'estrès crònic. Cal considerar aquest paradigma d'estrès de restricció crònica (1 h al dia, 21 dies) com a un procés lleu. De fet, estudis anteriors han demostrat que en rates no són suficients 2 hores de restricció al dia per a induir la remodelació dendrítica en neurones hipocampals piramidals (McLaughlin et al. 2007). No obstant això, duracions de restricció similars (2-3 hores) són capaces d'induir canvis morfològics, neuroquímics i de comportament en els ratolins (Qin et al. 2011; Satoh et al. 2011) i els nostres experiments anteriors mitjançant el mateix paradigma de l'estrès i la mateixa soca actual mostraven canvis en l'estructura de les interneurons de l'amígdala i de l'hipocamp (Gilabert-Juan et al. 2011, 2013). Les cèl·lules EGFP+ a la regió CA1 de ratolins GIN són interneurons O-LM, que projecten a les dendrites apicals distals de les neurones piramidals en l'estrat *lacunosum-moleculare* (Oliva et al. 2000). Estudis anteriors en rates revelaren que l'estrès crònic pot induir atrofia de l'arbre dendrític apical de les neurones piramidals CA1, incloent una retracció dels seus segments dendrítics terminals (Sousa et al. 2000). S'han obtingut resultats semblants a la regió CA1 d'algunes soques de ratolins sotmesos a estrès crònic, on s'ha observat atrofia dendrítica apical i reducció de la densitat d'espines (Pawlak et al. 2005; Christian et al. 2011; Magariños et al. 2011). És possible que la reducció de l'arborització dendrítica en les interneurons O-LM també pugui produir una disminució de la densitat o alteracions en la neurotransmissió dels contactes sinàptics que fan sobre les dendrites distals de les neurones piramidals. En el sentit contrari, l'atrofia de l'arbre distal de les neurones piramidals també pot induir reduccions del nombre de contactes sinàptics realitzats per les interneurons O-LM o alterar la seua funció i això té un impacte en la seua arborització dendrítica.

Futurs experiments haurien d'explorar en detall el transcurs del temps de la remodelació neuronal induïda per l'estrès tant en les neurones principals com en les interneurons. No obstant això, la reducció de l'expressió de GAD67 que hem observat en l'estrat *lacunosum-moleculare* de CA1 després de l'estrès és coherent amb aquestes reduccions putatives en l'entrada que les cèl·lules O-LM envien a les dendrites distals de les neurones piramidals. No es van detectar canvis en l'expressió de GAD67 a l'estrat *lacunosum-moleculare* de CA3, cosa que s'explica, almenys parcialment, per la manca de remodelació estructural de les interneurons O-LM de CA3. Tanmateix, s'han observat reduccions de l'expressió de GAD67 en els estrats *lucidum* i *radiatum*, que molt probablement es deuen a canvis en altres subpoblacions interneuronals, com ara les associades a les fibres molsoses o les interneurons multipolars de CA3 que expressen calbindina, entre d'altres (Freund and Buzsáki 1996; Vida and

Frotscher 2000). També és possible que almenys una part d'aquesta reducció es pugui deure a la mort cel·lular. Tot i que no hi ha evidència de degeneració neuronal en aquesta regió hipocampal després d'aquest paradigma d'estrès crònic, un tractament de tres setmanes amb corticosterona va produir una disminució de la densitat de cèl·lules en CA3, però no en CA1 en rates adultes (Sapolsky et al. 1985). La literatura anterior sobre l'expressió d'aquest marcador de neurotransmissió inhibidora en CA1 ha descrit augments després d'estrès social crònic (Makinson et al. 2015), però no després d'estrès crònic intermitent variable (Herman 1998). Tot i això, aquests estudis mesuraven l'expressió de l'ARNm i no es van centrar en una capa particular.

Els nostres resultats sobre l'anàlisi de l'expressió de PSA-NCAM són semblants als que estobaren anteriorment a la mPFC de ratolins GIN, on l'estrès crònic no va induir canvis (Gilabert-Juan et al. 2013). Estudis anteriors en rates van trobar un augment de l'expressió d'aquesta molècula relacionada amb la plasticitat a l'hipocamp després de l'estrès crònic de restricció (Sandi et al. 2001; Pham et al. 2003). Tot i això, el període de restricció diària utilitzat va ser considerablement més llarg en rates que en els nostres ratolins. A més, l'expressió augmentada de PSA-NCAM en rates semblava estar associada principalment a canvis en les neurones granulars i les seues projeccions a l'estrat *lucidum* de CA3 (Pham et al. 2003).

El nostre estudi se suma a la creixent evidència que les xarxes inhibidores de l'hipocamp també es troben afectades per l'estrès crònic. S'ha descrit recentment en rates un impacte negatiu d'aquesta experiència aversiva sobre la densitat d'interneurones parvalbúmina positives, calretinina positives i també sobre les que expressen neuropèptid Y i SOM+ (Czéh et al. 2015). Tot i això, encara que la majoria de les interneurones marcades amb EGFP de l'hipocamp dels ratolins GIN expressen SOM, no vam trobar disminucions en el nombre d'aquestes interneurones en el nostre model. Aquesta discrepància es pot explicar per l'exposició més llarga a l'estressor a l'estudi de Czéh et al., (2015) (nou setmanes vs tres setmanes en el nostre estudi), així com per les diferències que pot haver a les respostes davant de l'estrès crònic depenent de l'espècie.

ARTICLE 2

L'estrès crònic modula la plasticitat de les interneurons: efectes sobre PSA-NCAM i xarxes perineuronals en regions corticals i extracorticals

Revista: Frontiers in Cellular Neuroscience

Autors: Clara Bueno-Fernandez*, Ana Paula Pesarico*, Ramón Guirado, María Ángeles Gómez-Climent, Yasmina Curto, Hector Carceller i Juan Nacher.

Data de publicació: 7 de Maig de 2019

L'estrès crònic modula la plasticitat de les interneurons: efectes sobre PSA-NCAM i xarxes perineuronals en regions corticals i extracorticals.

Clara Bueno-Fernandez*, Ana Paula Pesarico*, Ramón Guirado, María Ángeles Gómez-Climent, Yasmina Curto, Héctor Carceller, Juan Nacher.

RESUM

L'estrès crònic té un impacte important en el cervell adult. Tanmateix, la major part del coneixement sobre els seus efectes se centra en les neurones principals i menys en les neurones inhibidores. En conseqüència, publicacions recents han començat a descriure alteracions induïdes per l'estrès en l'estructura, la connectivitat i la neuroquímica de les interneurons. Alguns d'aquests canvis semblen estar mediat per certes molècules especialment associades a les interneurons, com la PSA-NCAM i components de les PNNs, regions especialitzades de la matriu extracel·lular. Aquestes molècules relacionades amb la plasticitat modulen l'estructura i la connectivitat de les interneurons, especialment de les interneurons de cistella que expressen PV, tant durant el desenvolupament com en la vida adulta. Aquestes neurones inhibidores estan especialment afectades després de períodes d'estrès crònic i en alguns trastorns relacionats amb l'estrès, en què també es veu alterada l'expressió de PSA-NCAM i de certs components de les PNNs. Per aquestes raons, hem decidit estudiar l'expressió de PSA-NCAM, les PNNs i les interneurons que expressen PV després de deu dies d'estrès per restricció crònica, moment en què les seues conseqüències en el comportament comencen a aparèixer. Ens hem centrat inicialment en l'escorça prefrontal medial (mPFC), l'amígdala basolateral (BLA) i l'hipocamp, regions afectades per l'estrès i les malalties psiquiàtriques relacionades amb l'estrès, però també hem explorat l'habènula i el nucli reticular talàmic (TRN) a causa de la presència important de PNNs i la seua relació amb certs trastorns. L'expressió de PSA-NCAM es va incrementar per l'estrès en l'estrat *lacunosum-moleculare* de CA1. Es detectà un increment de les cèl·lules PV+ a la mPFC i a la BLA, però no va anar acompanyat d'augment dels contactes que fan aquestes cèl·lules que expressen PV sobre els cossos neuronals de les neurones principals. El nombre de PNNs també augmentà en la mPFC i l'habènula, tot i que les PNNs habenulars no estaven associades a cèl·lules PV+. També es localitzà un augment de l'expressió de PV i dels components de les PNNs al TRN després de l'estrès de restricció crònica, cosa que va revelar per primera vegada efectes substancials sobre

aquesta regió. El nostre estudi demostra que, fins i tot, un breu protocol d'estrès crònic, pot induir canvis consistents en les molècules relacionades amb la plasticitat interneuronal en regions corticals i extracorticals, que poden representar respostes inicials dels circuits inhibidors per a contrarestar els efectes d'aquesta experiència aversiva.

INTRODUCCIÓ

L'estrès, una experiència freqüent a la societat moderna, és un dels grans factors de predisposició i promotor del desenvolupament de desordres psiquiàtrics en humans. Els estudis realitzats tant en humans com en rosegadors demostren que l'estrès afecta el funcionament de l'escorça prefrontal medial (mPFC) i de l'amígdala basolateral (BLA) (Shepard et al. 2016; Pesarico et al. 2017; Sachs et al. 2018), que són dues de les regions cerebrals que es troben disfuncionals en els trastorns psiquiàtrics relacionats amb l'estrès, com l'ansietat generalitzada, la depressió i el trastorn d'estrès-posttraumàtic (PTSD) (Drevets et al. 2008). Els efectes de l'estrès i dels trastorns relacionats amb l'estrès no es limiten a aquestes dues regions i també s'han detectat a l'hipocamp o a l'habènula, entre d'altres (Jacinto et al. 2017; Belleau et al. 2019). Diversos estudis han demostrat que hi havia canvis importants en l'estructura i la connectivitat de les neurones excitadores en les mencionades regions després de l'estrès crònic (McEwen 2000; Roozendaal et al. 2009; Radley et al. 2015; Jacinto et al. 2017). Més recentment, s'ha fet evident que l'estrès crònic també induïx canvis en els circuits inhibidors del cervell adult i que es poden trobar alteracions similars en els pacients que pateixen depressió o PTSD. A nivell cel·lular, aquestes alteracions inclouen una disminució de la densitat (Czeh et al. 2005; Czéh et al. 2015) i canvis en l'estructura (Gilabert-Juan et al. 2011, 2013, 2017) de determinades subpoblacions d'interneurones. Curiosament, un grup d'interneurones especialment afectades per l'estrès crònic, són les que expressen parvalbúmina (PV): s'han detectat disminucions en la densitat de interneurones PV+ a la mPFC i l'hipocamp de rates adultes sotmeses a estrès crònic (Czeh et al. 2005; Zadrozna et al. 2011; Banasr et al. 2017; Czéh et al. 2018). D'altra banda, s'ha descrit una reducció de l'alliberament sinàptic en la regió perisomàtica de les neurones piramidals de la mPFC, on la majoria d'aquestes interneurones PV+ estableixen els seus contactes sinàptics (Czéh et al. 2018). Tanmateix, no se sap si l'estrès crònic pot induir canvis en aquesta població d'interneurones en altres regions cerebrals afectades amb trastorns relacionats amb l'estrès, com l'amígdala o l'habènula.

La maduració i la plasticitat de les interneurones PV+ estan mediades per la presència de molècules que influeixen en la seua estructura i connectivitat. Recentment, diferents laboratoris, inclòs el nostre, han estat estudiant el paper de la forma polisialitzada de la molècula d'adhesió de les cèl·lules neurals

(PSA-NCAM) i de les xarxes perineuronals (PNNs) en la plasticitat de les interneurons PV+. La PSA-NCAM s'expressa en una subpoblació d'interneurons del telencèfal adult, i particularment està present en alguns dels contactes que les cèl·lules de cistella PV+ estableixen en el soma de les neurones piramidals (Castillo-Gómez et al., 2011b). L'expressió de PSA-NCAM és fonamental per a la regulació dels contactes inhibidors, tant durant el desenvolupament (Di Cristo et al. 2007) com en l'edat adulta (Castillo-Gómez et al. 2011, 2016). Les PNNs són regions especialitzades de la matriu extracel·lular, que són particularment abundants al voltant dels somes, dendrites i segments proximals dels axons de les cèl·lules de dispar ràpid PV+ (Härtig et al. 1992b). Tot i que la funció de les PNNs encara no és coneguda per complet, les investigacions suggereixen que aquestes estructures estan implicades en el tancament i reobertura dels períodes crítics, les respostes a experiències aversives com la por i a la regulació de la plasticitat sinàptica (Gogolla et al. 2009; Carulli et al. 2010; Pantazopoulos and Berretta 2016; Sorg et al. 2016; Banerjee et al. 2017).

Aquest important paper de la PSA-NCAM i les PNNs en el desenvolupament i la plasticitat dels circuits interneuronals probablement es reflecteix en les alteracions dels seus nivells d'expressió que es troben en diferents trastorns psiquiàtrics (Varea et al. 2012; Berretta et al. 2015). D'altra banda, l'estudi en rosegadors de l'estrès crònic ha revelat alteracions en l'expressió de PSA-NCAM i en algunes de les molècules integrades en les PNNs, la qual cosa suggereix la seua implicació en la plasticitat associada a aquesta experiència aversiva, especialment en les neurones inhibidores (Sandi 2004; Nacher et al. 2013; Soleman et al. 2013). Malauradament, la informació sobre l'expressió d'aquestes molècules relacionades amb la plasticitat després de l'estrès no ha sigut extensament estudiada. L'expressió d'aquestes molècules no ha sigut encara estudiada en algunes regions del sistema nerviós central (SNC) d'adult després de l'estrès crònic i la majoria de la informació sobre els canvis en les PNNs ha estat obtinguda de models d'estrès en edat primerenca (Castillo-Gómez et al. 2017; Ueno et al. 2018).

L'objectiu principal del present estudi va ser analitzar els efectes d'un curt període d'estrès crònic, 10 dies d'immobilització, sobre interneurons PV+, PSA-NCAM i PNNs al cervell de rates adultes. Ens hem centrat en els efectes a la mPFC i a la BLA, perquè en aquestes regions treballs anteriors ja han mostrat alteracions en els interneurons després de protocols d'estrès crònic, però també hem explorat altres regions que han estat alterades per aquesta experiència aversiva, com l'hipocamp i l'habènula. També hem estudiat el nucli reticular talàmic (TRN), una regió amb una densitat molt alta de PNNs que envolta les interneurons PV+. Curiosament, la densitat de totes dues, d'interneurons PV+ i de PNNs, es troba alterada en aquesta regió talàmica en pacients que pateixen esquizofrènia i desordre bipolar

(Steullet et al. 2018), dos trastorns psiquiàtrics en els quals l'estrès podria actuar com un factor de predisposició.

MATERIAL I MÈTODES

Animals i protocol d'estrès

Rates *Sprague-Dawley* mascles adults (13 setmanes d'edat al començament de l'experiment; 381,9 ± 4,1 g; Harlan Interfauna Iberica S.L., Barcelona, Espanya) es van fer servir per a tots els procediments experimentals. Els animals es van allotjar en grups de 3 individus en un ambient amb temperatura i humitat controlades i es mantingueren en un cicle de llum / obscuritat de 12 h, amb l'alimentació i l'aigua *ad libitum*. Les rates foren habituades a les instal·lacions una setmana abans de l'inici de l'experimentació. Els experiments van tenir lloc durant el període de llum i es van realitzar d'acord amb el Directori 2010 / 63 / EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 de la protecció d'animals per a propòsits científics i fou aprovat pel Comitè de Bioètica de la Universitat de València. Cal dir que es feren tots els esforços necessaris per a minimitzar el nombre d'animals utilitzats i el seu sofriment.

Dotze rates van ser utilitzades per a dur a terme l'experiment d'immobilització repetida. Es va estressar un grup de rates (n = 6) al llarg de 10 dies consecutius durant 6 hores al dia (10:00 h). Aquestes rates es retingueren dins d'una malla de filferro amb dues obertures i es col·locaren dins de les seues gàbies durant les sessions d'immobilització. Altres 6 rates no foren molestades i es van mantenir dins de les seues gàbies, servint com a controls d'aquest experiment. Les rates controls i les estressades es mantingueren en gàbies separades. Els animals foren eutanasiats 24 h després de la darrera sessió de restricció seguint un ordre aleatori i en una habitació diferent d'aquella que s'utilitzà per a fer el protocol de restricció.

Perfusió, microtomia, i immunohistoquímica.

Els animals es van anestesiar profundament amb pentobarbital i foren perfosos transcordialment amb una solució de paraformaldehid al 4% en tampó fosfat (PB) 0.1M. Els cervells van ser crioprotegits (30% de sacarosa en PB 0,1 M, 48 h) i posteriorment tallats en seccions coronals de 50 µm de gruix, mitjançant un micròtom de congelació (LEICA SM2000R, Leica). Les seccions es recol·lectaren en 10 subsèries.

Així mateix, 2 subsèries es processaren per a fer immunohistoquímica. Breument, les seccions es van rentar en tampó fosfat salí (PBS) i després es van incubar durant 1 h en sèrum d'ase normal al 10% (NDS; Abcys) en PBS amb Triton X-100 al 0,2% (PBST; Sigma-Aldrich). Després, s'incubaren durant 48 h a 4 °C amb l'anticòs primari adequat o còctel d'anticossos (vegeu la taula 1) diluït en PBST i sèrum d'ase (NDS) al 5%: (a) una doble tinció amb un anticòs contra PV i una Lectina conjugada a biotina de l'aglutinina de *Wisteria floribunda* (WFA) per a detectar les PNNs i (b) una triple tinció amb l'anticòs primari anti-CaMKII- α en combinació amb els anticossos primaris anti-PV i anti-sinaptofisina (SYN), per a estudiar la innervació perisomàtica de les neurones piramidals. Després del rentat, les seccions es van incubar durant 2 h a temperatura ambient amb els anticossos secundaris conjugats amb els fluorocroms o avidines adequats (vegeu *Taula 1*), que també es diluïren en PBST. Finalment, les seccions es rentaren en PB 0,1 M, es van muntar en portaobjectes i es cobriren amb un medi de muntatge específic per a fluorescència (Dako).

A continuació, es va processar una altra subsèrie per al mètode d'immunohistoquímica convencional. Breument, les seccions es van incubar durant 1 minut en una solució de desemascament d'antígens (0,01 M de tampó citrat, pH 6) a 100 °C. Després de refredar les seccions a temperatura ambient, s'incubaren amb 10% metanol, 3% H₂O₂ en solució de PBS durant 10 minuts per tal de bloquejar l'activitat de la peroxidasa endògena. Després d'això, es van tractar les seccions durant 1 h amb 5% de NDS (Jackson Laboratories) en PBS amb 0,2% de Triton-X100 (Sigma) i es van incubar durant la nit a temperatura ambient en un anticòs monoclonal Men-B anti-PSA-NCAM de ratolí (1: 1400; Abcys). Després de rentar-se, les seccions s'incubaren durant 30 minuts amb els anticossos d'ase anti-IgM de ratolí o l'anticòs biotinitat anti IgG de ratolí generat en ase (Laboratoris Jackson, 1: 250), seguit d'un complex avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector Laboratories) durant 30 minuts en PBS. El desenvolupament del color es va aconseguir incubant amb 3,3 tetrahidroclorur de diaminobenzidina (DAB, Sigma) durant 4 minuts. Per a la dilució d'anticossos primaris i secundaris es va utilitzar PBS amb un 0,2% de Triton-X100 i un 3% de NDS. Totes les seccions estudiades passaren per tots els procediments simultàniament, per tal de minimitzar les diferències en la tinció immunohistoquímica.

	Dilution	Company
Primary antibodies		
Polyclonal guinea pig anti-parvalbumin	1:2000	Synaptic Systems
WFA lectin biotin-conjugated	1:200	Sigma
Polyclonal rabbit anti- synaptophysin	1:500	Millipore
Monocolonal mouse anti-CaMKII	1:500	Abcam
Secondary antibodies		
Goat anti-mouse A635-conjugated	1:200	Life Technology
Goat anti-guinea pig A555-conjugated	1:200	Life Technology
Donkey anti-rabbit A488-conjugated	1:200	Invitrogen
Avidin A647-conjugated	1:200	Invitrogen

Taula 1: Llistat d'anticossos primaris i secundaris emprats a l'estudi.

Quantificació de l'expressió de PSA-NCAM.

Es va determinar la intensitat d'immunoreactivitat de PSA-NCAM en el neuròpil de les diferents regions estudiades [capes superficials i profundes de la Cg 1 (Bregma 3.7 a Bregma -1.4), prelímbica (Bregma 4.7 a Bregma 2.2) i infralímbica (Bregma 3.2 a Bregma 2.2), BLA (Bregma - 1.6 a Bregma - 4.16) i totes les capes en la regió CA1 de l'hipocamp ventral (Bregma - 4.3 a Bregma- 6.3) i dorsal (Bregma -1.6 a Bregma -4.3)] mitjançant la metodologia descrita anteriorment (Varea et al., 2007). Es van analitzar 7 làmines per animal per a la mPFC, 2 per a la BLA i 3 per a l'hipocamp ventral i dorsal. Les seccions s'examinaren sota il·luminació de camp clar, digitalitzades i il·luminades de forma homogènia mitjançant una càmera CCD. Les fotografies es van fer amb un objectiu de 20x. Les diferents regions d'interès es delinearen per mitjà de l'eina de selecció de polígons del programa de processament d'imatges *Java Fiji* (Schindelin et al. 2012). Els nivells de gris es van convertir a densitats òptiques. Per tal de normalitzar els valors, els nivells de gris obtinguts a partir de fotografies del cos callós en cadascuna de les seccions foren restats dels valors obtinguts per a cada capa. Vam utilitzar seccions paral·leles amb una tinció de blau de toluidina per tal de delimitar millor les regions, subregions i capes en estudi. Així mateix, poguérem distingir els límits de les regions CA1 i CA2 amb l'ajuda de les nostres subsèries marcades amb WFA. Aquesta lectina marca intensament el neuròpil de la regió CA2 fent-lo fàcilment discernible (Lensjø et al. 2017).

Quantificació de cèl·lules que expressen PV i PNN.

Es va estimar el nombre total de neurones PV+, PNNs i neurones PV+ envoltades de PNNs de l'hipocamp, BLA, habènula i mPFC (incloses la Cg1, PrL i IL) mitjançant una versió modificada del mètode fraccionador (West 1993; Nacher, Alonso-Llosa, et al. 2002; Varea, Castillo-Gómez, et al. 2007). També, es comptaren les cèl·lules incloses en el 100% de la superfície de la mostra, és a dir, a cada secció es van comptabilitzar totes les cèl·lules marcades en cada subdivisió i capes que la componen. El mostreig fraccionador fa referència a la metodologia d'examinar una de cada 10 subseries de seccions del cervell. Així doncs, la nostra modificació del dissector òptic combinat amb un mostreig fraccionador 1:10 és realment una modificació del mètode de fraccionador òptic. Es va triar aleatòriament 1:10 subsèries per tal d'analitzar les seccions que cobrien completament, de rostral a caudal de les estructures d'interès. Es va utilitzar un microscopi Olympus CX41. El volum de les diferents regions analitzades es va determinar per a cada animal mitjançant el principi de Cavalieri (Gundersen and Jensen 1987) i no es van observar diferències entre grups.

Així, s'identificaren els somes i es van comptar amb un microscopi de fluorescència amb un objectiu de 40x (Olympus CX41). Es van ometre les cèl·lules que apareixien en el pla focal superior per a evitar el recompte de cèl·lules incompletes. En aquest sentit, per tal de classificar una cèl·lula com a positiva per PNNs o PV, tots els somes van ser envoltats per una secció poligonal utilitzant *Fiji*. Després analitzarem la mitjana del valor del gris d'aquesta selecció. Sols les cèl·lules amb valors superiors a 60 es consideraren positives.

Quantificació de la intensitat de fluorescència de PV i PNNs al nucli reticular talàmic i a la regió CA2 de l'hipocamp.

L'elevada densitat de somes PV+ i PNNs+ al TRN va impossibilitar el recompte de neurones individuals en aquesta estructura. Per tant, es mesurà la intensitat de la seua fluorescència per tal d'estimar la seua abundància i l'expressió d'aquests marcadors en aquesta regió. També vam aplicar aquesta metodologia a la regió CA2, on no es va trobar cap PNNs discernible individualment; el marcatge amb WFA era molt intens i estès. Així, s'estudiaren 3 seccions per animal que contenien TRN (Bregma -1,3 a Bregma -3,8) i 3 que contenien l'hipocamp dorsal (Bregma -1,7 a Bregma -2.18). Les fotografies es realitzaren amb l'objectiu de 20x en un microscopi confocal (Leica TCS SPE). El TRN i la regió CA2 es van delimitar mitjançant l'eina de selecció de polígons a *Fiji* (Schindelin et al. 2012). Al

capdavall, per tal de normalitzar els valors, es van restar els nivells de gris obtinguts a partir de les fotografies de la càpsula externa de cada secció i es restaren a les diferents capes.

Quantificació de puncta perisomàtics en les neurones piramidals

La densitat de puncta que expressen SYN i PV envoltant el soma de les neurones principals (identificades per l'expressió de CaMKII- α) es va analitzar a les regions d'interès, mostrant alteracions en el nombre de cèl·lules PV+. Amb aquesta finalitat, seguïrem el protocol descrit anteriorment (Guirado, Perez-Rando, Sanchez-Matarredona, Castillo-Gómez, et al. 2014). En la mPFC i la BLA, es van prendre imatges d'entre 20 i 25 neurones piramidals per animal de 3 seccions diferents. S'agafaren imatges consecutives que cobreixen tota la profunditat del soma de la neurona amb una mida de pas de 0,5 μm i amb un objectiu d'immersió en oli de 63x, utilitzant una magnificació de zoom digital 2x (microscopi confocal Leica TCS SPE). El perfil del soma d'aquestes neurones es va dibuixar manualment, i després es va utilitzar un macro per tal d'analitzar la densitat de puncta al voltant del perímetre. La selecció manual es va augmentar 1 μm per definir l'àrea perisomàtica. Les imatges es processaren per a binaritzar el 5% dels elements més brillants de l'histograma. Totes les partícules que presentaven una àrea no inferior a 0,15 μm^2 i no superiors a 2,5 μm^2 es definiren com a puncta (Di Cristo et al. 2007). Es van analitzar les imatges adquirides pel microscopi confocal i es van promediar 3 vegades (cada pla confocal), disminuint el soroll de manera important. El punt més petit que reconeguèrem tenia una mida lateral de 0,38 μm , la qual es troba per damunt de la resolució lateral del microscopi confocal.

Estadística

Totes les mostres es van codificar abans de l'anàlisi quantitatiu i el codi no es descobrí fins que no es va completar la quantificació. Tots els resultats experimentals s'obtenen com a mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana (SEM). Primer, vam avaluar la normalitat de les dades mitjançant el test d'Agostino i Pearson *omnibus*. Les comparacions entre els grups control i estrès foren realitzades per la prova *t-Student*. Els valors de probabilitat inferiors a 0,05 ($p < 0,05$) es consideraren com a estadísticament significatius. Els coeficients de correlació entre el nombre de neurones PV+s i el de PNNs en regions cerebrals diferents (en animals controls i estressats), es van analitzar mitjançant el test de correlació de *Pearson*. Es considerà estadísticament significatiu un valor $p < 0,05$.

RESULTATS

Efectes de l'estrès per restricció en l'expressió de PSA-NCAM

Hem analitzat l'expressió de PSA-NCAM al neuròpil de diferents regions telencefàliques en les quals aquesta molècula té una expressió considerable i en les quals ja detectarem anteriorment canvis en la seua expressió o en les molècules implicades en la neurotransmissió inhibidora després de l'estrès crònic: la mPFC, la BLA i l'hipocamp dorsal i ventral (veure Nacher et al. (2013) per a la seua revisió). L'estrès crònic indueix increments de l'expressió de PSA-NCAM a la regió CA1 de l'hipocamp ventral i dorsal (*Figures 1A – D*): A l'hipocamp dorsal es va observar un augment significatiu en l'estrat *lacunosum-moleculare*, la capa amb nivells més alts d'expressió d'aquesta molècula (*Figura 1C*; $p = 0,006$). A l'hipocamp ventral es van observar increments significatius en els estrats *piramidal* i *radiat* (*Figura 1D*; $p = 0,021$, $p = 0,038$).

Deu dies d'immobilització no induïren canvis significatius en els nivells de PSA-NCAM al neuròpil de cap de les regions de la mPFC (*Figures 1E-G*) ni en la BLA (*Figura 1H*).

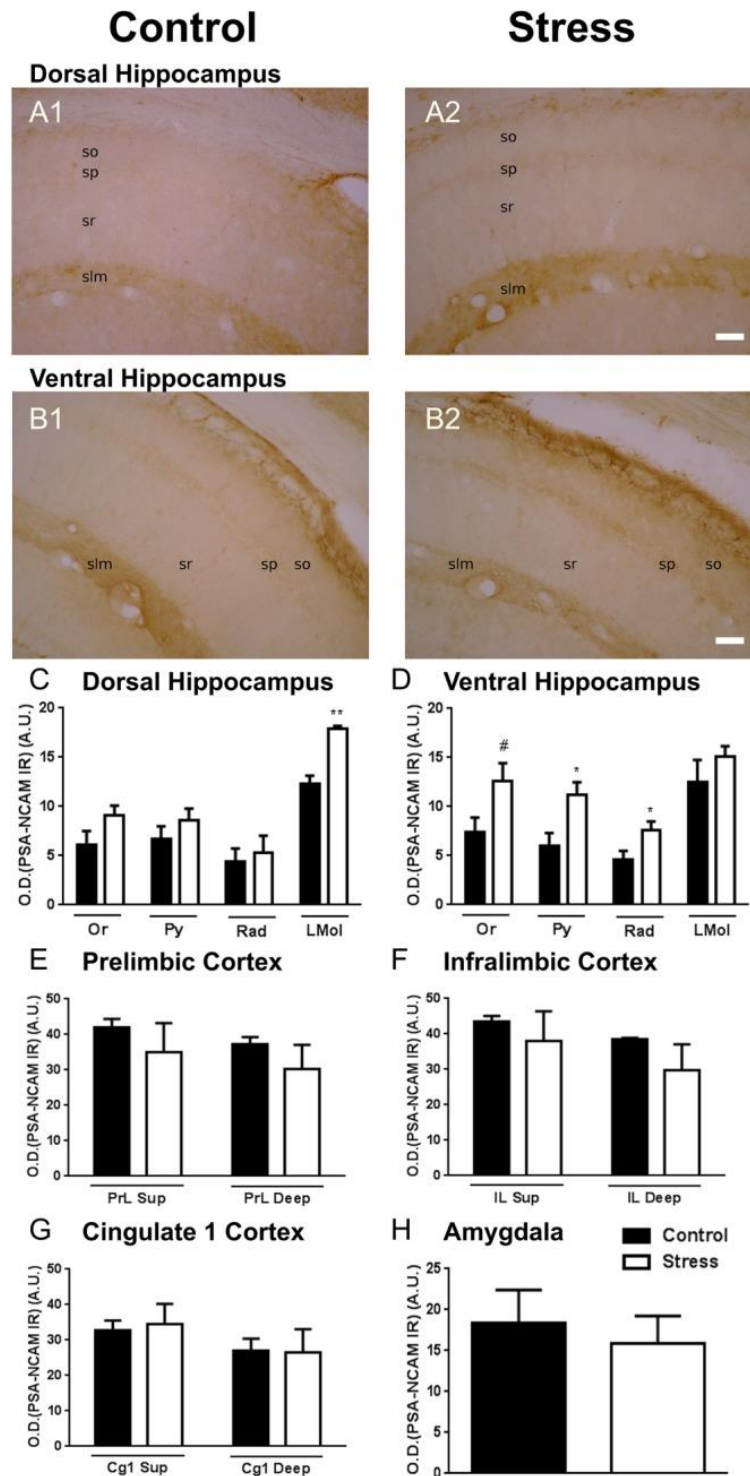


Figura 1: Gràfics que representen els canvis en la intensitat de la forma polisialitzada de la molècula d'adhesió de cèl·lules neurals (PSA-NCAM) al neuròpil de diferents regions telencefàliques. (A, B) Microfotografies de l'hipocamp dorsal (A) i ventral (B) d'un animal control (A1, B1) i d'una rata crònicament estressada (A2, B2). (C, D) Regió CA1 de l'hipocamp dorsal (C) i ventral (D), incloent-hi els estrats *oriens* (Or), el piramidal (Py) *radiatum* (Rad) i *lacunosum-molecular* (LMol). (E–G) Capes superficials (I – III, Sup) i profundes (IV – VI) de la mPFC, incloent l'escorça prelímbica (PrL, E), escorça infralímbica (IL, F) i escorça cingulada 1 (Cg1, G). (H) Amígdala basolateral (BLA). Els valors representen mitjana \pm SEM. Els asteriscos indiquen diferències estadísticament significatives entre grups (control \times estrès) després de la prova t-Student no aparellada (* $p < 0.05$; $< p < 0.01$; # $0.1 < p < 0.05$). Barres d'escala: 15 μ m.

Efecte de l'estrès per restricció en el nombre de PNNs i cèl·lules PV

El nombre de PNNs ($p = 0.022$) i de cèl·lules PV+ ($p = 0.045$) a la mPFC (inclosa la IL, PrL i Cg 1) van augmentar de manera important en rates estressades en comparació amb les controls. No obstant això, no hi havia diferències significatives en el nombre de cèl·lules PV+ envoltades per PNNs ($p = 0.146$) entre els grups (*Figures 2A, B, G*). La densitat de neurones PV+ i de PNNs va mostrar una correlació lineal positiva forta i significativa en la mPFC dels animals control ($r = 0,9118$, $p < 0,01$), però aquesta correlació no fou significativa en individus estressats ($r = 0,717$, $p < 0,108$). També es va investigar si l'estrès per immobilització alterava el nombre de cèl·lules PV+ i PNNs en la BLA. El nombre de cèl·lules PV+ d'aquesta regió amigdaloides es va incrementar significativament en les rates estressades ($p = 0,023$). No hi havia diferències significatives en el nombre de PNNs ($p = 0.407$) o de PNNs envoltant cèl·lules PV+ ($p = 0.653$) (*Figures 2C, D, H*). El nombre de neurones PV+ i de PNNs van mostrar una correlació lineal positiva significativa en la BLA dels animals control ($r = 0,804$, $p < 0,05$), però aquesta correlació no existia en individus estressats ($r = -0,04$, $p < 0,941$).

L'anàlisi del nombre de PNNs a la regió CA1 de l'hipocamp revelà una important disminució en les rates estressades en comparació amb les controls ($p = 0,0008$). De fet, no vam veure diferències significatives en el nombre de cèl·lules PV+ ($p = 0.626$) o PNNs / cèl·lules PV+ ($p = 0,670$) (*Figures 2E, F, I*). El nombre de neurones PV+ i de PNNs no mostrà una correlació lineal significativa ni en la CA1 dels animals de control ($r = -0.407$, $p < 0.422$), ni en la d'individus estressats ($r = 0.681$, $p < 0.136$).

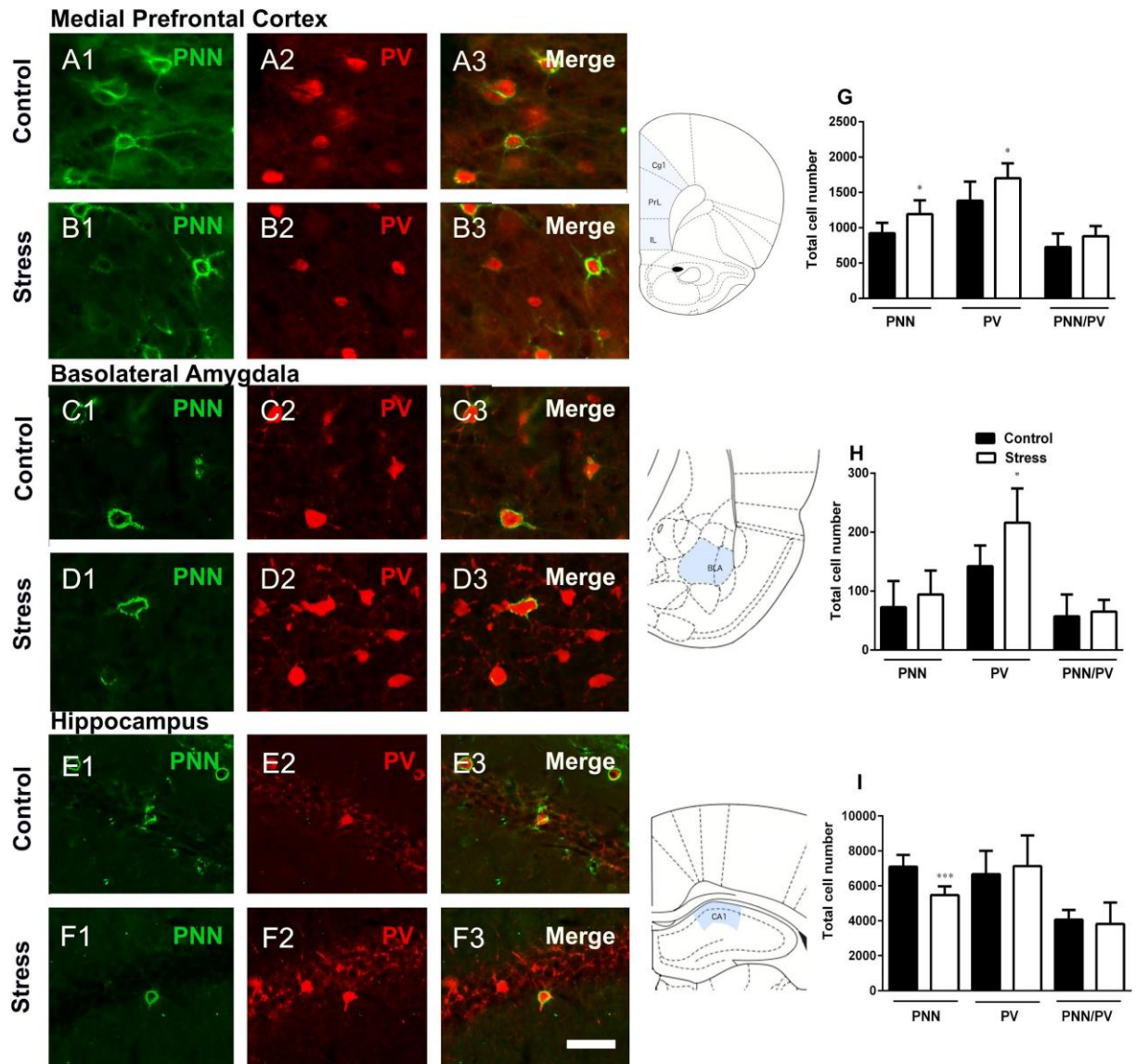


Figura 2: Xarxes perineuronals (PNNs), neurones que expressen parvalbúmina (PV) i la seva colocalització en la mPFC, la BLA i la regió CA1 de l'hipocam en rates control i després de deu dies d'estrès de restricció crònica. Imatges confocals representatives que mostren la distribució de PNNs (A1 – F1; verd), somes PV+ (A2 – F2; roig) i la seva colocalització (A3 – F3) a la mPFC, (A, B) l'amígdala basolateral (C, D) i la regió CA1 de l'hipocamp. Els esquemes a la dreta de les figures (A – F) indiquen les regions estudiades en blau clar (modificat de Paxinos i Watson, 1998). Els gràfics de la part dreta de la figura indiquen canvis en el nombre total de PNNs, somes PV+ i PV + somes envoltats de PNNs a la mPFC (G), la BLA (H) i l'hipocamp (I). Els valors representen mitjana ± SEM. Els asteriscos indiquen diferències estadísticament significatives entre grups (control × estrès) després de la prova *t-Student* no aparellada (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). PrL: escorça prefrontal, IL: escorça infralímbica, Cg1: escorça cingulada 1, BLA: amígdala basolateral. Barra d'escala 15 μm .

També vam estudiar si l'estrès per restricció afectava les PNNs i les cèl·lules PV+ en el TRN. Analitzant la intensitat de la fluorescència, trobàrem que l'estrès augmentava clarament la immunoreactivitat de les PNNs ($p = 0.033$) i PV ($p = 0.0002$) (Figures 3A, B, D). Usant la mateixa

metodologia, es va analitzar la fluorescència de WFA a la CA2 de l'hipocamp i no s'identificaren diferències significatives ($p = 0.448$) després de l'estrès crònic. D'acord amb els treballs anteriors (Smith et al. 1987; Li et al. 2011; Meye et al. 2013), no vam poder detectar interneurons PV+ a l'habènula, tot i que sí que es podien observar i quantificar algunes PNNs. El nombre d'aquestes cèl·lules PV- /PNNs+ es va incrementar significativament ($p = 0.025$) després de 10 dies d'estrès crònic per restricció (Figures 3C, E).

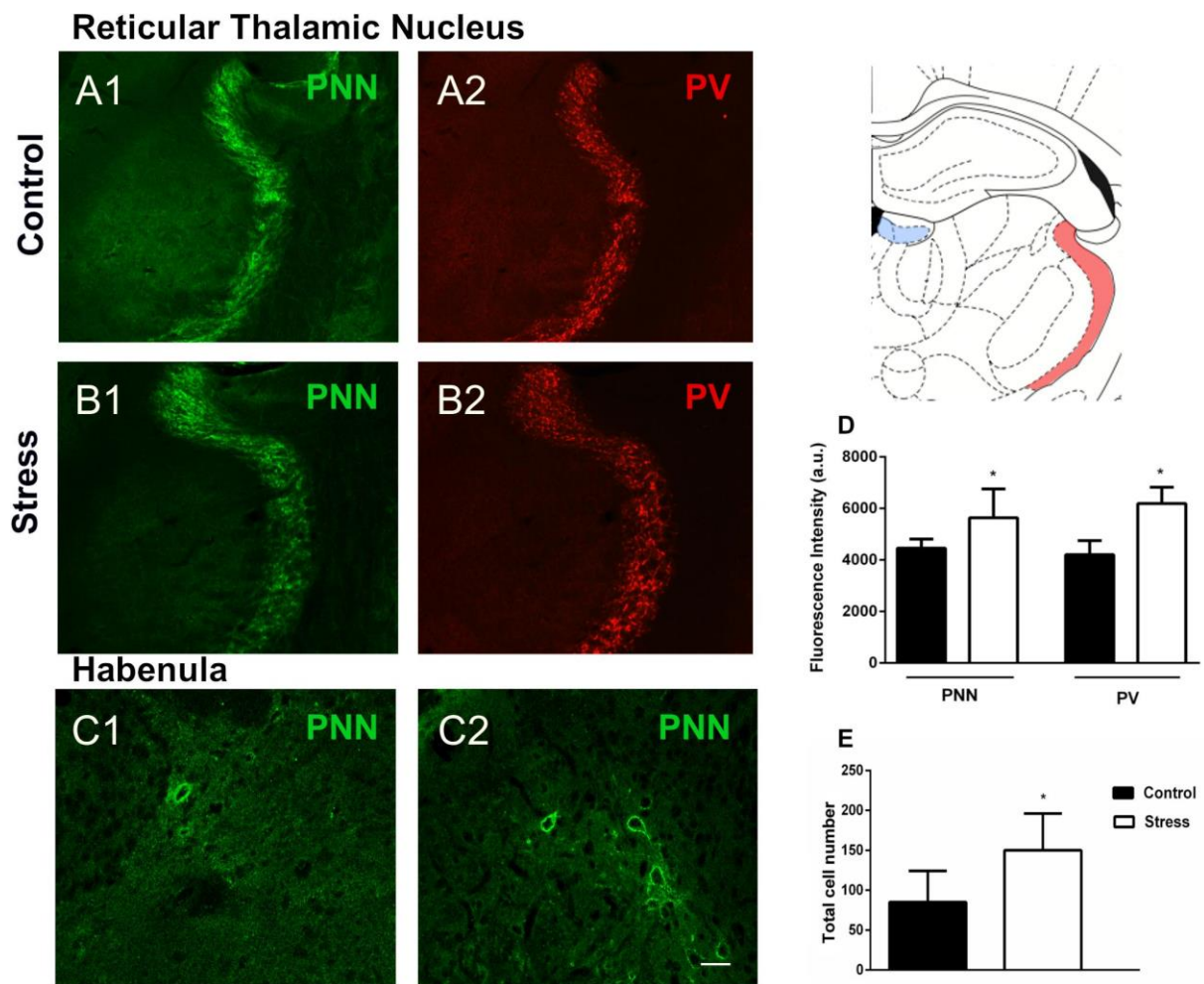


Figura 3: PNNs, cèl·lules que expressen PV i la seua colocalització en el TRN i l'habènula en rates de control i després de deu dies d'estrès de restricció crònica. (A, B) Imatges confocals representatives que mostren la distribució de PNNs (A1, B1; verd) i somes PV+ (A2, B2; roig) en el TRN de rates control (A) i d'estressades (B). (C) Imatges confocals que mostren la distribució de PNNs (verd) a l'habènula de rates control (C1) i estressades (C2); no es va poder detectar cap soma immunoreactiu per a PV a l'habènula, ni en animals control ni en estressats. (D, E): Els gràfics que hi ha a la part dreta de la figura indiquen canvis en la intensitat de fluorescència de les PNNs i les PV al TRN (D) i del nombre total de PNNs a l'habènula (E). Els esquemes de la part superior dreta de la figura indiquen les regions estudiades en roig clar (TRN) i blau clar (habènula) (modificat de Paxinos i Watson, 1998). Els valors representen mitjana \pm SEM. Els asteriscos indiquen diferències

estadísticament significatives entre grups (control × estrès) després de la prova *t-Student* no aparellada ($p < 0.05$). Barra d'escala 15 μm .

Efectes de l'estrès per restricció en els puncta PV immunoreactius sobre la regió perisomàtica de neurones excitadores de la mPFC i l'amígdala basolateral.

Atès que l'estrès crònic per restricció va alterar el nombre d'interneurones PV+ en la mPFC i la BLA i donada la importància d'aquestes cèl·lules en la inhibició perisomàtica de les neurones excitadores, decidírem analitzar la densitat de l'expressió de puncta SYN+ amb o sense immunoreactivitat per a la PV, que envolten el soma d'aquestes neurones principals. Els somes de les neurones excitadores es van identificar per la presència de CAMKII. En la mPFC, l'estrès per restricció repetida no alterà la densitat de puncta SYN+ / PV+, però va disminuir significativament la de PV- / SYN+ ($p = 0.019$), (*Figures 4A, B, E*). L'estrès crònic no produí canvis significatius en la densitat de puncta perisomàtics en les neurones excitadores de la BLA (*Figures 4C, D, F*).

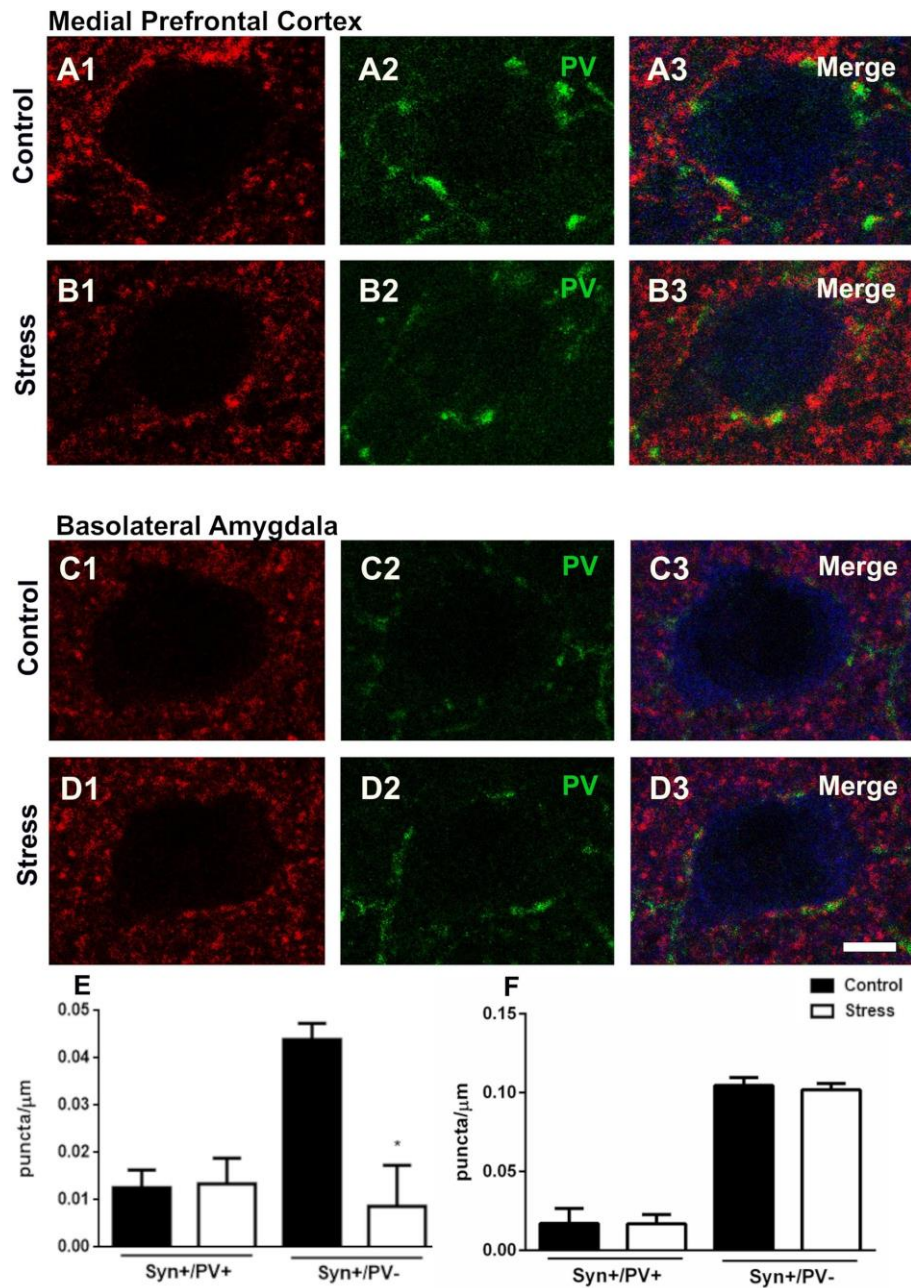


Figura 4: Anàlisi de microscòpia confocal de punta que expressen parvalbúmina (PV) i sinaptofisina (SYN) a la regió perisomàtica de neurones excitadores de la mPFC i l'amígdala basolateral en rates control i després de deu dies d'estrès crònic de restricció. Plans confocals del soma de una neurona principal (immunodetectada per CaMKII- α ; blau) on es mostren els punta perisomàtics immunoreactius per a SYN (A1 – D1; roig) i PV (A2 – D2; verd) i la seua colocalització (A3 – D3) a la mPFC (A, B) i l'amígdala basolateral (C, D). Els gràfics de la part inferior de la figura mostren canvis en la densitat lineal (nombre de punta / μm de perímetre del soma) dels punta perisomàtics que expressen sinaptofisina amb (Syn + / PV +) o sense (Syn + / PV-) coexpressió amb PV (E: mPFC; F: BLA). Els valors representen la mitjana \pm SEM. Els asteriscos indiquen diferències estadísticament significatives entre grups (control \times estrès) després de la prova *t-Student* no aparellada ($p < 0.05$). Barra d'escala 5 μm .

DISCUSSIÓ

L'objectiu principal d'aquest estudi va ser avaluar els efectes de l'estrès crònic sobre les molècules relacionades amb la plasticitat interneuronal en diferents regions del SNC d'adult. Els nostres resultats revelen únicament efectes locals sobre l'expressió de PSA-NCAM a la regió CA1 de l'hipocamp. Per contra, es mostren alteracions més àmplies i profundes en el nombre de PNNs, que en alguns casos s'associen a interneurons PV+ i en altres apareixen de manera independent a aquestes interneurons. Curiosament, aquestes alteracions en les PNNs no només es troben a les regions comunament estudiades en els models d'estrès crònics, també en àrees menys explorades, com l'habènula o el TRN.

En primer lloc, es va avaluar l'expressió de PSA-NCAM, ja que aquesta molècula s'expressa en una subpoblació d'interneurons del telencèfal adult i regula la seua estructura i connectivitat (Gómez-Climent et al. 2011). Trobàrem únicament un augment considerable de l'expressió de PSA-NCAM en l'estrat *lacunosum-moleculare* de CA1. És probable que aquests canvis afecten específicament a les cèl·lules O-LM, que són interneurons que projecten específicament a aquesta capa, i la seua morfologia i connectivitat està particularment regulada per la PSA-NCAM (Guirado, Perez-Rando, Sanchez-Matarredona, Castillo-Gómez, et al. 2014). A més, s'han observat canvis en l'estructura d'aquestes interneurons i l'expressió de GAD67 en la CA1 de ratolins sotmesos a estrès crònic (Gilbert-Juan et al. 2017). La presència d'alts nivells d'expressió de PSA-NCAM en aquestes cèl·lules pot augmentar el seu aïllament, provocant una disminució de la complexitat dendrítica i reduint la connectivitat (Gómez-Climent et al. 2011). Tanmateix, la PSA-NCAM present a la CA1 no s'associa exclusivament a elements inhibidors (Gómez-Climent et al. 2011) i, en conseqüència, els canvis d'expressió d'aquesta molècula poden estar afectant a la connectivitat de les neurones principals.

L'altre objectiu del nostre estudi es va centrar en les interneurons que expressen PV i la seua relació amb les PNNs. Els nostres resultats que mostren un augment del nombre de neurones que expressen PV en la mPFC o la BLA, per contra, en treballs anteriors es descriu una disminució de somes PV+ en regions prefrontocorticals després d'estrès crònic [5 setmanes d'estrès crònic imprevisible (Banar et al. 2017)] , tot i que alguns només es van trobar en animals anhedònics (nou setmanes d'estrès crònic lleu) (Czéh et al. 2018). Un altre treball, que utilitzava 2 setmanes d'estrès crònic imprevisible o 8 setmanes d'estrès crònic lleu, no trobà canvis en la densitat de cèl·lules PV+ en la mPFC de rates Wistar (Zadrozna et al. 2011). Tot i això, d'acord amb els nostres resultats, els estudis recents amb períodes d'estrès crònic més curts (2 setmanes) han trobat increments significatius en el nombre de cèl·lules PV+ i en el mRNA PV de la mPFC de femelles de ratolí adultes i en la densitat de punta excitadors a la regió perisomàtica de cèl·lules PV+ en ambdós sexes (Shepard et al. 2016; Shepard and Coutellier 2018). A més, els estudis de Filipovic (Filipović et al. 2018) i Todorovic

(Todorović et al. 2019) van demostrar que l'aïllament social crònic condueix a una disminució del nombre de cèl·lules PV+ a la mPFC i a l'hipocamp de rates Wistar mascles adultes.

Adicionalment, un estrès crònic variable durant 2 setmanes en la mateixa soca de rata utilitzada al nostre experiment augmentà la inhibició de les cèl·lules piramidals de la mPFC i la densitat de punta inhibidors al voltant dels somes d'aquestes neurones principals (McKlveen et al. 2016). En contraposició amb aquests resultats, no s'han trobat disminucions en la densitat de punta que coexpressen PV i SYN en els nostres animals estressats. No obstant això, la densitat de punta PV- / SYN+ va disminuir notablement, cosa que pot indicar una reducció en un altre tipus de sinapsi perisomàtica, probablement de les que provenen d'interneurones de cistella que expressen colecistocinina (CCK). Tot plegat, això està d'acord amb les reduccions recentment trobades en el nombre de neurones CCK+ en la mPFC de rates sotmeses a 9 setmanes d'estrès crònic (Czéh et al. 2018).

La variabilitat dels resultats obtinguts en el nostre estudi i els estudis anteriors sobre els efectes de l'estrès crònic a les cèl·lules PV+ poden ser producte de les diferències en la soca de rata que s'utilitza, la manca de discriminació entre les regions prefrontocorticals diferents i, particularment, la variabilitat en els protocols emprats, així com les seues duracions. És possible que en animals sotmesos a estrès durant períodes més curts es pogueren activar les interneurones PV+, provocant un augment de la inhibició de les neurones piramidals. D'altra banda, en protocols més llargs, en els quals els comportaments depressius són persistents, aquestes interneurones poden mostrar una disminució de l'activitat i de l'expressió de PV. És important esmentar que existeix una disminució de la neurotransmissió excitadora sobre les interneurones PV+ de la mPFC en animals amb indefensió adquirida i que la supressió de l'activitat d'aquestes cèl·lules inhibidores promou l'aparició d'aquest comportament depressiu (Perova et al. 2015). En conseqüència, l'activació de les interneurones PV+ en la mPFC en fases anteriors a l'estrès crònic pot ser interpretada com una resposta a fi de promoure l'establiment de conductes resistents, com als treballs de Shepard (Shepard et al. 2016; Shepard and Coutellier 2018) i com les nostres pròpies dades suggereixen. En aquest sentit, treballs anteriors apunten que el final dels 10 dies d'immobilització coincideix amb el període en què es comencen a observar els efectes d'estrès conductuals (McLaughlin et al. 2007; Reznikov et al. 2008; Grillo et al. 2015).

De manera semblant al que hem observat en la mPFC, també vam trobar un augment en el nombre de cèl·lules PV+ en la BLA de les nostres rates estressades. Reznikov i col·laboradors (Reznikov et al. 2008), fent servir el mateix paradigma d'estrès emprat en el present estudi no trobaren canvis en la densitat de cèl·lules PV+ en la BLA. Aquesta discrepància es pot originar a causa de la diferència en la

metodologia que es va aplicar per a la quantificació: nosaltres estimàrem el nombre total d'interneurons PV+ a tota la BLA mitjançant una versió modificada del mètode fraccionador (West 1993; Nacher, Alonso-Llosa, et al. 2002), mentre que les densitats cel·lulars es van calcular a partir de l'extensió mitjana-caudal de la subdivisió anterior d'aquesta regió amigdaloide (Reznikov et al. 2008). Cal mencionar, però, que Reznikov i col·laboradors (Reznikov et al. 2008) observaren un augment important del percentatge de cèl·lules PV+ que mostraven immunoreactivitat amb c-Fos en els seus nuclis, cosa que també suggereix una activació d'aquestes interneurons amb el protocol d'estrès.

No creiem que l'augment d'interneurons PV+ es dega a la incorporació de noves cèl·lules al circuit. Pensem que l'increment de la quantitat reflecteix un augment de l'expressió d'aquesta proteïna d'unió al calci i que algunes interneurons que van expressar nivells molt baixos de PV (i per tant no es detectaren en animals control), augmenten la seua expressió de PV i es poden detectar en animals estressats. S'ha observat un canvi similar cap a un augment de l'expressió de PV a l'hipocamp després d'un protocol de por condicionada (Donato et al. 2013). Així, resultats anteriors del nostre laboratori han descrit aquest fenomen a la IL després de l'aïllament social juvenil (Castillo-Gómez et al. 2017) o després del tractament amb un agonista del receptor de dopamina D2 (Castillo-Gómez et al. 2011). La reducció en el número de neurones que expressen PV no es deu a una disminució en el volum del neuròpil, perquè per a aplicar la versió modificada del mètode fraccionador hem calculat els volums de les àrees i no hem trobat diferències entre els grups estudiats.

Hi ha un altre treball que estudia l'efecte de l'estrès crònic a les PNNs durant l'edat adulta, utilitzant un estrès persistent induït per la derrota social (SDPS) en rates Wistar, un protocol de llarga durada, que indueix comportaments depressius persistents (Riga, Kramvis, et al. 2017). En aquest estudi, els autors van trobar un augment significatiu de la densitat de PNNs a CA1 de l'hipocamp i, concretament, aquelles que envolten les interneurons PV+. Aquests resultats contrasten fortament amb els que presentem nosaltres en aquesta regió hipocampal, on hi observem una disminució significativa de la densitat de PNNs. Tanmateix, no trobem diferències en el nombre de neurones PV+ envoltades per PNNs. De fet, nosaltres no hi trobem correlacions lineals significatives entre les cèl·lules PV+ i les PNNs a CA1, ni en els controls ni en els animals estressats, cosa que denota que la reducció en PNNs que observem es pot deure a una disminució de les PNNs associades a altres tipus cel·lulars, com neurones excitadores. Malgrat que Riga i col·laboradors (Riga, Kramvis, et al. 2017) trobaren que a les rates Wistar més del 90% de les PNNs de CA1 estaven associades a neurones PV+, i altres autors en van trobar al voltant del 80% en rates Long-Evans (Lensjø et al. 2017), en el nostre estudi només en trobàrem al voltant del 60%. Curiosament, encara que trobem correlacions positives entre els nombres d'interneurons PV+ i PNNs en la mPFC i en la BLA en animals controls, aquestes correlacions no

existien en individus estressats, cosa que suggereix que els canvis que observem després de l'estrès en la subpoblació d'interneurons PV+, poden ser independents de la presència de PNNs rodejant-les.

En el cas del TRN, els efectes de l'estrès haurien de ocórrer principalment sobre cèl·lules PV+, ja que aquestes neurones són una gran proporció dels constituents cel·lulars d'aquest nucli talàmic i la majoria, si no totes, estan envoltades per PNNs. Els nostres resultats en aquest nucli són especialment interessants per la seua robustesa i perquè mostren clarament per primera vegada la implicació d'aquesta regió talàmica en la resposta a l'estrès crònic durant l'edat adulta. Un estudi anterior ja va posar de manifest la putativa implicació d'aquest nucli en la resposta a l'estrès agut, a causa d'un important augment de l'expressió de c-Fos (Ons et al. 2004). S'ha de fer més recerca en aquesta regió per tal d'entendre com l'estructura, la neurotransmissió i la connectivitat de les seues neurones estan afectades per l'estrès.

Només hi ha un estudi que descriu les PNNs a l'habènula, centrat en el seu desenvolupament postnatal en ratolins (Horii-Hayashi et al. 2015); així, les presents dades són les primeres que descriuen la seua presència en animals adults i la seua modulació per estrès crònic. Encara no coneixem el fenotip de les neurones habenulars envoltades per aquestes PNNs, però el més probable és que siguen neurones excitadores, ja que les interneurons són molt rares en aquesta regió talàmica (Smith et al. 1987; Li et al. 2011; Meye et al. 2013). Els resultats actuals donen suport a treballs anteriors que assenyalen un paper destacat de l'habènula en la resposta a l'estrès crònic (Wirtshafter et al. 1994; Aizawa et al. 2013; Jacinto et al. 2017).

El significat dels augments dels nombres de PNNs que hem trobat al present estudi estan encara lluny de ser comprensibles. S'ha proposat que les PNNs puguen actuar protegint les neurones de dispar ràpid de l'estrès oxidatiu (Cabungcal et al. 2013). L'estrès crònic indueix alts nivells d'espècies reactives d'oxigen (M. Madrigal et al. 2008), els augments en PNNs en aquesta fase inicial de l'estrès poden representar un intent de les neurones per a contrarestar els efectes d'aquest estrès oxidatiu. Així doncs, es necessiten estudis amb una durada d'estrès més llarga per a saber si en les etapes últimes de l'estrès crònic el nombre de cèl·lules PV+ i de PNNs disminueix o torna als nivells control. Els ratolins transgènics amb deterioració de la regulació redox mostren una disminució al nombre de neurones PV+ i de PNN en la PFC i el TRN (Cabungcal et al. 2013; Steullet et al. 2018). Curiosament, els pacients que pateixen esquizofrènia, una malaltia en què es coneix que l'estrès és un factor de risc, també mostren reduccions de la densitat de cèl·lules PV+ i de PNNs en aquestes dues regions (Mauney et al. 2013; Steullet et al. 2018). Les PNNs també poden actuar influint en la plasticitat sinàptica, constituint una barrera física per a estabilitzar els contactes sinàptics o evitar la formació de nous contactes mitjançant l'expressió de molècules inhibidores (Nowicka et al. 2009; Sorg et al. 2016).

En conclusió, les nostres dades demostren que l'estrès crònic breu pot induir canvis en molècules relacionades en la plasticitat interneuronal, no només en les regions "clàssiques" implicades en la resposta a l'estrès, sinó també en l'habènula o el TRN, una regió en la qual hem descrit per primera vegada alteracions induïdes per aquesta experiència aversiva. Això dóna suport a la hipòtesi de que l'estrès produeix alteracions de les xarxes inhibidores i de les molècules implicades en la seua plasticitat, particularment les PNNs, poden mitjançar l'impacte de l'estrès al SNC i poden participar en el desenvolupament de certs trastorns psiquiàtrics.

ARTICLE 3

Diferències sexuals en els efectes a llarg termini de l'estrès peripubertal en la circuiteria excitadora i inhibidora de l'escorça prefrontal de ratolins

Revista: Neurobiology of stress (article en revisió)

Autors: Clara Bueno-Fernandez*, Esther Castillo-Gómez*, Julia Alcaide, Marta Perez-Rando, Carmen Sandi, Juan Nacher

Data de publicació: Desconeguda (article en revisió)

Diferències sexuals en els efectes a llarg termini de l'estrès peripubertal en la circuiteria excitadora i inhibidora de l'escorça prefrontal de ratolins.

Clara Bueno-Fernandez*, Esther Castillo-Gómez*, Julia Alcaide, Marta Perez-Rando, Carmen Sandi, Juan Nacher

RESUM

L'exposició a l'estrès crònic pot conduir a un equilibri alterat entre la neurotransmissió excitadora i la inhibidora i constitueix un factor de predisposició per al desenvolupament de diferents trastorns psiquiàtrics. La resposta cerebral a l'estrès està influenciada no sols per la durada i intensitat de l'estrès sinó també pel sexe i l'edat a la que es pateix. En aquest sentit, l'impacte dels esdeveniments estressants és especialment important durant etapes primerenques de la vida (infància i adolescència), perquè certes regions corticals, especialment l'escorça prefrontal (PFC), encara estan desenvolupant-se. En conseqüència, les experiències aversives que es produeixen durant el període peripubertal poden modificar la construcció dels circuits neuronals i provocar alteracions a llarg termini en la seua fisiologia i en el comportament. D'altra banda, és ben conegut que les dones són més susceptibles que els homes a desenvolupar trastorns psiquiàtrics en què l'estrès es considera un factor de predisposició, com ara la depressió o l'ansietat. Tot i això, el nostre coneixement sobre els efectes de l'estrès crònic en les dones encara és molt limitat. Amb l'objectiu d'analitzar el efectes a llarg termini de l'estrès peripubertal en la circuiteria excitadora i inhibidora de la PFC i si aquests efectes són dependents del sexe, hem aplicat un protocol d'estrès peripubertal (PPS) crònic imprevisible, basat en estressors psicògens que indueixen por, a ratolins mascles i femelles. Hem utilitzat dues soques de ratolins transgènics amb reporters cel·lulars fluorescents específics per estudiar com el PPS afecta l'estructura i la connectivitat de les interneurons PV+ i de les neurones piramidals de la mPFC, així com per estudiar l'expressió de molècules relacionades amb les sinapsis excitadores i inhibidores. També hem analitzat alteracions en l'expressió de PSA-NCAM i les PNNs en aquesta regió neocortical. Per validar el model d'estrès, hem mesurat conductes locomotores i relacionades amb l'ansietat, on hem vist un augment de la locomoció i l'ansietat als animals estressats. Els nostres anàlisis ens mostren com el PPS altera la relació entre l'excitació i l'inhibició a la mPFC de les femelles, però no als mascles. De la

mateixa manera, la complexitat dendrítica de les interneurons PV+ es troba lleugerament augmentada en femelles estressades, i a més, vegem en aquest grup una reducció de la densitat d'aquesta subpoblació d'interneurons. En quant a la densitat de punts que expressen marcadors sinàptics inhibidors a la regió perisomàtica de cèl·lules PV+ i piramidals, hem vist que també es troba alterada, amb una major densitat en individus estressats. Cal destacar també que la densitat d'espines dendrítiques de les cèl·lules piramidals es troba afectada de manera diferencial en mascles estressats (on disminueix) i en femelles estressades (on augmenta). Finalment, el PPS també altera la densitat de somes que expressen PSA-NCAM quan analitzem tots dos sexes junts i la densitat de cèl·lules PV+ envoltades de PNNs només en mascles.

En resum, en aquest treball presentem evidències d'alteracions a llarg termini dels circuits excitadors, i particularment dels inhibidors, de la PFC i un augment dels comportaments relacionats amb l'ansietat com a conseqüència de l'exposició al PPS, que són especialment visibles en les femelles. Aquests resultats destaquen que aquesta etapa primerenca es un període de major vulnerabilitat a les experiències aversives, especialment per a les femelles. Els nostres resultats també remarquen la importància de realitzar estudis d'estrès en ambdós gèneres, que haurien de ser prioritaris atesa la major incidència de trastorns relacionats amb l'estrès en les dones.

INTRODUCCIÓ

Tot i que l'estrès agut pot desencadenar l'adaptació dels individus a l'entorn canviant, l'estrès crònic pot provocar alteracions en la fisiologia i la connectivitat de certs circuits neuronals, que al seu torn poden provocar efectes adversos sobre el comportament i la cognició (McEwen 2000). Aquestes alteracions estan fortament influenciades per la durada i el tipus de l'estrès i tenen efectes distints sobre regions cerebrals diferents. Curiosament, la resposta cerebral a l'estrès crònic també està influenciada per l'edat de les persones, el seu sexe i els nivells d'esteroids gonadals (Spear 2000; Hodes and Epperson 2019; Mañas-Ojeda et al. 2020). L'exposició a l'estrès crònic pot conduir a un equilibri alterat entre la neurotransmissió excitadora i la inhibidora (Page and Coutellier 2019) i constitueix un factor de predisposició per al desenvolupament de diferents trastorns psiquiàtrics (McEwen 2000).

L'impacte dels esdeveniments estressants és especialment important durant la vida postnatal, perquè certes regions corticals, especialment l'escorça prefrontal (PFC), encara estan desenvolupant-se (Shaw et al. 2020). Aquestes fases finals del desenvolupament neuronal s'estenen fins a l'adolescència (en ratolins des del dia postnatal (P) 28 fins a P48) (Rice and Barone Jr. 2000). En conseqüència, les experiències aversives que es produeixen durant el període peripubertal poden modificar la construcció del circuit neuronal i provocar alteracions a llarg termini en la seva fisiologia i en el comportament (Page and Coutellier 2018; Page et al. 2018; Papilloud et al. 2018). De fet, diversos estudis han mostrat que les persones exposades a experiències estressants durant l'etapa primerenca de la vida tenen un major risc de desenvolupar psicopatologies, inclosa l'esquizofrènia, el trastorn bipolar, la depressió i l'abús de substàncies (Heim and Nemeroff 2001; Paus et al. 2008).

La majoria d'aquests trastorns psiquiàtrics van sovint s'acompanyats d'alteracions en l'estructura i la fisiologia de la PFC (Arnsten 2015). De fet, la PFC és especialment sensible a les experiències aversives i estudis recents han demostrat com l'estrès durant les etapes primerenques de la vida pot induir dèficits en algunes tasques cognitives dependents de la PFC, com ara la presa de decisions, l'atenció i la memòria de treball (Liston et al. 2006; Watt et al. 2017; Guirado et al. 2020).

Molts estudis han demostrat que l'estrès crònic pot afectar l'estructura i la connectivitat de diferents tipus de cèl·lules del PFC adult, incloses les neurones piramidals (Radley et al. 2006; McEwen and Morrison 2013), les interneurons Martinotti que expressen somatostatina (Gilabert-Juan et al. 2013) i les que expressen parvalbúmina (PV) (Czéh et al. 2018; Page et al. 2018; Pesarico et al. 2019). Les interneurons PV+ són el subtipus més abundant d'interneurons a l'escorça i juguen un paper clau en els circuits corticals, controlant la sincronització de l'activació i el temps de dispar de les neurones piramidals excitadores (Ferguson and Gao 2018). Curiosament, durant el desenvolupament,

les regions especialitzades de la matriu extracel·lular, conegudes com xarxes perineuronals (PNNs), apareixen al voltant del soma i dels segments proximals de les dendrites de les interneurons PV+ per exercir un efecte neuroprotector i controlar-ne la plasticitat (vegeu (Wang and Fawcett 2012; Testa et al. 2019) per a la revisió). L'estrès crònic altera l'expressió d'alguns components de les PNNs (Ueno et al. 2018; Pesarico et al. 2019), així com la d'altres molècules relacionades amb la plasticitat, com la forma polisialitzada de la molècula d'adhesió de cèl·lules neuronals (PSA-NCAM) (Gilabert-Juan et al. 2013). La PSA-NCAM s'expressa de manera abundant durant el desenvolupament i, com les PNNs, té un paper crític en la maduració de la connectivitat de les cèl·lules PV+ corticals (Di Cristo et al. 2007) i la seva posterior plasticitat durant l'edat adulta (Castillo-Gómez et al. 2011).

Els animals peripubertals sotmesos a estrès crònic mostren efectes conductuals a curt termini i alteracions estructurals en les neurones excitadores i inhibidores, encara que les conseqüències d'aquest estrès en els circuits corticals adults han estat menys estudiades. És important tenir en compte que la majoria dels estudis han utilitzat estressors predicibles i han avaluat els efectes de l'estrès immediatament després de l'experiència aversiva. L'estrès crònic juvenil redueix la longitud dendrítica i la densitat d'espines dendrítiques de les neurones piramidals a la PFC i aquestes alteracions persisteixen en animals adults joves (Pinzón-Parra et al. 2019). No obstant això, els efectes de l'estrès a la vida primerenca no es limiten a les neurones principals; aquesta experiència aversiva també pot desencadenar desregulacions en l'equilibri excitador-inhibidor prefrontocortical, específicament pot afavorir alteracions de les neurones PV+ i les PNNs (Page and Coutellier 2018; Ueno et al. 2018). A nivell conductual, l'estrès crònic peripubertal afavoreix una disminució de l'activitat locomotora (Platt and Stone 1982; Pinzón-Parra et al. 2019) i un augment de les conductes relacionades amb l'ansietat (Avital and Richter-Levin 2005; Page et al. 2018).

Les dones són més susceptibles que els homes a desenvolupar trastorns psiquiàtrics en què l'estrès es considera un factor de predisposició, com ara la depressió o l'ansietat (Weissman and Klerman 1977; Bangasser and Valentino 2014). Tot i això, el nostre coneixement sobre els efectes de l'estrès crònic en les dones encara és molt limitat. En la PFC adulta, l'impacte de l'estrès crònic en diferents subpoblacions de neurones sembla ser dependent del sexe, particularment en les neurones piramidals (Garrett and Wellman 2009) i en les interneurons que expressen PV (Shepard et al. 2016; Page and Coutellier 2018). Tot i que encara hi ha poca informació disponible sobre les diferències sexuals en els efectes de l'estrès peripubertal (PPS), un treball recent que fa servir estressors físics ha demostrat que pot induir alteracions en els comportaments relacionats amb la depressió i amb l'ansietat, així com en la densitat de les cèl·lules PV+ i les PNNs de manera específica per al sexe (Page and Coutellier 2018).

Per comprendre millor aquestes preguntes, hem analitzat en ratolins mascles i femelles adults l'impacte del PPS crònic imprevisible basat en estressors psicògens que indueixen por. Aquest model ja ha donat resultats interessants en rates mascles, i mostra que els animals estressats peripubertalment tenen comportaments agressius anormals durant l'edat adulta i un augment de l'ansietat (Márquez et al. 2013; Papilloud et al. 2018; Walker et al. 2018), així com alteracions en l'expressió de molècules implicades en la neurotransmissió inhibidora a l'escorça prefrontal medial (mPFC) (Tzanoulinou et al. 2016). Per assolir els nostres objectius, hem utilitzat soques de ratolins transgènics amb reporters cel·lulars fluorescents específics per estudiar com el PPS afecta a l'estructura i la connectivitat de les interneurons PV+ i de les neurones piramidals de la mPFC, així com per estudiar l'expressió de molècules relacionades amb les sinapsis excitadores i inhibidores. També hem analitzat alteracions en l'expressió de PSA-NCAM i les PNNs en aquesta regió neocortical. Per validar el model d'estrès, també hem mesurat paràmetres relacionats amb la locomoció i conductes relacionades amb l'ansietat.

MATERIAL I MÈTODES

Animals i protocol experimental

En els nostres experiments es van utilitzar dues soques de ratolí transgèniques (Jackson Laboratories; Bar Harbor, Maine, EUA): el ratolí THY1 de la línia H (C57BL / 6-Tg (Thy1-YFP) HJrs / J), que expressa proteïna fluorescent groga (YFP) en un subconjunt de neurones piramidals (Feng et al. 2000) i la línia PV-tdT (C57BL / 6-Tg (Pvalb-tdTomato) 15Gfng / J), que expressa la proteïna fluorescent tdTomato en interneurons PV+ (Kaiser et al. 2016). Els procediments experimentals es van realitzar en ambdues soques i en ambdós sexes. Els ratolins es van mantenir en condicions d'habitatge estàndard en un cicle de llum-obscuritat de 12 h. Hi havia aliment i aigua disponibles *ad libitum*.

Tota l'experimentació amb animals es va dur a terme d'acord amb la Directiva 2010/63/UE del Parlament Europeu i del Consell, de 22 de setembre de 2010, sobre protecció dels animals utilitzats amb finalitats científiques i va ser aprovada pel Comitè de Bioètica de la Universitat de València. Es va fer tot el possible per minimitzar el nombre d'animals utilitzats i el seu patiment.

Al deslletament, els ratolins mascles i femelles van ser assignats aleatòriament a les condicions de control (CONT) i estrès peripubertal (PPS). Es van utilitzar un total de 39 ratolins THY1, distribuïts en 4 grups experimentals (CONT mascle = 11, CONT femella = 12, PPS mascle = 8 i PPS femella = 8). Així mateix, es van distribuir 37 ratolins PV-tdT seguint el mateix protocol que els ratolins THY1 (CONT

mascle = 11, CONT femella = 9, PPS mascle = 8 i PPS femella = 9). El dia 28 postnatal (P28) va començar el protocol de PPS i va durar fins a P42 (*Figura 1*). Es van realitzar dues proves d'ansietat i comportament depressiu (proves de camp obert; *open field* i esquitxades de sacarosa; *sucrose splash test*) 3 dies després de la finalització del protocol PPS (P45) i quan els animals van arribar a l'edat adulta (P85). Els ratolins mascle es van perfondre a P90, però la perfusió de les femelles es va realitzar a partir d'aquesta edat, quan van arribar a la fase de diestre per evitar diferències a causa de les hormones sexuals oscil·lants. Totes les femelles van ser perfoses abans de P95. La determinació de la fase del cicle estral es va aconseguir després de l'examen microscòpic de frotis vaginals, rentant tres o cinc vegades la vagina amb solució salina tamponada amb fosfat (PBS). Es va recollir el PBS resultant de l'última esbandida i es va col·locar sobre un portaobjectes de vidre, que vam tenyir amb blau de toluidina. A continuació, es va calcular la proporció de leucòcits, cèl·lules epitelials nucleades i cèl·lules cornificades anucleades, tal com s'havia descrit prèviament (Caligioni 2009).

Estrès peripubertal

El protocol PPS es basava en l'exposició a procediments d'inducció de la por i era una modificació d'un protocol descrit prèviament en rates (Márquez et al. 2013; Papilloud et al. 2018). Breument, després de l'exposició a un camp obert durant cinc minuts a P28, el protocol d'estrès consistia a presentar 7 estressors diferents que induïen la por distribuïts en set dies no consecutius, entre P28 i P42, durant la fase de llum, seguint un horari imprevisible (*Figura 1*). Els estressors es van aplicar en dues sessions diferents (matí i vesprada) separades per un període de descans mínim de 3 h. L'ordre i el temps dels estressors es van canviar els diferents dies.

Els factors estressants van ser: (a) 5 min d'exposició a un camp obert (OF), en un espai rectangular de 40 x 40 cm; (b) Exposició de 25 minuts a l'olor sintètic de guineu, producte anomenat *trimetiltiazolina* (TMT) (9 µl) (Phero Tech Inc., Canadà), que es va col·locar en una gasa dins d'una placa petri situada al mig d'una gàbia de plàstic neta (38 × 27,5 × 31 cm); (c) punció de la cua simulant la recollida de sang, que consistia en una petita incisió realitzada a la part distal de la cua amb una agulla a dos temps; 0 min (t0') i 30 min més tard (t30'); (d) 25 min d'exposició a una plataforma elevada (EP) de 12 × 12 cm i situada a 95 cm del terra; (e) 30 minuts de retenció en un tub cònic de PVC amb múltiples forats; (f) 10 min d'exposició a la prova de suspensió de la cua (TST); i (g) col·locació durant 10 minuts a la prova de natació forçada (FST), on els animals es col·loquen dins d'un vas de precipitats de vidre (25 cm d'alçada x 14 cm Ø) mig omplert d'aigua a 23-25 °C.

Els animals control es van manipular els dies que els seus homòlegs experimentals van estar exposats a l'estrès.

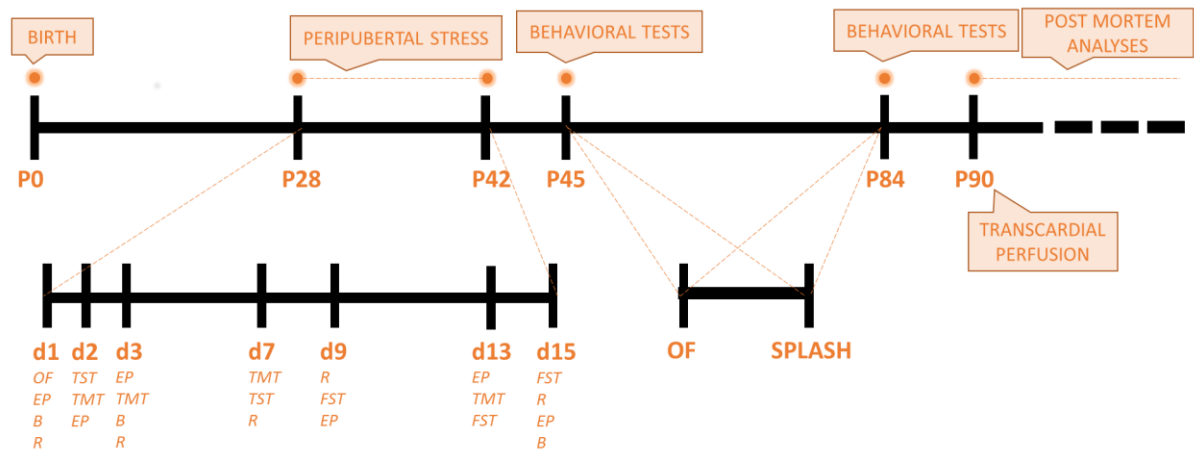


Figura 1. Cronologia de l'experiment.

Estudis comportamentals

Tant les proves de camp obert (OF) com les d'esquixada de sacarosa (*Splash*) es van realitzar a P45 i a P84, abans de la perfusió. Pel que fa a la prova OF, els ratolins es van situar al centre de la cambra i els deixarem explorar lliurement l'espai acotat durant 10 minuts. Es va utilitzar etanol al 70% per netejar la cambra cada vegada abans del seu ús i abans de proves posteriors per eliminar qualsevol pista d'olor deixada pels subjectes anteriors. Es va fer un seguiment de cada ratolí mitjançant el programari *ANY-maze* (sistema de seguiment de vídeo *ANY-maze v4.98*; *Stoelting Europe*) amb els que es va gravar el moviment dels animals durant els 10 minuts, de manera lliure i sense interrupcions. Es va registrar amb una càmera digital i es va analitzar el temps de mobilitat total (Simon et al. 1994). El sistema de seguiment de vídeo i els feixos de llum infraroja van proporcionar mesures automatitzades dels paràmetres següents: (1) distància total recorreguda, velocitat mitjana, episodis de temps mòbils i immòbils (per estudiar l'activitat locomotora) i (2) distància recorreguda a la zona perifèrica i temps mòbil a la perifèria del recinte (per mesurar l'ansietat). La zona de perifèria es va definir com la zona situada entre 0 i 6 cm de les parets de l'aparell.

La prova del *Splash*, es va realitzar després de la prova OF. Aquesta prova es va adaptar a partir de Ducottet i Belzung (Ducottet and Belzung 2004), i és un model animal validat farmacològicament per mostrar un comportament motivacional (Machado et al. 2012). La prova es va realitzar escampant una

solució de sacarosa al 10% sobre la capa dorsal dels animals ubicats dins d'un cilindre de vidre asèptic de 250 ml. El temps dedicat a netejar-se es va registrar durant 5 minuts.

Sacrifici i perfusió

La perfusió intracardial es va realitzar sota anestèsia profunda de pentobarbital, primer amb solució de NaCl al 0,9% i després amb paraformaldehid al 4% en tampó fosfat sòdic (PB 0,1 M, pH 7,4). Després de la perfusió, els cervells es van extreure del crani i es van emmagatzemar a PB 0,1 M. Els dos hemisferis es van separar i l'hemisferi dret es va tallar en seccions de 100 µm de gruix amb un vibràtom (Leica VT 1000E, Leica). Les seccions es van recollir en tres subcategories i es van emmagatzemar a 4°C en PB 0,1 M i azida sòdica el 0,05% fins que es van utilitzar.

Immunohistoquímica

Després de tallar, les seccions es van rentar en PBS i tot seguit es van incubar durant 1 h en sèrum normal d'ase (NDS; Abcys) al 10% en PBS amb Triton X-100 al 0,2% (PBST; Sigma-Aldrich). Posteriorment, es van incubar durant 48 h a 4 °C amb l'anticòs primari adequat o un còctel d'anticossos, diluït en PBST i NDS al 5% (Taula 1). La detecció de PNNs es va dur a terme mitjançant una aglutinina biotinilada diluïda 1:400 (WFA, Sigma-Aldrich) (Härtig et al. 1992a), que reconeix el component N-acetil-D-galactosamina de la matriu extracel·lular. Després del rentat, les seccions es van incubar durant 2 h a temperatura ambient amb anticossos secundaris coincidents (Taula 1) o streptavidina conjugada amb A647 (1:400, Life Technologies), que també es van diluir en PBST. Finalment, les seccions es van rentar amb PB 0,1 M, es van muntar en portaobjectes i es van impregnar amb un medi de muntatge de fluorescència (Dako North America Inc.).

Taula 1. Anticossos primaris i secundaris.

	Hoste	Dilució	Incubació	Companyia
Anti-PV	Cobaia	1:2000	48h, 4°C	Synaptic Systems
Anti-CB1R	Conill	1:1000	48h, 4°C	Synaptic Systems

Anti-VGLUT1	Cabra	1:2000	48h, 4°C	Millipore
Anti-VGAT	Conill	1:1000	48h, 4°C	Synaptic Systems
Anti-PSA-NCAM	Ratolí	1:1400	48h, 4°C	Millipore
Anti-Cobaia conjugat amb A555	Cabra	1:400	2h, temp. ambiental	Life Technologies
Anti-Conill conjugat amb A555	Cabra	1:400	2h, temp. ambiental	Invitrogen
Anti-Ratolí IgG conjugat amb A555	Ase	1:400	2h, temp. ambiental	Invitrogen
Anti-Cobaia conjugat amb DL649	Cabra	1:400	2h, temp. ambiental	Life Technologies
Anti-Conill conjugat amb A488	Ase	1:400	2h, temp. ambiental	Life Technologies
Anti-Cabra conjugat amb A555	Ase	1:400	2h, temp. ambiental	Life Technologies
Anti-Conill conjugat amb A488	Cabra	1:400	2h, temp. ambiental	Life Technologies
Anti-Conill conjugat amb A647	Ase	1:400	2h, temp. ambiental	Life Technologies
Anti-Cabra IgG conjugat A647	Ase	1:400	2h, temp. ambiental	Invitrogen

Anàlisi de la densitat de puncta al neuròpil i càlcul del ratio E/I

La densitat de puncta que expressen el transportador vesicular de GABA (VGAT, un marcador de sinapsis inhibidores) i el transportador vesicular de glutamat 1 (VGLUT1, un marcador de sinapsis excitadores) es va estudiar al neuròpil de la capa V a la subregió de la IL de la mPFC, tal com s'ha descrit prèviament (Guirado, Perez-Rando, Sanchez-Matarredona, Castrén, et al. 2014; Guirado et al. 2018). És a dir, de cada immunotinció, es van examinar talls del mateix nivell rostro-caudal amb un microscopi confocal (*Leica TCS SPE*) fent ús d'un objectiu d'oli d'immersió de 63X i un zoom digital de 2X. Els *stacks* en z realitzats al microscopi confocal cobriren tota la profunditat de la mostra i es van prendre amb una mida de pas de 0,3 µm. Només es van seleccionar subconjunts de plans confocals amb el nivell de penetració òptim per a cada anticòs. En aquests plans, es van seleccionar cinc petites regions de neuròpil (300 µm²) per analitzar-les, amb la finalitat d'evitar els vasos sanguinis i somes cel·lulars. Les imatges es van processar mitjançant el programa *FIJI-ImageJ* (Schindelin et al. 2012), tal com s'havia descrit prèviament (Guirado et al. 2018). La mitja de la densitat de puncta d'aquestes cinc àrees quadrades es va determinar mitjançant un *macro* fet a mida. Breument, les imatges es van processar primer aplicant un filtre de Gauss seguit d'una màscara binària que representa el perfil d'expressió de les molècules d'interès (VGAT i VGLUT1). A continuació, el *macro* va mesurar la intensitat de fluorescència de la màscara binaritzada i la densitat de punta. La proporció E / I al neuròpil es va definir com la densitat del puncta excitadors dividida per la densitat de puncta inhibidors.

Anàlisi de l'estructura de les interneurons que expressen parvalbúmina i de les neurones piramidals

Es va analitzar la complexitat de l'arborització dendrítica d'interneurons que expressen PV en ratolins tdT-PV i la densitat d'espines dendrítiques de les neurones piramidals en ratolins THY1. Tots els paràmetres estructurals de les interneurons que expressen tdT-PV i de les neurones piramidals YFP + es van estudiar utilitzant un microscopi confocal d'escaneig per làser (*Leica TCS SPE*). Vam centrar tots els nostres estudis en la regió IL de la mPFC.

Per a l'estudi de l'arborització dendrítica d'interneurons PV+, vam seleccionar aleatòriament 6 interneurons que expressaven tdT per animal, seguint la metodologia prèviament descrita (Gilbert-Juan et al. 2013). Es van obtenir sèries de seccions òptiques en z (mida de pas de 0,8 µm; objectiu 40X) que cobrien l'arbre dendrític de les interneurons seleccionades utilitzant el mode d'escaneig seqüencial. Per ser adequades per a l'anàlisi, aquestes interneurons havien de complir les

característiques següents: (1) l'arbre dendrític de la cèl·lula havia de mostrar com a mínim un procés amb una longitud $>120 \mu\text{m}$ i (2) el soma havia d'estar situat com a mínim a $30 \mu\text{m}$ de profunditat de la superfície del teixit. Els *stacks* obtinguts es van processar després mitjançant el programa *FIJI* (Schindelin et al. 2012) per representar reconstruccions en 3D. Les neurones es van rastrejar amb l'eina "*Simple neurite tracer*", que també ens va permetre analitzar el seu perfil *Sholl* en 3D (Longair et al. 2011), que consisteix a la mesura del nombre d'interseccions de les dendrites amb esferes de radi creixent centrades en el soma (Sholl 1953). La separació entre les esferes de l'anàlisi es va fixar en $20 \mu\text{m}$. Finalment, vam agrupar els valors en un segment proximal (els $40 \mu\text{m}$ més propers al soma), un segment medial (entre 60 i $120 \mu\text{m}$) i un segment distal (el $40 \mu\text{m}$ més distals).

Per a l'anàlisi de la densitat d'espines dendrítiques també vam centrar el nostre estudi en la IL, on es van seleccionar aleatòriament 6 neurones piramidals per animal que expressaven YFP. Es va utilitzar un objectiu d'immersió d'oli de 63X i un zoom digital addicional de 3,5X per obtenir els *stacks* confocals que cobreixen els primers $200 \mu\text{m}$ de la dendrita (mida del pas Z de $0,3 \mu\text{m}$). Les neurones piramidals que expressaven YFP van ser seleccionades aleatòriament, però les dendrites analitzades havien de complir els criteris següents per ser incloses a l'estudi: (a) la seva longitud havia de ser com a mínim de $200 \mu\text{m}$ i (b) no s'havia de trobar cap altra dendrita que creuara la seua trajectòria. A continuació, es van establir quatre segments, és a dir, el proximal ($0-50 \mu\text{m}$), proximal-medial ($50-100 \mu\text{m}$), medial-distal ($100-150 \mu\text{m}$) i distal ($150-200 \mu\text{m}$). També es va analitzar el nombre total d'espines en tot el segment de $200 \mu\text{m}$.

Anàlisi de puncta perisomàtics sobre interneurons que expressen parvalbúmina i neurones piramidals que expressen YFP

Es va analitzar la densitat de puncta que expressen diferents marcadors sinàptics a la regió perisomàtica de les interneurons PV+ i de les neurones piramidals que expressen YFP, seguint un protocol anteriorment descrit (Castillo-Gómez et al. 2011; Guirado et al. 2018). Concretament, vam estudiar la densitat de puncta que expressen el receptor 1 d'endocannabinoids (CB1R) envoltant els somes de les interneurons que expressen PV i la densitat de puncta CB1R+ i PV+ que es troben envoltant els somes de les neurones piramidals YFP+. En resum, es van prendre imatges d'entre 20 i 30 neurones piramidals i interneurons PV+ per animal en tres seccions diferents. Es van fer *stacks* en z amb el microscopi confocal que cobrien tota la profunditat del soma neuronal amb una mida de pas de $0,3 \mu\text{m}$, utilitzant un objectiu d'oli d'immersió de 63X amb zoom digital de 2X i es van processar les imatges amb *FIJI* (Schindelin et al. 2012). Es va dibuixar el perfil del soma d'aquestes neurones i es va

analitzar els puncta localitzats dins d'una àrea a 0,5 μm distal de la vora d'aquest perfil. Es va definir com a punctum una estructura que mostra una àrea entre 0,15 μm^2 i 2,5 μm^2 (Di Cristo et al. 2007). La densitat de puncta (nombre de punts per μm de perímetre de soma) es va analitzar en un sol pla confocal de cada neurona seleccionada en el que la penetració de l'anticòs va ser òptima. Les imatges es van convertir a 8 bits i es van binaritzar mitjançant un valor llindar determinat, que depenia del marcador, però era el mateix per a totes les imatges amb el mateix marcador. Les imatges es van processar amb un filtre per a reduir el soroll i separar els puncta. Finalment, es va calcular la densitat de puncta que envoltaven el soma i la seva intensitat de fluorescència (Guirado et al. 2018).

Estudi de la densitat de neurones que expressen parvalbúmina, xarxes perineuronals i la seua colocalització

La densitat de interneurons PV+, PNNs i cèl·lules PV+ envoltades de PNNs es va calcular a la IL de ratolins PV-tdT. Es van prendre imatges de dues seccions que contien IL per animal amb un microscopi confocal *Olympus FV-10* amb un objectiu d'augment de 10X. L'anàlisi de la densitat es va realitzar utilitzant el programa d'imatges *FIJI / ImageJ (NIH)*. Es van dibuixar les regions d'interès i es van calcular les seves àrees; després vam comptar el nombre de cèl·lules de cada població i vam calcular-ne les densitats. Finalment, vam obtenir la mitjana per superfície i animal i la vam utilitzar com a unitat de mostreig.

Estudi de la densitat de neurones que expressen PSA-NCAM

La densitat de cèl·lules que expressen la molècula relacionada amb la plasticitat PSA-NCAM es va estudiar en ratolins PV-tdT utilitzant el microscopi de fluorescència (*Olympus BX41*) i amb l'objectiu d'augment 40X. Es van seleccionar dues seccions que contien la regió IL per a cada animal i es va escanejar tota la regió per buscar somes immunoreactius. Es va calcular l'àrea de la IL per a cada secció amb el programa *FIJI* i, en cada cas, es va obtenir la mitjana i es va utilitzar com a unitat de mostreig per a l'anàlisi estadística.

Estadística

El disseny experimental i l'anàlisi estadística es van basar en les indicacions de Diester i col·laboradors (Diester et al. 2019). Primer vam analitzar les dades agrupades d'ambdós sexes i després les dades es van separar per sexe i es van analitzar per separat. No obstant això, vam decidir no analitzar el sexe com a factor entre subjectes, ja que la determinació de les diferències entre sexes no era un objectiu del nostre estudi. Totes les mostres es van codificar abans de l'anàlisi quantitativa i el codi no es va trencar fins que es va completar la quantificació. Per a totes les anàlisis estadístiques, es va determinar la mitjana \pm SEM, i els valors resultants es van sotmetre a l'anàlisi de la prova *t de Student*, excepte les dades de comportament, que es van analitzar amb una *ANOVA* de mesures repetides seguides d'una prova *post-hoc LSD* utilitzant el programa d'estadística IBM SPSS (v24.0). Els valors de probabilitat inferiors a 0,05 ($p < 0,05$) es van considerar estadísticament significatius. El coeficient de correlació de *Pearson* es va calcular per establir relacions entre tots els paràmetres. Tots els gràfics es van dibuixar amb *GraphPad Prism v6* (*GraphPad software Inc., EUA*).

RESULTATS

L'estrès peripubertal modifica l'activitat locomotora i el comportament relacionat amb l'ansietat, especialment en femelles adultes

Prova de camp obert

Per començar avaluarem si els ratolins exposats a l'estrès durant la pubertat mostraven respostes conductuals diferencials a l'OF en comparació amb els seus respectius grups control (*Figura 2*). Els animals passaren pel test de l'OF a P45 i a P84 per avaluar els efectes a curt i llarg termini del PPS sobre l'activitat locomotora i el comportament relacionat amb l'ansietat.

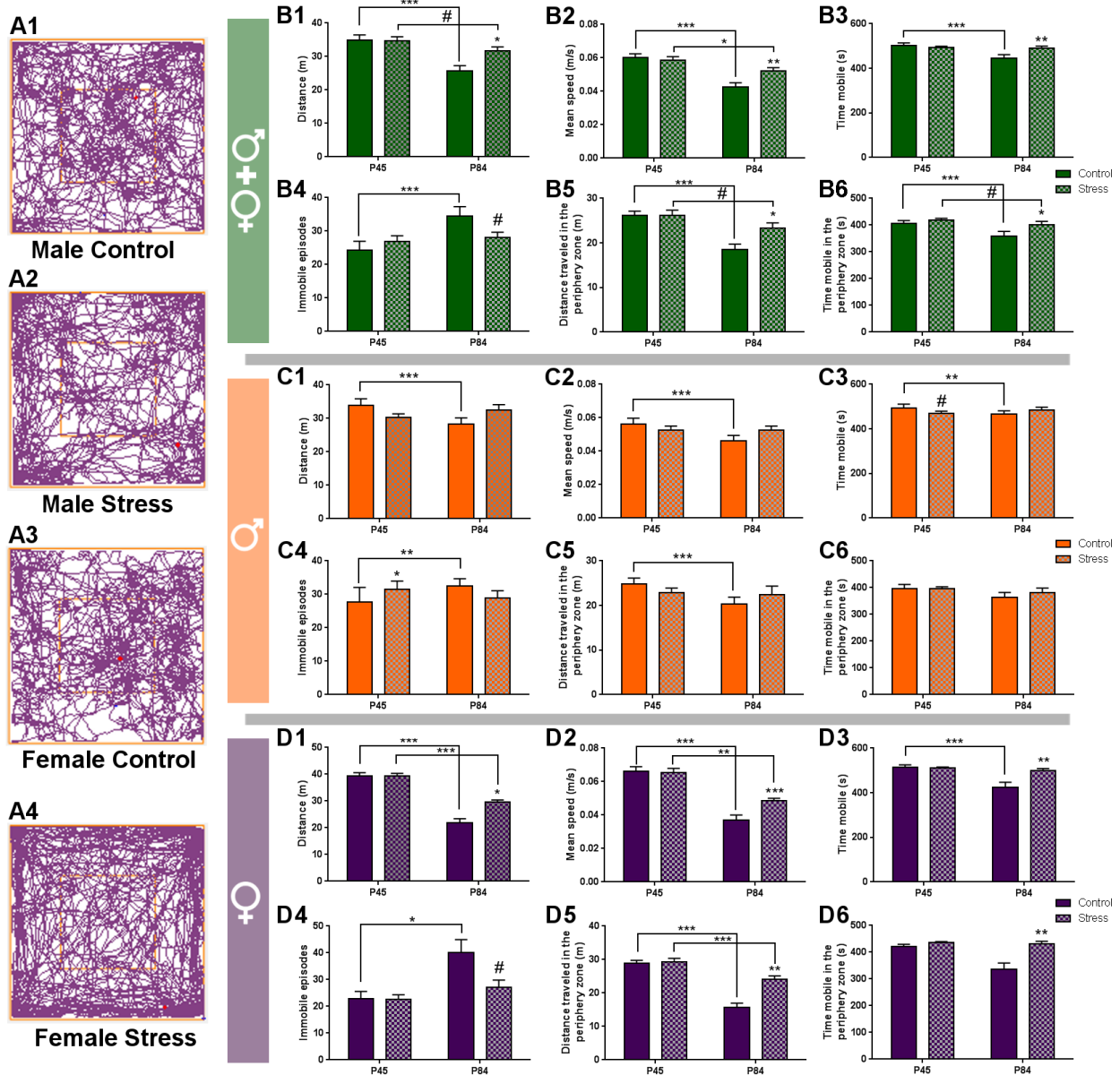


Figura 2. Efectes conductuals de l'estrès peripubertal en la prova de camp obert a P45 i P84.

Resultats conductuals dels ratolins PV-tdT en el test del camp obert, 3 dies (P45) i 42 dies (P84) després del protocol del PPS. *A:* *Track-plots* representatius del moviment de l'animal registrats durant la sessió d'OF per estudiar la locomoció i el comportament relacionat amb l'ansietat (A1-A4). *B-D:* Gràfics que mostren els canvis en els paràmetres de comportament relacionats amb l'activitat locomotora (B1-B4, C1-C4, D1-D4) i l'ansietat (B5-B6, C5-C6, D5-D6) a la prova d'OF. Els gràfics en verd inclouen dades de tots els animals experimentals (no separats per sexe, *B*). Els gràfics en taronja només inclouen dades de mascles (*C*). Els gràfics en color morat només inclouen dades de femelles (*D*). Els valors representen la mitjana \pm SEM. Els asteriscs als gràfics indiquen efectes estadísticament significatius entre grups (control x estrès) després de la prova *t de Student* sense aparellar. Símbols: # $0.1 > p > 0.05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Els nostres resultats indiquen que, en general, hi ha una disminució de l'activitat locomotora i del comportament relacionat amb l'ansietat entre animals adolescents i adults. En comparar els resultats de la prova de comportament tenint en compte els dos sexes junts, les diferències van ser estadísticament significatives entre els grups control (*Figures 2B1-6*; distància recorreguda: $p < 0,001$; velocitat mitjana: $p < 0,001$; temps mòbil: $p < 0,001$; episodis immòbils: $p < 0,001$; distància recorreguda a la zona perifèrica: $p < 0,001$; temps mòbil a la zona perifèrica: $p = 0,001$). Es va produir una disminució de P45 a P84 en tots els paràmetres, excepte en el nombre d'episodis immòbils, que van augmentar de P45 a P84. També hi va haver canvis o tendències significatives de P45 a P84 en els animals estressats (*Figures 2B1-6*; distància recorreguda: $p = 0,086$; velocitat mitjana: $p = 0,027$; distància recorreguda a la zona perifèrica: $p = 0,06$; temps mòbil a la zona perifèrica: $p = 0,06$). Aquests canvis van seguir la mateixa direcció que els descrits al grup de control. No obstant això, en analitzar els resultats només en mascles, únicament hi havia diferències estadísticament significatives en ratolins control (*Figures 2C1-6*; distància recorreguda: $p = 0,001$; velocitat mitjana: $p < 0,001$; temps mòbil: $p = 0,008$; episodis immòbils: $p = 0,003$; distància recorreguda a la zona perifèrica: $p = 0,001$). Hi va haver reduccions significatives de P45 a P84 en tots els paràmetres, excepte en el nombre d'episodis immòbils, que van augmentar de P45 a P84; no es van detectar canvis al temps mòbil a la zona de la perifèria. Les femelles, de manera similar a l'anàlisi de tots dos sexes junts, van mostrar diferències estadísticament significatives en comparar els animals control entre P45 i P84 (*Figures 2D1-6*): es va veure una disminució de la distància recorreguda ($p < 0,001$), de la velocitat mitjana ($p < 0,001$), del temps mòbil ($p = 0,001$), de la distància recorreguda a la zona de la perifèria ($p < 0,001$) i un augment dels episodis immòbils ($p = 0,035$). Quan vam comparar els grups estressats (*Figures 2D1-6*), hi va haver disminucions significatives en la distància recorreguda ($p < 0,001$), la velocitat mitjana ($p < 0,001$) i la distància recorreguda a la zona perifèrica ($p = 0,005$).

Curiosament, només trobarem efectes significatius del PPS a P45 en el grup dels mascles en analitzar el nombre d'episodis immòbils: els mascles estressats tenien més episodis immòbils que els mascles control ($p = 0,018$). En els mascles estressats també trobarem una tendència cap a la disminució del temps mòbil ($p = 0,06$) en comparació amb els mascles control (*Figura 2C3*). Quan s'analitzà el comportament dels animals a P84, trobarem una major activitat locomotora i comportaments relacionats amb l'ansietat als animals estressats. Les diferències entre els grups d'estressats i els de control van ser estadísticament significatius quan es consideraven tots dos sexes junts (*Figures 2B1-6*; distància recorreguda: $p = 0,045$; velocitat mitjana: $p = 0,003$; temps mòbil: $p = 0,008$; episodis immòbils: $p = 0,059$; distància recorreguda a la zona de la perifèria: $p = 0,026$; temps mòbil a la zona de la perifèria: $p = 0,05$), però no va poder detectar diferències estadísticament significatives entre els mascles estressats i els control (*Figures 2C1-6*; $p > 1.000$ en tots els paràmetres).

Per contra, a l'hora d'analitzar les femelles estressades i control, sí que hi havia diferències estadísticament significatives (*Figures 2D1-6*; distància recorreguda: $p = 0,04$; velocitat mitjana: $p < 0,001$; temps mòbil: $p = 0,002$; episodis immòbils: $p = 0,091$; distància recorreguda a la zona perifèrica: $p = 0,005$; temps mòbil a la zona perifèrica: $p = 0,002$). Per tant, els efectes del PPS sobre l'activitat locomotora i el comportament relacionat amb l'ansietat són especialment rellevants en les femelles.

Prova d'esquitxada de sacarosa (Splash test)

Per avaluar els efectes a curt i llarg termini del PPS sobre el comportament d'endrec induït, els animals es sotmeteren a la prova d'esquitxada de sacarosa o *splash* a P45 i P84.

D'acord amb els resultats de l'OF, la prova de l'*splash* (*Figura 3*) va demostrar comportaments relacionats amb l'ansietat (major durada de la preparació), però només quan es comparaven les anàlisis a P45 amb les de P84 i no quan es comparaven els controls amb animals estressats. En analitzar els dos sexes junts, trobarem un augment estadísticament significatiu del temps d'endrec en comparar els animals peripubertals de control i els adults adults (*Figura 3A*; $p = 0,011$) i els grups estressats en ambdues edats (*Figura 3A*; $p = 0,001$). Veierem els mateixos resultats en analitzar només les femelles (*Figura 3C*; controls; $p = 0,026$, estrès; $p = 0,015$). No trobarem diferències estadísticament significatives a l'hora d'analitzar els grups control de mascles, però hi hagué un augment significatiu en el temps d'endrec quan s'analitzen els grups d'estrès (*Figura 3B*; $p = 0,037$).

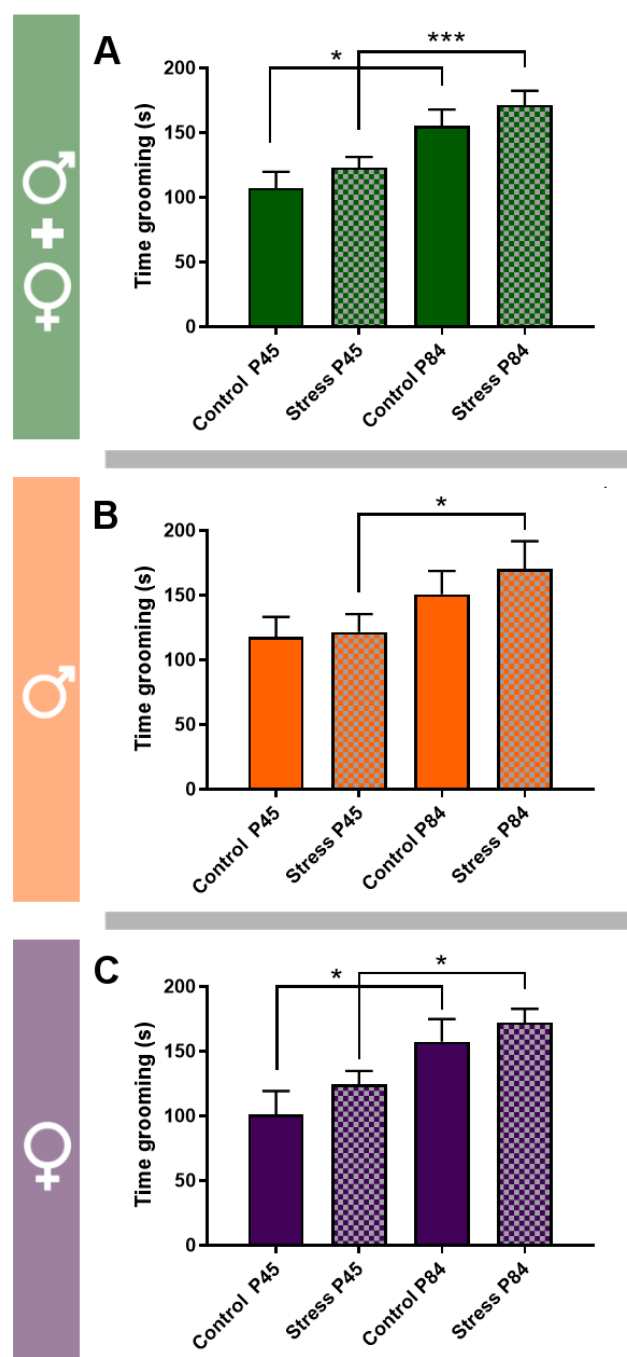


Figura 3. Efectes conductuals de l'estrès peripubertal a la prova d'esquixament de sacarosa a P45 i P84.

Histogrames que representen el temps d'endrec de l'*splash* (A-C). Els gràfics en verd inclouen dades de tots els animals experimentals (no separats per sexe, A). Els gràfics en color taronja inclouen dades de mascles (B). Els gràfics en color morat només inclouen dades de femelles (C). Els valors representen la mitjana \pm SEM. Els asteriscs en gràfics indiquen efectes estadísticament significatius entre grups d'edat (Control P45 x Control P84; Stress P45 x Stress P84) després de la prova de mesures repetides ANOVA seguides d'una prova *post-hoc*. Símbols: # 0.1 > p > 0.05; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

L'exposició a l'estrès peripubertal augmenta la densitat de puncta que expressen marcadors sinàptics inhibidors i altera la proporció E / I.

Per tenir una lectura de les alteracions de la neurotransmissió excitadora i inhibidora induïda pel PPS en animals adults, estudiarem amb immunohistoquímica la densitat de puncta que expressaven el transportador vesicular de GABA i el transportador vesicular de glutamat 1 (VGAT i VGLUT1) al neuròpil de la IL (*Figures 4A i B*). Pel que fa al puncta VGLUT1+, no trobarem diferències significatives en cap dels grups (*Figures 4C1-E1*). No obstant això, trobarem un augment de la densitat dels puncta VGAT+ en animals estressats en analitzar els dos sexes junts ($p = 0,041$) (*Figures 4C2-E2*). La relació E / I [(nombre de puncta VGLUT1+ / μm^2) / (nombre de puncta VGAT+ / μm^2); *Figures 4C3-E3*] es reduí significativament en les femelles estressades ($p = 0,018$) i també hi hagué una tendència a la disminució quan els dos sexes s'analitzaren junts ($p = 0,053$).

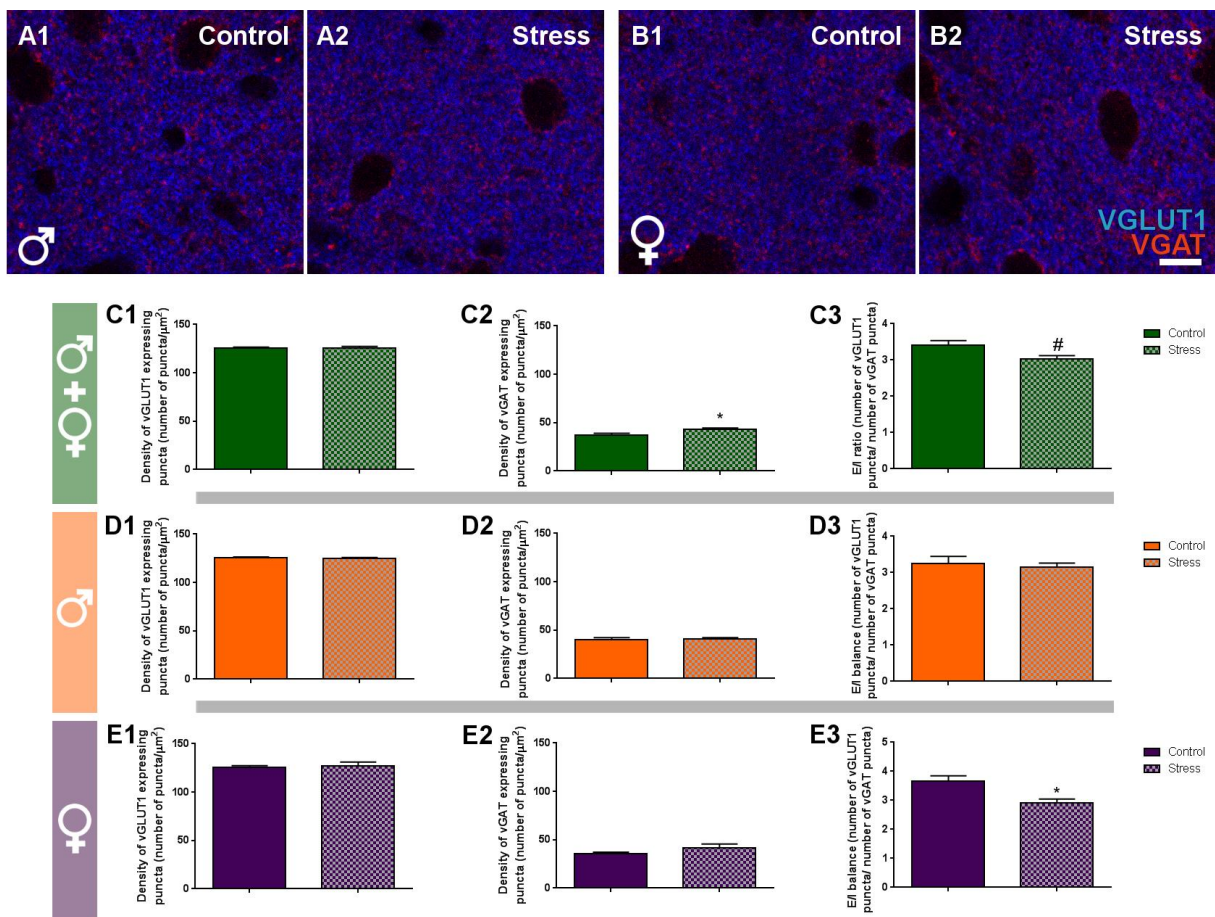


Figura 4. Anàlisi de la densitat de puncta inhibidors i excitadors.

A-B: Plans confocals únics representatius de puncta que expressen marcadors sinàptics excitadors (blaus, VGLUT1) i inhibidors (rojos, VGAT) al neuròpil de ratolins estressats i de controls, en mascles (A) i femelles (B). C-D: gràfics que representen els efectes del PPS sobre la densitat dels puncta VGLUT1+ (C1, D1, E1) i dels puncta VGAT+ (C2, D2, E2) a la subregió IL de la mPFC. També es van representar els efectes sobre la relació E / I (densitat de puncta VGLUT1+ / densitat de

puncta VGAT+; C3, D3, E3). Els gràfics de la primera fila (verd) inclouen dades de tots els animals experimentals (no separats per sexe) (C). Els gràfics de la segona fila (taronja) només inclouen dades de mascles (D). Els gràfics de la tercera fila (morat) només inclouen dades de femelles (E). Els valors representen la mitjana \pm SEM. Els asteriscs als gràfics indiquen efectes estadísticament significatius entre grups (control x estrès) després de la prova *t de Student* sense aparellar. Símbols: # 0.1 > $p > 0.05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barra d'escala de 20 μm . VGLUT1: transportador de glutamat vesicular-1. VGAT: transportador vesicular de GABA.

L'estrès peripubertal indueix un augment de la complexitat dendrítica de les interneurons que expressen parvalbúmina en les femelles.

Per analitzar si les neurones que expressen PV fòren afectades pel PPS, s'analitzà la densitat de somes PV+ a la IL i la complexitat de l'arbre dendrític d'aquestes cèl·lules mitjançant l'anàlisi de *Sholl* (Sholl 1953) (*Figures 5A & B*). No observarem cap diferència estadísticament significativa en la densitat de somes que expressen PV en analitzar els dos sexes junts o els mascles sols, però detectarem una densitat significativament inferior d'aquestes interneurons a la IL de les femelles estressades ($p = 0,028$) (*Figures 5C1-E1*). A l'anàlisi de *Sholl*, trobarem que el grup de femelles estressades mostrava una tendència cap a un augment del nombre d'interseccions amb esferes de *Sholl* en els radis de 40 μm ($p = 0,055$) i 60 μm ($p = 0,053$) (*Figures 5C2-E2*). No hi hagueren diferències significatives en els mascles ni quan analitzarem els dos sexes junts. No obstant això, quan agruparem les interseccions en tres regions diferents, tenint en compte la distància al soma (*Figures 5C3-E3*), observarem que a les regions medial ($p = 0,047$) i distal ($p = 0,049$), les femelles estressades tingueren un nombre d'interseccions significativament superior en comparació amb les femelles control.

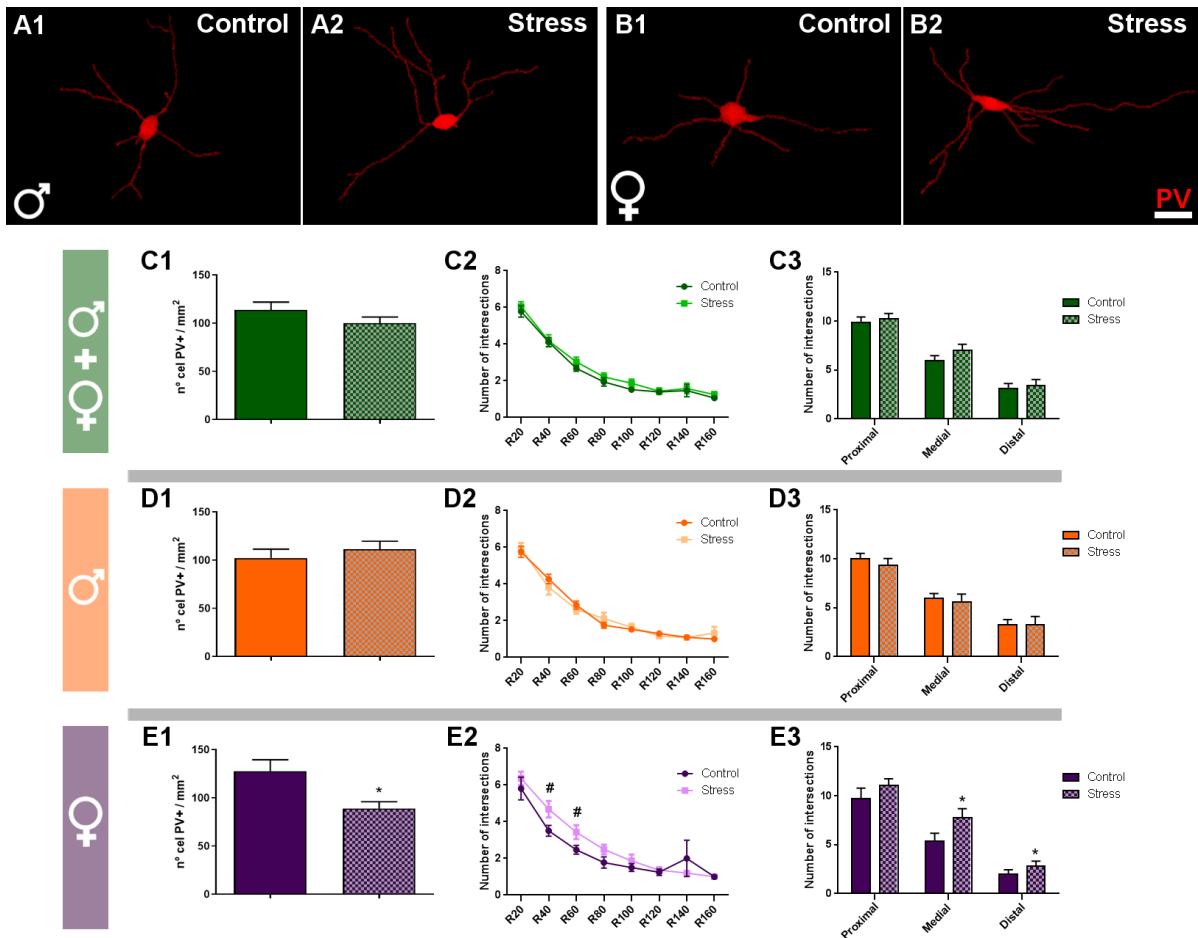


Figura 5. Anàlisi de la densitat de somes i de la complexitat de l'arbre dendrític de les interneurons que expressen parvalbúmina.

A-B: reconstruccions representatives en 3D de l'arbre dendrític de interneurons que expressen PV en animals controls i estressats, tant en mascles (A) com en femelles (B). C1- E1: gràfics que representen la densitat de somes que expressen TdTomato a la IL. C2- E2: gràfics que mostren els resultats de l'anàlisi de *Sholl* d'aquestes interneurons que expressen PV, que indiquen el nombre d'interseccions per esfera de *Sholl* (vegeu el material i els mètodes per obtenir més detalls). C3- E3: gràfics que mostren els resultats de l'anàlisi de *Sholl* agrupant les dades en regions proximal (esferes de 0-60 μm), medial (esferes de 60 a 100 μm) i distal (esferes de 100 a 160 μm). Els gràfics en verd inclouen dades de tots els animals experimentals (no separats per sexe) (C). Els gràfics en taronja només inclouen dades de mascles (D). Els gràfics en color morat només inclouen dades de femelles (E). Els valors representen la mitjana ± SEM. Els asteriscs als gràfics indiquen efectes estadísticament significatius entre grups (control x estrès) després de la prova *t de Student* sense aparellar. Símbols: # 0.1 > p > 0.05; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Barra d'escala de 25 μm.

L'estrès peripubertal altera la densitat de puncta que expressen marcadors sinàptics excitadors i inhibidors a la regió perisomàtica de les interneurons que expressen parvalbúmina i de les neurones piramidals.

Per tenir una estimació de l'input sinàptic que les cèl·lules de cistella que expressen PV o colecistoquinina (CCK) estableixen sobre els somes de les neurones piramidals YFP+ (*Figures 6A i B*) i interneurons PV+ (*Figures 6C i D*) a la IL, quantificarem la densitat de puncta perisomàtics que expressen PV o CB1R (que s'expressa en les sinapsis de cèl·lules de cistella corticals CCK+).

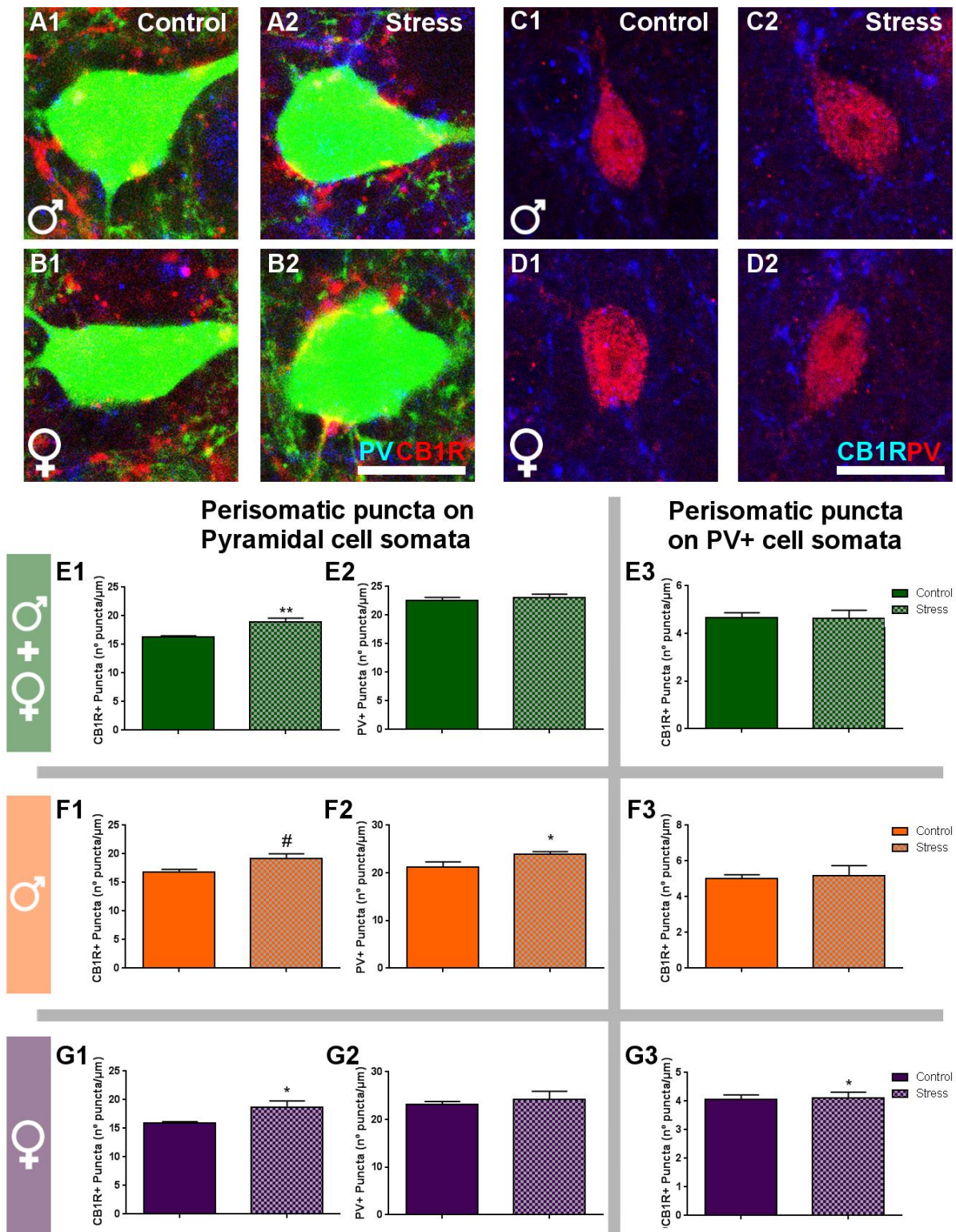


Figura 6. Densitat de punta immunoreactius per al receptor d'endocannabinoids de tipus 1 i per a la parvalbúmina a la regió perisomàtica de les neurones piramidals i de les interneurons que expressen parvalbúmina a l'escorça infralimbica.

A-D: imatges confocals (plans confocals individuals) que comparen la densitat de punta que expressen CB1R i PV en cèl·lules piramidals (A, B) i en interneurons PV+ (C, D). E-G: Histogrames que representen els canvis induïts pel PPS en la densitat (nombre de punta / μ m de perímetre de soma) de punta que expressen CB1R (E1- G1) i punta que expressen PV

(E2-G2) a la regió perisomàtica de les neurones piramidals. Els histogrames a E3-G3 representen la densitat de puncta positius per a CB1R situats al voltant dels somes PV+. Els gràfics en verd inclouen dades de tots els animals experimentals (no separats per sexe) (E). Els gràfics en taronja només inclouen les dades dels mascles (F). Els gràfics en color morat només inclouen les dades de femelles (G). Els valors representen la mitjana \pm SEM. Els asteriscs als gràfics indiquen efectes estadísticament significatius entre grups (control x estrès) després de la prova *t de Student* sense aparellar. Símbols: # 0.1 > p > 0.05; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Barra d'escala de 10 μ m. CB1R: receptor endocannabinoide de tipus 1. PV: parvalbúmina.

Trobarem que en animals sotmesos a PPS, els somes de les neurones piramidals estaven envoltats per una densitat més alta de puncta CB1R+ quan els dos sexes es van analitzar junts ($p = 0,002$, *Figura 6E1*). També s'observà una tendència cap a un augment d'aquesta densitat en ratolins mascles estressats ($p = 0,085$, *Figura 6F1*) i una densitat significativament més alta en femelles estressades ($p = 0,035$, *Figura 6G1*) en comparació amb els seus respectius controls.

En analitzar la densitat de puncta perisomàtics PV+ en neurones piramidals, observarem una densitat significativament superior en el grup de mascles estressats en comparació amb el grup de mascles control ($p = 0,046$). No es van trobar diferències significatives en considerar els dos sexes junts o només les femelles (*Figures 6E2-G2*).

L'anàlisi de la densitat de puncta perisomàtics CB1R+ de les interneurones que expressen PV revetlà una densitat significativament superior en el grup de femelles estressades en comparació amb el grup de femelles control ($p = 0,046$), però no en els mascles o quan s'agrupaven els dos sexes (*Figures 6E3-G3*).

L'estrès peripubertal altera diferencialment en mascles i femelles la densitat d'espines dendrítiques de les neurones piramidals

Hi ha evidències que indiquen que la densitat d'espines dendrítiques de les neurones piramidals a la mPFC canvia després de l'estrès crònic en animals adults (Radley et al. 2006) i juvenils (Pinzón-Parra et al. 2019). Per aquest motiu, analitzarem aquest paràmetre en el nostre experiment (*Figura 7*) i trobarem que els mascles exposats al PPS tenien una densitat significativament inferior d'espines al subsegment distal de 50 μ m de les seues dendrites en comparació amb els ratolins control (*Figura 7D*; $p = 0,045$), mentre que aquest paràmetre era significativament més alt en les femelles estressades (*Figura 7E*; $p = 0,002$). Aquestes diferències no van ser significatives quan es van agrupar els dos sexes

(Figura 7C). No es detectaren diferències significatives en analitzar els altres subsegments de 50 μm de les dendrites ni en analitzar tota l'extensió del segment dendrític considerat.

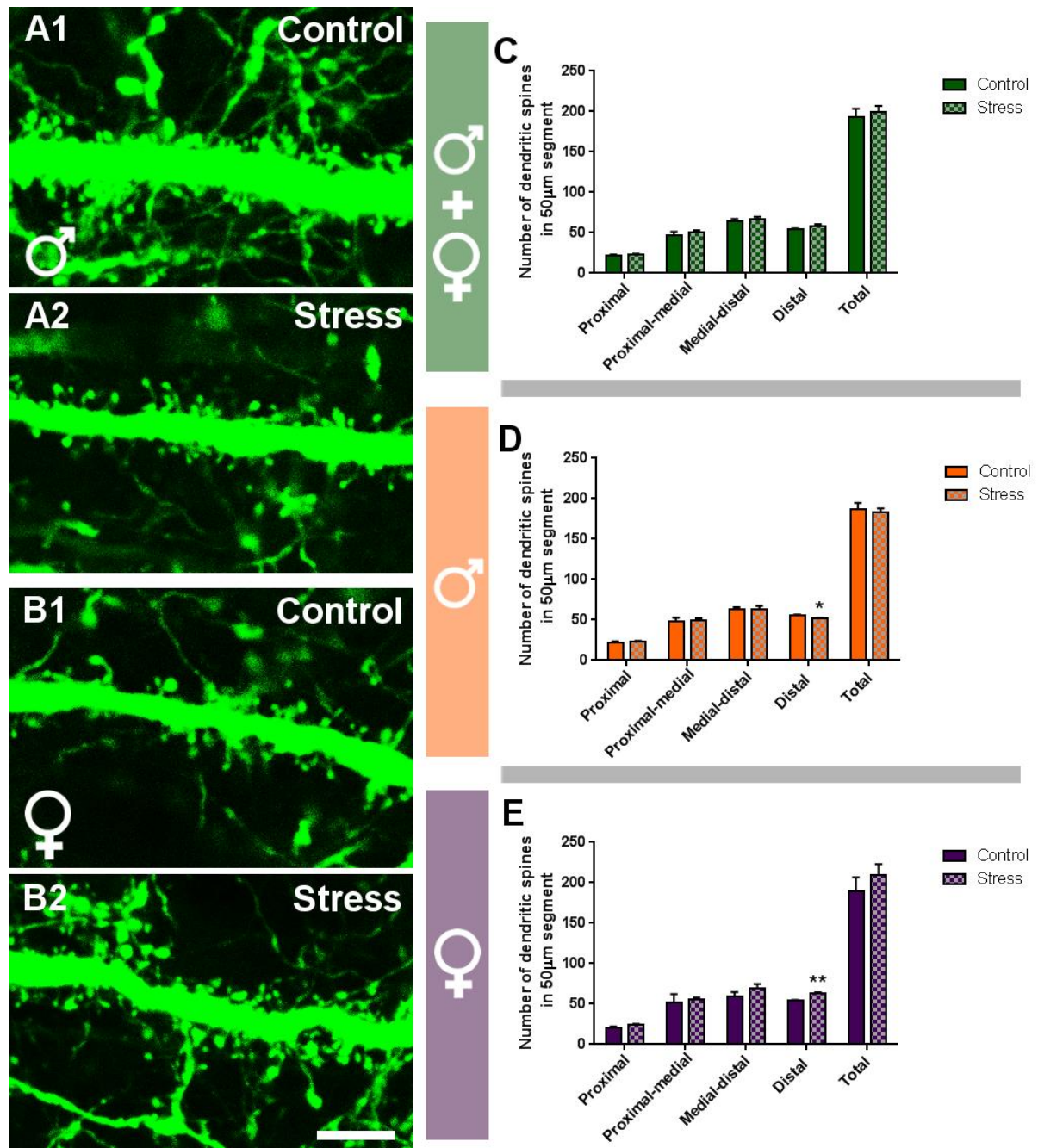


Figura 7. Anàlisi de la densitat d'espines dendrítiques a les neurones piramidals de l'escorça infralímbica.

A-B: projeccions representatives en 2D de segments de dendrites apicals espinoses de neurones piramidals d'animals controls i estressats mascles (A) i femelles (B). C-E: gràfics que mostren els resultats de l'anàlisi de la densitat d'espines dendrítiques. La densitat d'espines dendrítiques es va determinar en quatre segments de 50 μm de longitud situats a 0-50 μm (proximal), 50-100 μm (proximal-medial), 100-150 μm (medial-distal) i 150-200 μm (distal) del soma i en la longitud total

(total). El gràfic en verd inclou dades de tots els animals experimentals (no separats per sexe) (C). El gràfic en taronja només inclou dades de mascles (D). El gràfic en color morat només inclou dades de femelles (E). Els valors representen la mitjana \pm SEM. Els asteriscs als gràfics indiquen efectes estadísticament significatius entre grups (control x estrès) després de la prova *t de Student* sense aparellar. Símbols: # 0.1 > $p > 0.05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barra d'escala: 5 μm .

L'estrès peripubertal altera la densitat de somes que expressen PSA-NCAM quan s'analitzen els dos sexes junts i la densitat de cèl·lules PV+ envoltades de PNNs només en els mascles.

Atès que l'expressió de molècules relacionades amb la plasticitat neuronal, com ara components de les PNNs o la PSA-NCAM, s'altera després de l'exposició crònica a diferents estressors (Sandi 2004; Ueno et al. 2018), analitzarem aquests paràmetres a la IL en el present experiment (*Figures 8A-D*). Trobarem que el PPS no induïa canvis significatius ni en la densitat de PNNs (*Figures 8E1-G1*) ni en la densitat de cèl·lules PV+ envoltades de PNNs en animals estressats (*Figures 8E2-G2*). La densitat de somes que expressaven PSA-NCAM, augmentà en animals estressats considerant els dos sexes junts ($p = 0,041$), però no per separat (*Figures 8E3-G3*).

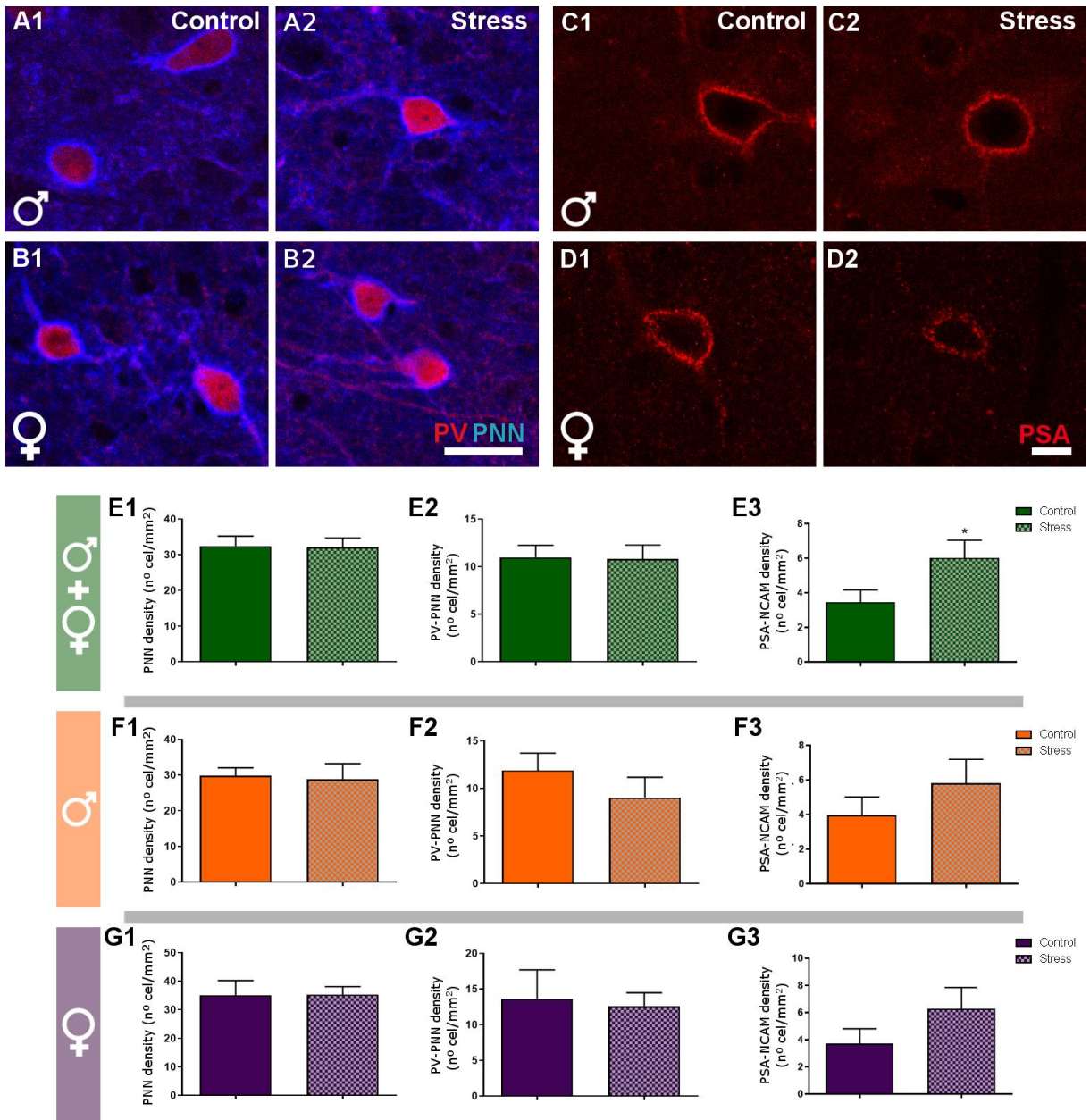


Figura 8. Anàlisi de molècules relacionades amb la plasticitat.

A-B: Plans confocals únics representatius que mostren somes immunoreactius per a PV envoltats de PNNs en mascles control i estressats (A) i femelles (B). C-D: plans confocals únics representatius que mostren somes que expressen PSA-NCAM en mascles control i estressats (C) i femelles (D). E-G: gràfics que representen canvis en la densitat de PNNs (E1, F1, G1), somes PV+ envoltats de PNNs (E2, F2, G2) i densitat de PSA-NCAM (E3, F3, G3). Els gràfics de la primera línia (color verd) inclouen dades de tots els animals experimentals (no separats per sexe) (E). Els gràfics de la segona línia (color taronja) només inclouen les dades dels animals mascles (F). Els gràfics de la tercera línia (color morat) només inclouen les dades d'animals femelles (G). Els valors representen la mitjana \pm SEM. Els asteriscs als gràfics indiquen efectes estadísticament significatius entre grups (control x estrès) després de la prova *t de Student* sense aparellar. Símbols: # 0.1 > p > 0.05; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Barra d'escala: 30 μ m. PV: parvalbúmina. PNNs: xarxes perineuronals. PSA-NCAM: forma polisialilada de la molècula d'adhesió de cèl·lules neuronals.

DISCUSSIÓ

El desenvolupament de la PFC comença a l'úter, però continua en la vida postnatal, durant la infància, l'adolescència i la primera edat adulta (Fuster 2002). Durant aquest període postnatal, tant les neurones excitadores (Petanjek et al. 2011) com les neurones inhibidores (Caballero and Tseng 2016; McKlveen et al. 2016) experimenten les etapes finals de la seua maduració, remodelant la seua estructura i connectivitat. Aquest desenvolupament prolongat de la PFC fa que aquesta regió cortical siga especialment vulnerable a experiències aversives, com l'estrès crònic. De fet, se sap que l'estrès patit durant l'adolescència té un impacte important en l'estructura de les neurones piramidals prefrontocorticals i en el desenvolupament de funcions cognitives dependents de la PFC (Tzanoulinou, García-Mompó, et al. 2014; Tzanoulinou et al. 2016). Aquestes alteracions poden constituir factors de predisposició per al desenvolupament de trastorns relacionats amb l'estrès més tard en l'edat adulta, com l'ansietat o la depressió. En aquest estudi, hem utilitzat un model murí d'estrès peripubertal per explorar alteracions a llarg termini de l'estructura i la connectivitat de les interneurons que expressen PV i de les neurones piramidals de la mPFC de mascles i femelles. Hem provat la validesa del model d'estrès en el nostre experiment mesurant la locomoció i el comportament relacionat amb l'ansietat amb el test de l'OF i el de l'*splash*.

El protocol de PPS que hem utilitzat es basa en un protocol prèviament desenvolupat i validat repetidament en rates, que també s'ha relacionat amb alteracions a llarg termini del comportament social i afectiu durant l'edat adulta (Márquez et al. 2013). Els estressors s'apliquen des de P28 fins a P42, un període de transició que cobreix final de la infància i adolescència en rosegadors, que s'associa a diferents processos de comportament i desenvolupament en la PFC (Brenhouse and Andersen 2011). Aquest model és particularment interessant perquè es basa en estressors inductors de la por amb un potent efecte psicogènic. Diversos estudis han explorat l'impacte de l'estrès durant l'adolescència, però la majoria es basen en estressors físics. Creiem que el nostre model és més naturalista i pot imitar millor algunes de les experiències aversives i inductores de la por que es produeixen durant la infància i l'adolescència humana.

També és important remarcar en aquest punt que l'impacte de l'estrès crònic és diferent entre els rosegadors mascles i les femelles (Johnson et al. 2020). En la mateixa línia, s'ha demostrat àmpliament que les dones són més vulnerables que els homes a trastorns relacionats amb l'estrès, com la depressió i l'ansietat (Eid et al. 2019). Curiosament i d'acord amb aquestes dades, hem observat que la majoria dels efectes a llarg termini del nostre PPS només es van observar en femelles o en considerar els dos sexes junts, però poques vegades només en mascles. És interessant notar que açò es produeix a nivell de comportament, però també a nivell cel·lular i molecular.

A l'hora de considerar el comportament, els nostres resultats, que mostren un augment de la locomoció en ratolins adults quan considerem els dos sexes junts i només en femelles (quan les dades estaven separades per sexe), concorden amb els resultats de publicacions anteriors de diferents tipus d'estressors aplicats crònicament durant l'adolescència en rates, com a aïllament postdeslletament en mascles (Ishikawa et al. 2014; Castillo-Gómez et al. 2017) i estrès per restricció en ambdós sexes (Eiland et al. 2012). Un estudi recent en ratolins mascles que utilitzava també estrès crònic durant l'adolescència, però amb estressors físics, també va trobar augments de l'activitat locomotora, tot i que el comportament dels animals es va analitzar immediatament després de l'estrès i no a l'edat adulta (Ueno et al. 2018). Tanmateix, cal esmentar que alguns altres estudis realitzats en ratolins mascles, que utilitzaven l'aïllament i la natació forçada com a estressors, observaren disminucions en la distància recorreguda (Page and Coutellier 2018).

El paradigma PPS utilitzat en el nostre estudi indueix a l'agressivitat i augmenta l'ansietat en rates adultes (Márquez et al. 2013; Veenit et al. 2013; Walker and Sandi 2018). La majoria d'aquests estudis es van realitzar en rates mascles, però es van trobar resultats similars en considerar junts mascles i femelles (Eiland et al. 2012; Ishikawa et al. 2014). En analitzar les dades de l'OF, observarem augments als paràmetres relacionats amb l'ansietat en les femelles i també en considerar tots dos sexes junts. S'han trobat resultats similars en els comportaments relacionats amb l'ansietat en un estudi recent, en què els ratolins estaven exposats crònicament a estressors físics (estrès lleu) durant el mateix període peripubertal del nostre estudi (Page and Coutellier 2018).

L'activitat d'endreç és un comportament complex que és sensible a l'estrès i, per tant, pot servir com a mesura útil d'ansietat o comportament depressiu en animals de laboratori. Els nostres resultats al test de l'*splash* indiquen ansietat augmentada. En línia amb els altres resultats de comportament, aquests canvis es van observar principalment en femelles o quan els dos sexes van ser analitzats conjuntament.

Totes aquestes alteracions del comportament a llarg termini induïdes pel PPS haurien de ser suportades per canvis en la neurotransmissió, la connectivitat i la fisiologia de les xarxes neuronals. En el present estudi, hem trobat un efecte diferencial de l'estrès sobre la densitat d'espines dendrítiques de les neurones piramidals a la IL segons el sexe analitzat: augmentava en les femelles, mentre que disminuïa en els mascles. Aquests canvis es van restringir al segment més distal de dendrita analitzat, que és una característica comuna en aquest tipus d'anàlisi. Els nostres resultats en mascles són coherents amb els de publicacions anteriors que descrivien una disminució de la densitat d'espines dendrítiques en la mPFC després de l'estrès crònic, tant durant les primeres etapes de la vida com durant l'edat adulta. Tot i que la majoria d'estudis realitzats en ratolins adults s'han centrat en l'escorça

prelímbrica (PrL), se sap que el tractament crònic amb corticosterona redueix la densitat d'espines dendrítiques en neurones piramidals de la IL adulta (Gourley et al. 2013). Els estudis sobre els efectes de l'estrès crònic durant les etapes primerenques de la vida són escassos, però la restricció crònica (Eiland et al. 2012) o l'estrès social (Urban et al. 2019) durant l'adolescència i la separació maternal (Chocyk et al. 2013) en rates mascles indueixen canvis estructurals similars als observats per nosaltres. Tot i això, cal assenyalar que en aquests estudis els animals es van analitzar immediatament després dels estressors i no a l'edat adulta. També cal esmentar que un altre estudi que utilitzà estrès per restricció crònica durant l'adolescència en ratolins mascles i femelles juntes no va trobar alteracions en la densitat d'espines dendrítiques en la mPFC (Chohan et al. 2014). Les rates mascles sotmeses a estrès de xoc al peu durant l'adolescència i analitzades durant l'edat adulta, mostren disminucions en densitat d'espines dendrítiques en neurones piramidals de la PFC, específicament en la IL (Lyttle et al. 2015), la qual cosa és coherent amb els nostres resultats. En aquesta línia, un estudi previ del nostre laboratori va demostrar que l'aïllament social després del deslletament també va disminuir la densitat d'espines en segments medials / distals de neurones piramidals en la mPFC en ratolins mascles (Castillo-Gómez et al. 2017). No obstant això, estudis recents que van utilitzar l'estrès d'inestabilitat social durant l'adolescència en ratolins mascles van donar resultats contradictoris: mentre que un estudi va trobar disminucions significatives de la densitat d'espines a la mPFC i específicament a la IL (Wang et al. 2020), altres no van trobar canvis en aquest paràmetre (Breach et al. 2019). Malauradament, els estudis sobre els efectes de l'estrès en les femelles encara són molt escassos. No obstant això, en general mostren que els rosegadors adults sotmesos a estrès no presenten canvis dendrítics o fins i tot poden presentar hipertròfia dendrítica a la mPFC (Wohleb et al. 2018; Iqbal and Ma 2020; Wellman et al. 2020).

Aquests canvis en l'estructura de les neurones piramidals poden estar relacionats amb alteracions de l'equilibri excitació / inhibició, que són crucials per a la funció de la PFC i també s'alteren en models d'estrès crònic i trastorns psiquiàtrics relacionats amb l'estrès (Page and Coutellier 2019). Hem analitzat la densitat de puncta que expressen proteïnes sinàptiques inhibidores o excitadores per explorar aquest equilibri. No hem trobat canvis en la densitat de puncta que expressen el marcador excitador VGLUT1, cosa que és coherent amb els nostres resultats anteriors on analitzem els efectes de l'aïllament social postdeslletament en ratolins adults (Castillo-Gómez et al. 2017). Per contra, hem observat un augment significatiu de la densitat de puncta positius per a VGAT, que condueix a una disminució de la proporció entre la densitat dels puncta excitadors i la dels inhibidors. Aquests resultats es poden observar quan es consideren els dos sexes junts i en femelles, el que suggereix una major susceptibilitat de les femelles al PPS. Aquest augment de la densitat de puncta inhibidors suggereix un augment de la neurotransmissió inhibidora i, en conseqüència, una hipoactivitat de la mPFC. Això està

d'acord amb els resultats anteriors en rates joves sotmeses a diferents paradigmes d'estrès crònic: l'estrès crònic variable augmenta els terminals postsinàptics inhibidors, cosa que suggereix una elevada alliberació de GABA, acompanyada d'un augment dels terminals inhibidors a les cèl·lules glutamatergiques (McKlveen et al. 2016). No obstant això, treballs anteriors del nostre laboratori, on utilitzarem un paradigma de PPS molt similar en rates mascles, mostraren una expressió reduïda de proteïna GAD6 a la PrL i la IL durant l'edat adulta (Tzanoulinou et al. 2016). Altres estudis en ratolins, que utilitzaren com a estressors una combinació d'aïllament social i natació forçada durant l'adolescència, trobaren una tendència cap a una reducció de l'ARNm de VGAT, però no de GAD67 o de gefirina en individus adults (Page et al. 2018). Es van trobar resultats negatius similars al nostre laboratori quan analitzarem l'impacte de l'aïllament social després del deslletament (Castillo-Gómez et al. 2017). No hem analitzat l'expressió de GAD67 o GAD65 en el present experiment, però seria possible que es donara una reducció de l'expressió d'aquests enzims durant l'edat adulta com a efecte compensatori front a l'augment de les sinapsis inhibidores.

Page i Coutellier (Page and Coutellier 2019) han proposat una hipòtesi interessant: la hipoactivitat de la PFC induïda per l'estrès pot ser deguda a l'augment de l'activació de les cèl·lules que expressen PV. Hem explorat aquesta possibilitat en el nostre model de PPS analitzant l'estructura i la connectivitat de les interneurons PV+ a la mPFC, així com la presència de PNNs que envolten aquestes cèl·lules inhibidores. Els passos finals de la maduració de la PFC impliquen augments en l'entrada glutamatergica a les cèl·lules PV+ i en l'expressió de PV, que, curiosament, es produeixen abans a les femelles, almenys a l'hipocamp (Wu et al. 2014). Aquestes últimes etapes del desenvolupament de les cèl·lules PV+ també es regeixen per l'aparició de PNNs que envolten aquestes interneurons (Caballero and Tseng 2016; Ueno, Suemitsu, Murakami, et al. 2017).

L'estrès crònic durant l'edat adulta té un impacte important en les interneurons prefrontocorticals que expressen PV. Estudis amb diversos paradigmes d'estrès en rates i ratolins han reportat augments en el nombre o densitat de cèl·lules immunoreactives per a la PV i l'expressió d'ARNm de PV (Shepard et al. 2016; Shepard and Coutellier 2018; Pesarico et al. 2019). Cal assenyalar, però, que alguns altres estudis no van trobar canvis (Zadrozna et al. 2011) ni van trobar disminucions en aquests paràmetres (Banasr et al. 2017; Czéh et al. 2018; Todorović et al. 2019). No obstant això, aquests últims estudis van utilitzar protocols d'estrès més llargs o van seleccionar animals exclusivament anhedònics. Les dades d'animals estressats durant el període peripubertal també són heterogènies. Les nostres dades que indiquen una manca de diferències en la densitat d'interneurons que expressen PV en la mPFC de ratolins mascles concorden amb els estudis que utilitzen una combinació d'aïllament social i natació forçada (Page et al. 2018) o estrès de restricció crònica (Clarke et al. 2019). No obstant això, en un altre

estudi, que va utilitzar una combinació d'estressors físics durant l'adolescència trobaren una reducció de la densitat de cèl·lules PV+ a la PrL, tot i que només en ratolins mascles (Page and Coutellier 2018). No es van detectar diferències a la IL ni a l'anàlisi de les femelles (encara que la fase del cicle estral no es va controlar al sacrifici). Ueno i col·laboradors (2018) tampoc van trobar diferències en la densitat d'interneurons PV+ a la mPFC després d'aplicar estressors físics a ratolins mascles durant l'etapa de l'adolescència, tot i que aquests resultats s'observaren en animals juvenils. Els nostres resultats suggereixen que els efectes del PPS sobre les interneurons PV+ són més forts en les femelles, que no només presenten una densitat reduïda d'aquestes cèl·lules, sinó que també presenten notablement augmentada l'arborització dendrítica. Aquesta densitat reduïda pot ser deguda a una disminució de l'expressió de la proteïna PV. D'altra banda, l'augment de l'arborització dendrítica pot reflectir un efecte compensatori a la disminució de l'expressió de PV i / o la conseqüència dels canvis en el microcircuit que es comenten a continuació.

S'han trobat resultats contradictoris en diferents estudis sobre el percentatge de cèl·lules PV+ recobertes per PNNs en la PFC de rosegadors adults sotmesos a PPS. Tot i que un estudi va trobar un augment d'aquest percentatge quan les rates van estar exposades a l'aïllament social i a la natació forçada durant l'adolescència (Page et al. 2018), un altre estudi del mateix grup no va trobar diferències en aquest paràmetre en analitzar ratolins sotmesos a estressors físics peripubertals (Page and Coutellier 2018), la qual cosa és coherent amb els nostres resultats actuals. S'obteniren resultats negatius similars en altres experiments amb estressors físics peripubertals (Ueno et al. 2018). Per contra, l'aïllament social després del deslletament va augmentar el nombre de PNNs i el de les interneurons PV+ cobertes per PNNs a la mPFC (Castillo-Gómez et al. 2017).

Hem trobat que el PPS va augmentar l'expressió de PSA-NCAM, significativament quan els dos sexes es van agrupar. S'han trobat resultats contradictoris sobre aquest paràmetre depenent del moment en que els individus són estressats. Així, en l'experiment d'aïllament social després del deslletament fet al nostre laboratori, observarem que tot i que no es trobaren canvis significatius en l'expressió de PSA-NCAM, es trobà una disminució marcada en l'expressió de l'enzim responsable de la polisial·lilació de NCAM en interneurons (St8SialV) (Castillo-Gómez et al. 2017). En estudis d'estrès crònic en rosegadors adults, els resultats també varien; s'han trobat disminucions en l'expressió de PSA-NCAM (Djordjevic et al. 2010, 2012). Aquests resultats són interessants perquè estudis previs del nostre laboratori han demostrat que aquestes variacions a l'expressió de PSA-NCAM tenen un impacte important sobre l'estructura i la connectivitat de les cèl·lules de cistella PV+ prefrontocorticals (Gilabert-Juan et al. 2011).

Per estudiar les alteracions en la connectivitat inhibidora sobre les neurones piramidals en la PFC dels animals sotmesos a PPS, hem analitzat la densitat de punts perisomàtics PV+ sobre el seu soma. Sorprenentment, i en contrast amb la majoria dels resultats del nostre estudi, només es va trobar un augment significatiu d'aquest paràmetre en els mascles. Aquests resultats suggereixen un augment de la inhibició de les neurones piramidals. Curiosament, i en línia amb aquests resultats, un estudi recent ha trobat un augment de la densitat de punts excitadors a les cèl·lules PV+ després d'un estrès crònic imprevisible en ratolins adults (ambdós sexes) (Shepard and Coutellier 2018). De la mateixa manera, les rates adultes sotmeses a 2 setmanes d'estrès crònic imprevisible mostren una inhibició més elevada de les neurones piramidals de la mPFC i un augment de la densitat de punts perisomàtics inhibidors, que prové principalment de cèl·lules de cistella PV+ (McKlveen et al. 2016). No obstant això, no es van observar canvis en aquests paràmetres en un altre estudi en què les rates adultes van ser sotmeses a estrès per restricció durant 10 dies (Pesarico et al. 2019). Una possible explicació d'aquests resultats contradictoris és que l'activitat de les neurones PV+ podria ser diferent en diferents fases de l'estrès, ja que els protocols d'estrès més llargs semblen alterar l'input inhibidor de les interneurones PV+.

A l'escorça cerebral, els CB1R s'expressen majoritàriament als terminals presinàptics de les cèl·lules de cistella CCK+ i, sobretot, en la PFC s'expressen principalment en les neurones inhibidores (Wędzony and Chocyk 2009; Katona and Freund 2012). Per analitzar més a fons els efectes del PPS sobre la inhibició perisomàtica de les neurones piramidals, però també per analitzar aquest tipus d'inhibició sobre les neurones que expressen PV, hem estudiat la densitat de punts perisomàtics que expressen CB1R en aquestes dues poblacions neuronals. Observarem que el PPS indueix un augment important d'aquesta densitat en ambdues poblacions, però només en les femelles. També hi ha un augment de la densitat de punts que expressen CB1R a la regió perisomàtica de les neurones piramidals quan vam analitzar tots dos sexes junts. En models animals d'estrès, s'han descrit freqüentment alteracions similars en el sistema cannabinoide. Per exemple, l'estrès per restricció crònica en rates adultes augmenta la unió al receptor CB1R a la mPFC i es pot observar el mateix efecte en rates adolescents (Lee and Hill 2013). L'estrès crònic imprevisible durant l'edat adulta (Hill et al. 2008) i la deprivació maternal també condueixen a una major expressió de CB1R a la PFC (Marco et al. 2014). D'acord amb aquests resultats i els nostres, un estudi ha descrit que la PFC dorsolateral de pacients amb depressió té una densitat augmentada de CB1R (Choi et al. 2012).

En resum, en aquest treball presentem evidències d'alteracions a llarg termini dels circuits excitadors, i particularment dels inhibidors, de la PFC i un augment dels comportaments relacionats amb l'ansietat com a conseqüència de l'exposició al PPS, que és especialment visible en les femelles.

Aquests resultats destaquen que aquesta etapa primerenca és un període de major vulnerabilitat a les experiències aversives, especialment per a les femelles. Els nostres resultats també remarquen la importància de realitzar estudis d'estrès en ambdós gèneres, que haurien de ser prioritaris atesa la major incidència de trastorns relacionats amb l'estrès en les dones.

IV. DISCUSSIÓ

Ús d'estrès crònic com a model de depressió en rosegadors.

En les passades dècades, els models animals de depressió han anat guanyant pes per arribar a comprendre la etiopatologia d'aquesta malaltia. Molts estudis suggereixen que l'aparició de la depressió està estretament relacionada amb l'estrès que pateix l'individu al llarg de la seua vida (McGonagle and Kessler 1990; Beck et al. 1998; Meyer et al. 2001; Mazure et al. 2002; Hammen 2005).

Quan parlem d'estrès crònic ens referim a una experiència aversiva repetida al llarg del temps. Molts estudis mostren que aquest tipus d'estrès és el més adequat com a model de depressió en animals (Fuchs and Flügge 2003; Hammen 2005; Riga, Schmitz, et al. 2017). Hi ha diferents tipus d'estrès crònic i a aquesta tesis hem presentat únicament dos d'ells.

L'estrès per restricció és un model d'estrès prou simple que requereix menys temps, cost i manutenció que altres models. S'ha vist que aquest tipus d'estrès produeix comportament depressiu en animals i s'utilitza com a inductor de desordres psiquiàtrics (Campos et al. 2013). El seu punt en contra més important és el fet de que els animals poden preveure que és el que els passarà i acaben per assumir-ho, de manera que al poc temps d'utilitzar-lo els individus estan acostumats i no ofereixen resistència, la qual cosa suposa que els nivells d'estrès que aquest genera disminueixen notablement.

L'estrès crònic impredecible es considera divers i aleatori i en gran mesura és similar a algunes situacions de la vida humana. Aquesta diversitat als estressors fa que els individus no puguin preveure què serà el que els passarà posteriorment i manté l'estat d'alarma de manera constant durant un llarg període de temps. Per contra, es considera un protocol molt més costós tant a nivell econòmic (implica una gran quantitat d'estressors i material) com en termes de temps.

Els dos models utilitzats pretenen estudiar com afecten diferents tipus d'estressors a les estructures que componen el sistema límbic, i tots dos són models validats científicament.

Efectes de l'estrès per restricció durant 21 dies en ratolins mascles adults.

Els animals utilitzats en aquest estudi van ser pesats diàriament, però no presentàren cap canvi al pes induït per l'estrès (Gilbert-Juan et al. 2011). És conegut que en altres soques, l'estrès sí que té un efecte sobre el pes corporal dels animals (Chmielarz et al. 2016). Açò podria indicar que la soca utilitzada al present experiment podria ser particularment resistent als canvis de pes, ja que en altres treballs on s'utilitzen altres tipus d'estressors crònics, com l'aïllament social, tampoc van induir canvis en el pes corporal (Volden et al. 2013). Un treball similar al nostre on es sotmet a ratolins de la mateixa

soca que nosaltres fem servir (C57BL6/J) i d'altra soca (BALB/c), mostra com totes dues soques presenten una disminució de pes rere 21 dies d'estrès per restricció (Tsuchimine et al. 2020). La diferència amb els nostres resultats podria deure's a que el protocol d'estrès utilitzat en el treball de Tsuchimine i col·laboradors s'exten durant 6 hores al dia, i al nostre cas, l'estressor sols s'aplica durant 1 hora al dia, cosa que faria que el nostre model fora prou més lleu. Futurs estudis haurien de mesurar els nivells de corticosterona per tal de revelar canvis fisiològics associats a la plasticitat neuronal induïda per l'estrès.

En quant a l'arborització dendrítica, els nostres resultats mostren una reducció d'aquesta a les interneurons SOM+ de la regió CA1 de l'hipocamp, però açò no ocorre a les de CA3 rere el protocol d'estrès crònic. Cal tenir en compte que aquest paradigma d'estrès per restricció crònica (1 h al dia, 21 dies) es considera un procés lleu. De fet, estudis anteriors han demostrat que en rates no són suficients 2 hores de restricció al dia per a induir la remodelació dendrítica en neurones hipocampals piramidals (McLaughlin et al. 2007). No obstant això, duracions de restricció similars (2-3 hores) són capaces d'induir canvis morfològics, neuroquímics i de comportament en els ratolins (Qin et al. 2011; Satoh et al. 2011) i els nostres experiments anteriors mitjançant el mateix paradigma de l'estrès i la mateixa soca actual mostraven canvis en l'estructura de les interneurons de l'amígdala i de l'hipocamp (Gilbert-Juan et al. 2011, 2013). Les cèl·lules EGFP+ a la regió CA1 de ratolins GIN són interneurons O-LM, que projecten a les dendrites apicals distals de les neurones piramidals en l'estrat *lacunosum-moleculare* (Oliva et al. 2000).

Altres estudis que analitzen els efectes de l'estrès sobre les neurones excitadores van mostrar que aquestes també es poden veure alterades. S'han obtingut resultats similars a la regió CA1 de l'hipocamp d'algunes soques de ratolins sotmesos a estrès crònic, on s'ha observat atrofia dendrítica apical, incloent una retracció dels seus segments dendrítics terminals i una reducció de la densitat d'espines en neurones piramidals (Pawlak et al. 2005; Christian et al. 2011; Magariños et al. 2011; McEwen et al. 2015).

És possible que la reducció de l'arborització dendrítica en les interneurons O-LM pugui produir una disminució de la densitat o alteracions en la neurotransmissió dels contactes sinàptics que aquestes fan sobre les dendrites distals de les neurones piramidals. En el sentit contrari, l'atròfia de l'arbre distal de les neurones piramidals també pot induir reduccions del nombre de contactes sinàptics realitzats per les interneurons O-LM o alterar la seva funció i això té un impacte en la seva arborització dendrítica.

Així mateix, al nostre treball, no trobem cap diferència significativa en la densitat d'espines dendrítiques d'aquesta subpoblació d'interneurons, ni a CA1 ni a CA3. En altres treballs d'altres laboratoris s'analitzen els efectes a temps real de l'estrès sobre algunes interneurons com són les PV+, i es veuen canvis estructurals però rere protocols d'estrès més llargs que el nostre (Ng et al. 2018). Açò suggereix que el ritme d'afectació o la resistència front a l'estrès, és depenent de la població cel·lular de la que parlem. Així mateix, els tipus d'estressors aplicats podrien influir també en la manera en que reaccionen els diferents tipus cel·lulars.

Futurs experiments haurien d'explorar en detall el transcurs del temps de la remodelació neuronal induïda per l'estrès tant en les neurones principals com en les interneurons.

No obstant això, la reducció de l'expressió de GAD67 que hem observat en l'estrat *lacunosum-moleculare* de CA1 després de l'estrès és coherent amb aquestes reduccions putatives en l'entrada que les cèl·lules O-LM envien a les dendrites distals de les neurones piramidals. No es van detectar canvis en l'expressió de GAD67 a l'estrat *lacunosum-moleculare* de CA3, cosa que s'explica, almenys parcialment, per la manca de remodelació estructural de les interneurons O-LM de CA3. No obstant això, s'han observat reduccions de l'expressió de GAD67 en els estrats *lucidum* i *radiatum*, que molt probablement es deuen a canvis en altres subpoblacions interneuronals, com ara les associades a les fibres molsoses o les interneurons multipolars de CA3 que expressen calbindina, entre d'altres (Freund and Buzsáki 1996; Vida and Frotscher 2000). També és possible que almenys una part d'aquesta reducció es pugui deure a mort cel·lular. Tot i que no hi ha evidència de degeneració neuronal en aquesta regió hipocampal després d'aquest paradigma d'estrès crònic, un tractament de tres setmanes amb corticosterona va produir una disminució de la densitat de cèl·lules en CA3, però no en CA1 en rates adultes (Sapolsky et al. 1985). La literatura anterior sobre l'expressió d'aquest marcador de neurotransmissió inhibidora en CA1 ha descrit augments després d'estrès social crònic (Makinson et al. 2015), però no després d'estrès crònic intermitent variable (Bowers, Cullinan i Herman, 1998). Tot i això, aquests estudis van mesurar l'expressió de l'ARNm i no es van centrar en una capa particular. Estudis més actuals també mostren que rere un protocol d'estrès impredecible durant 36 dies, les rates mascle redueixen un 27% l'expressió de GAD67 en l'hipocamp (Banasr et al. 2017), resultats molt semblants als nostres. En resultats d'altres treballs publicats pel nostre laboratori on es fa ús del mateix protocol, es veu que la PFC reacciona de la mateixa manera que l'hipocamp (Gilabert-Juan et al. 2013). Per contra, a l'AMY medial (Me) els nivells de GAD67 estan reduïts rere el protocol d'estrès (Gilabert-Juan et al. 2011).

Els nostres resultats sobre l'anàlisi de l'expressió de PSA-NCAM són similars als que es van trobar anteriorment a la mPFC de ratolins GIN, on l'estrès crònic no va induir canvis (Gilabert-Juan et al. 2013). Estudis anteriors en rates van trobar un augment de l'expressió d'aquesta molècula relacionada amb la plasticitat a l'hipocamp després de l'estrès crònic de restricció (Sandi et al. 2001; Pham et al. 2003). Tot i això, el període de restricció diària utilitzat va ser considerablement més llarg en rates que en els nostres ratolins. Així com en altres models d'estrès com l'aïllament durant 6 setmanes, on les rates mascle estressades mostraren majors nivells de PSA-NCAM en l'hipocamp (Djordjevic et al. 2012). A més, l'expressió augmentada de PSA-NCAM en rates semblava estar associada principalment a canvis en les neurones granulars i les seues projeccions a l'estrat lucidum de CA3 (Pham et al. 2003).

El nostre estudi se suma a la creixent evidència que les xarxes inhibidores de l'hipocamp també es troben afectades per l'estrès crònic. S'ha descrit recentment en rates un impacte negatiu d'aquesta experiència aversiva sobre la densitat de interneurons PV+, calretinina positives i també sobre les que expressen neuropèptid Y i SOM+ (Czéh et al. 2015). Tot i això, encara que la majoria de les interneurons marcades amb EGFP de l'hipocamp dels ratolins GIN expressen SOM, no vam trobar disminucions en el nombre d'aquestes interneurons en el nostre model. Aquesta discrepància es pot explicar per l'exposició més llarga a l'estressor a l'estudi de Czéh i col·laboradors (Czéh et al. 2015) (nou setmanes vs tres setmanes en el nostre estudi), així com per les diferències que pot haver a les respostes davant de l'estrès crònic depenent de l'espècie.

Efectes de l'estrès per restricció durant 10 dies en rates mascles adults.

L'objectiu principal d'aquest estudi va ser avaluar els efectes de l'estrès crònic sobre les molècules relacionades amb la plasticitat interneuronal en diferents regions del SNC d'adult. Els nostres resultats revelen únicament efectes locals sobre l'expressió de PSA-NCAM a la regió CA1 de l'hipocamp. Per contra, es mostren alteracions més àmplies i profundes en el nombre de PNNs, que en alguns casos s'associen a interneurons PV+ i en altres apareixen de manera independent a aquestes interneurons. Curiosament, aquestes alteracions en les PNNs no només es troben a les regions comunament estudiades en els models d'estrès crònics, també en àrees menys explorades, com l'habènula o el TRN.

En primer lloc, es va avaluar l'expressió de PSA-NCAM, ja que aquesta molècula s'expressa en una subpoblació d'interneurons del telencèfal adult i regula la seua estructura i connectivitat (Gómez-Climont et al. 2011). Trobarem únicament un augment considerable de l'expressió de PSA-NCAM en l'estrat *lacunosum-moleculare* de CA1. És probable que aquests canvis afecten específicament a les

cèl·lules O-LM, que són interneurons que projecten específicament a aquesta capa, i la morfologia i la connectivitat de les quals està particularment regulada per la PSA-NCAM (Guirado, Perez-Rando, Sanchez-Matarredona, Castillo-Gómez, et al. 2014). Altres treballs mostren resultats similars, com un protocol d'aïllament crònic durant 6 setmanes de rates mascles de dos mesos, on es veu que els animals estressats tenen una major expressió de PSA-NCAM en hipocamp i en la PFC que els controls (Djordjevic et al. 2010, 2012). A més, s'han observat canvis en l'estructura d'aquestes interneurons i l'expressió de GAD67 en la CA1 de ratolins sotmesos a estrès crònic, com hem vist en un dels treballs presentats a aquesta tesi (Gilbert-Juan et al. 2017). La presència d'alts nivells d'expressió de PSA-NCAM en aquestes cèl·lules pot augmentar el seu aïllament, provocant una disminució de la complexitat dendrítica i reduint la connectivitat (Gómez-Climent et al. 2011). Tanmateix, la PSA-NCAM present a la CA1 no s'associa exclusivament a elements inhibidors (Gómez-Climent et al. 2011) i, en conseqüència, els canvis d'expressió d'aquesta molècula poden estar afectant a la connectivitat de les neurones principals.

L'altre objectiu del nostre estudi es va centrar en les interneurons que expressen PV i la seva relació amb les PNNs. Les PNNs envolten preferentment les cèl·lules PV+ de les regions corticals, i açò proporciona una protecció a aquestes interneurons front a l'ambient canviant i l'estrès oxidatiu durant els períodes crítics de plasticitat del cervell (Cabungcal et al. 2013; Shi et al. 2019). La disrupció o la reducció d'aquestes PNNs pot reduir els contactes glutamatèrgics sobre les interneurons PV+ i per tant esperariem una disminució de la seua activitat. És per això que és important l'estudi paral·lel de tots dos components per entendre l'afectació del sistema.

És conegut, que animals adults amb PNNs que presenten alguns components alterats presenten canvis en la plasticitat sinàptica i la funció neuronal (Bukalo et al. 2007; Miyata et al. 2012; Khoo et al. 2019). Els nostres resultats, mostren un augment del nombre de neurones que expressen PV en la mPFC o la BLA. Per contra, en treballs anteriors es descriu una disminució de somes PV+ en regions prefrontocorticals després d'estrès crònic [5 setmanes d'estrès crònic imprevisible (Banar et al. 2017)], tot i que alguns només es van trobar en animals anhedònics (9 setmanes d'estrès crònic lleu) (Czéh et al. 2018). Un altre treball, que utilitzava dues setmanes d'estrès crònic imprevisible o vuit setmanes d'estrès crònic lleu, no va trobar canvis en la densitat de cèl·lules PV+ en la mPFC de rates Wistar (Zadrozna et al. 2011). Tot i això, d'acord amb els nostres resultats, els estudis recents amb períodes d'estrès crònic més curts (2 setmanes) han trobat increments significatius en el nombre de cèl·lules PV+ i en el mRNA PV de la mPFC de femelles de ratolí adultes i en la densitat de punts excitadors a la regió perisomàtica de cèl·lules PV+ en ambdós sexes (Shepard et al. 2016; Shepard and Coutellier 2018). A més, Filipovic i col·laboradors (Filipović et al. 2018) i Todorovic i col·laboradors

(Todorović et al. 2019) van demostrar que l'aïllament social crònic condueix a una disminució del nombre de cèl·lules PV+ en la mPFC i a l'hipocamp de rates Wistar mascles adultes.

Adicionalment, l'estrès crònic variable durant dues setmanes en la mateixa soca de rata utilitzada al nostre experiment augmentà la inhibició de les cèl·lules piramidals de la mPFC i la densitat de puncta inhibidors al voltant del soma d'aquestes neurones principals (McKlveen et al. 2016). En contraposició amb aquests resultats, no s'han trobat disminucions en la densitat de puncta que coexpressen amb PV i sinaptofisina (SYN) en els nostres animals estressats. No obstant això, la densitat de puncta PV-SYN+ va disminuir notablement, cosa que pot indicar una reducció en un altre tipus de sinapsi perisomàtica, probablement de les que provenen d'interneurones de cistella que expressen CCK. Això està d'acord amb les reduccions recentment trobades en el nombre de neurones CCK+ en la mPFC de rates sotmeses a nou setmanes d'estrès crònic (Czéh et al. 2018).

La variabilitat dels resultats obtinguts en el nostre estudi i els estudis anteriors sobre els efectes de l'estrès crònic a les cèl·lules PV+ poden ser producte de les diferències en la soca de rata que s'utilitza, la manca de discriminació entre les regions prefrontocorticals diferents i, particularment, la variabilitat en els protocols emprats, així com les seues duracions. És possible que en animals sotmesos a estrès durant períodes més curts es pogueren activar les interneurones PV+, provocant un augment de la inhibició de les neurones piramidals. D'altra banda, en protocols més llargs, en els quals els comportaments depressius són persistents, aquestes interneurones poden mostrar una disminució de l'activitat i de l'expressió de PV. És important mencionar que existeix una disminució de la neurotransmissió excitadora sobre les interneurones PV+ de la mPFC en animals amb indefensió adquirida i que la supressió de l'activitat d'aquestes cèl·lules inhibidores promou l'aparició d'aquest comportament depressiu (Perova et al. 2015). En conseqüència, l'activació de les interneurones PV+ en la mPFC en fases anteriors a l'estrès crònic pot ser interpretada com una resposta a fi de promoure l'establiment de conductes resistents, com als treballs de Shepard i Coutellier (Shepard and Coutellier 2018), Shepard i col·laboradors (Shepard et al. 2016) i com les nostres pròpies dades suggereixen. En aquest sentit, treballs anteriors apunten que el final dels deu dies d'immobilització coincideix amb el període en què es comencen a observar els efectes d'estrès conductuals (McLaughlin et al. 2007; Reznikov et al. 2008; Grillo et al. 2015). Però es sap que situacions estressants més prolongades en el temps (nou setmanes) produeixen un efecte diferent; el nombre de interneurones PV+ es troba reduït un 20-30% en hipocamp (Czéh et al. 2015). Açò podria ser degut a mort cel·lular per neurotoxicitat, cosa que no veiem al nostre experiment degut a que el temps d'exposició a l'estrès és molt menor. També podria ser que els nivells d'expressió fluctuen en resposta a l'estrès, augmentant aquests

durant els primers dies d'estrès, com mostrarien els nostres resultats i disminuint quan aquest es prolonga en el temps.

De manera semblant al que hem observat en la mPFC, també vam trobar un augment en el nombre de cèl·lules PV+ en la BLA de les nostres rates estressades. Reznikov i col·laboradors (Reznikov et al. 2008), utilitzant el mateix paradigma d'estrès emprat en el present estudi no trobaren canvis en la densitat de cèl·lules PV+ en la BLA. Aquesta discrepància es pot originar a causa de la diferència en la metodologia que es va aplicar per a la quantificació: nosaltres estimàrem el nombre total d'interneurons PV+ a tota la BLA mitjançant una versió modificada del mètode fraccionador (West 1993; Nacher, Lanuza, et al. 2002), mentre que les densitats cel·lulars es van calcular a partir de l'extensió mitjana-caudal de la subdivisió anterior d'aquesta regió amígdaloide (Reznikov et al. 2008). Cal mencionar, però, que Reznikov i col·laboradors (Reznikov et al. 2008) observaren un augment important del percentatge de cèl·lules PV+ que mostraven immunoreactivitat amb c-Fos en els seus nuclis, cosa que també suggereix una activació d'aquestes interneurons amb el protocol d'estrès.

No creiem que l'augment d'interneurons PV+ es dega a la incorporació de noves cèl·lules al circuit. Pensem que l'increment de la quantitat reflecteix un augment de l'expressió d'aquesta proteïna d'unió al calci i que algunes interneurons que van expressar nivells molt baixos de PV (i per tant no es detectaren en animals control), augmenten la seva expressió de PV i es poden detectar en animals estressats. S'ha observat un canvi similar cap a un augment de l'expressió de PV a l'hipocamp després d'un protocol de por condicionada (Donato et al. 2013). Així, resultats anteriors del nostre laboratori han descrit aquest fenomen a la IL després de l'aïllament social juvenil (Castillo-Gómez et al. 2017) o després del tractament amb un agonista del receptor de dopamina D2 (Castillo-Gómez et al. 2011). La reducció en el número de neurones que expressen PV no es deu a una disminució en el volum al neuròpil, perquè per a aplicar la versió modificada del mètode fraccionador hem calculat els volums de les àrees i no hem trobat diferències entre els grups estudiats.

Hi ha un altre treball que estudia l'efecte de l'estrès crònic a les PNNs durant l'edat adulta, utilitzant un estrès persistent induït per la derrota social (SDPS) en rates Wistar, un protocol de llarga durada, que indueix comportaments depressius persistents (Riga, Schmitz, et al. 2017). En aquest estudi, els autors van trobar un augment significatiu de la densitat de PNNs a CA1 de l'hipocamp i, concretament, aquelles que envolten les interneurons PV+. Aquests resultats contrasten fortament amb els que presentem nosaltres en aquesta regió hipocampal, on hi observem una disminució significativa de la densitat de PNNs. Tanmateix, no trobem diferències al nombre de neurones PV+ envoltades per PNNs. De fet, nosaltres no hi trobem correlacions lineals significatives entre les cèl·lules PV+ i les PNNs a CA1, ni en els controls ni en els animals estressats, cosa que denota que la reducció en PNNs que observem

es pot deure a una disminució de les PNNs associades a altres tipus cel·lulars, com neurones excitadores. Malgrat que Riga i col·laboradors (Riga, Kramvis, et al. 2017) trobaren que a les rates Wistar més del 90% de les PNNs de CA1 estaven associades a neurones PV+, i altres autors van trobar al voltant del 80% en rates Long-Evans (Lensjø et al. 2017), en el nostre estudi només trobarem al voltant del 60%. Curiosament, encara que trobem correlacions positives entre els nombres d'interneurones PV+ i PNNs en la mPFC i en la BLA en animals controls, aquestes correlacions no existien en individus estressats, cosa que suggereix que els canvis que observem després de l'estrès en la subpoblació d'interneurones PV+, poden ser independent de la presència de PNNs rodejant-les.

En el cas del TRN, els efectes de l'estrès haurien de ocórrer principalment sobre cèl·lules PV+, ja que aquestes neurones són una gran proporció dels constituents cel·lulars d'aquest nucli talàmic i la majoria, si no totes, estan envoltades per PNNs. Els nostres resultats d'aquest nucli són especialment interessants per la seua robustesa i perquè mostren clarament per primera vegada la implicació d'aquesta regió talàmica en la resposta a l'estrès crònic durant l'edat adulta. Un estudi anterior ja va posar de manifest la putativa implicació d'aquest nucli en la resposta a l'estrès agut, a causa d'un important augment de l'expressió de c-Fos (Ons et al. 2004). S'ha de fer més recerca en aquesta regió per tal d'entendre com l'estructura, la neurotransmissió i la connectivitat de les seues neurones estan afectades per l'estrès.

Només hi ha un estudi que descriu les PNNs a l'habènula, centrat en el seu desenvolupament postnatal en ratolins (Horii-Hayashi et al. 2015); així, les presents dades són les primeres que descriuen la seua presència en animals adults i la seua modulació per l'estrès crònic. Encara no coneixem el fenotip de les neurones habenulars envoltades per aquestes PNNs, però el més probable és que siguin neurones excitadores, ja que les interneurones són molt rares en aquesta regió talàmica (Smith et al. 1987; Li et al. 2011; Meye et al. 2013). Els resultats actuals donen suport a treballs anteriors que assenyalen un paper destacat de l'habènula en la resposta a l'estrès crònic (Wirtshafter et al. 1994; Aizawa et al. 2013; Jacinto et al. 2017).

El significat dels augments dels nombres de PNNs que hem trobat al present estudi estan encara lluny de ser comprensibles. S'ha proposat que les PNNs puguen actuar protegint les neurones de dispar ràpid de l'estrès oxidatiu (Cabungcal et al. 2013). L'estrès crònic indueix alts nivells d'espècies reactives d'oxigen (M. Madrigal et al. 2008), els augments en PNNs en aquesta fase inicial de l'estrès poden representar un intent de les neurones per a contrarestar els efectes d'aquest estrès oxidatiu. Així doncs, es necessiten estudis amb una durada d'estrès més llarga per a saber si en les etapes últimes de l'estrès crònic el nombre de cèl·lules PV+ i de PNNs disminueix o torna als nivells control. Els ratolins transgènics amb deterioració de la regulació redox mostren una disminució al nombre de neurones

PV+ i de PNNs en la PFC i el TRN (Cabungcal et al. 2013; Steullet et al. 2018). Curiosament, els pacients que pateixen esquizofrenia, una malaltia en què es coneix que l'estrès és un factor de risc, també mostren reduccions de la densitat de cèl·lules PV+ i de PNNs en aquestes dues regions (Mauney et al. 2013; Steullet et al. 2018; Alcaide et al. 2019). Les PNNs també poden actuar influint en la plasticitat sinàptica, constituint una barrera física per estabilitzar els contactes sinàptics o evitar la formació de nous contactes mitjançant l'expressió de molècules inhibidores (Nowicka et al. 2009; Sorg et al. 2016).

En conclusió, les nostres dades demostren que l'estrès crònic breu pot induir canvis en molècules relacionades en la plasticitat interneuronal, no només en les regions "clàssiques" implicades en la resposta a l'estrès, sinó també en l'habènula o el TRN, una regió en la qual hem descrit per primera vegada alteracions induïdes per aquesta experiència aversiva. Això dona suport a la hipòtesi de que l'estrès produeix alteracions de les xarxes inhibidores i de les molècules implicades en la seua plasticitat, particularment les PNNs, poden mitjançar l'impacte de l'estrès al SNC i poden participar en el desenvolupament de certs trastorns psiquiàtrics.

Efectes de l'estrès durant el període pubertal tant a mascles com a femelles quan són adults.

El desenvolupament de la PFC comença a l'úter, però continua fins a la vida postnatal, durant la infància, l'adolescència i la primera edat adulta (Fuster 2002). Durant aquest període postnatal, tant les neurones excitadores (Petanjek et al. 2011) com les neurones inhibidores (Caballero and Tseng 2016; McKlveen et al. 2016) experimenten les etapes finals de la seua maduració, remodelant la seua estructura i connectivitat. Aquest desenvolupament prolongat de la PFC fa que aquesta regió cortical siga especialment vulnerable a experiències aversives, com l'estrès crònic. De fet, se sap que l'estrès patit durant l'adolescència té un impacte important en l'estructura de les neurones piramidals prefrontocorticals i en el desenvolupament de funcions cognitives dependents de PFC (Tzanoulinou, García-Mompó, et al. 2014; Tzanoulinou et al. 2016). Aquestes alteracions poden constituir factors de predisposició per al desenvolupament de trastorns relacionats amb l'estrès més tard en l'edat adulta, com l'ansietat o la depressió. En aquest estudi, hem utilitzat un model murí d'estrès peripubertal per explorar alteracions a llarg termini de l'estructura i la connectivitat de les interneurons que expressen PV i de les neurones piramidals en la mPFC de mascles i femelles. Hem provat la validesa del model d'estrès en el nostre experiment mesurant la locomoció i el comportament relacionat amb l'ansietat amb el test de l'OF i el de l'*splash*.

El protocol de PPS que hem utilitzat es basa en un protocol prèviament desenvolupat i validat repetidament en rates, que també s'ha relacionat amb alteracions a llarg termini del comportament social i afectiu durant l'edat adulta (Márquez et al. 2013). Els estressors s'apliquen des de P28 fins a P42, un període de transició que cobreix final de la infància i adolescència en rosegadors, que s'associa a diferents processos de comportament i desenvolupament en la PFC (Brenhouse and Andersen 2011). Aquest model és particularment interessant perquè es basa en estressors inductors de la por amb un potent efecte psicogènic. Diversos estudis han explorat l'impacte de l'estrès durant l'adolescència, però la majoria es basen en estressors físics. Creiem que el nostre model és més naturalista i pot imitar millor algunes de les experiències aversives i inductores de la por que es produeixen durant la infància i l'adolescència humana.

També és important remarcar en aquest punt que l'impacte de l'estrès crònic és diferent entre els rosegadors mascles i les femelles (Fremeau et al. 2002). En la mateixa línia, s'ha demostrat àmpliament que les dones són més vulnerables que els homes a trastorns relacionats amb l'estrès, com ara depressió i l'ansietat (Eid et al. 2019). Curiosament i d'acord amb aquestes dades, hem observat que la majoria dels efectes a llarg termini del nostre PPS només es van observar en femelles o en considerar els dos sexes junts, però poques vegades només en mascles. És interessant notar que açò es produeix a nivell de comportament, però també a nivell cel·lular i molecular.

A l'hora de considerar el comportament, els nostres resultats, que mostren un augment de la locomoció en ratolins adults quan considerem els dos sexes junts i només en femelles (quan les dades estaven separades per sexe) concorden amb els resultats de publicacions anteriors de diferents tipus d'estressors aplicats crònicament durant l'adolescència en rates, com a aïllament postdeslletament en mascles (Ishikawa et al. 2014; Castillo-Gómez et al. 2017) i estrès per restricció en ambdós sexes (Eiland et al. 2012). Un estudi recent en ratolins mascles que utilitzava també estrès crònic durant l'adolescència, però amb estressors físics, també va trobar augments de l'activitat locomotora, tot i que el comportament dels animals es va analitzar immediatament després de l'estrès i no a l'edat adulta (Ueno et al. 2018). Tanmateix, cal esmentar que alguns altres estudis realitzats en ratolins mascles, que utilitzaven l'aïllament i la natació forçada com a estressors, observaren disminucions en la distància recorreguda (Page and Coutellier 2018).

El paradigma PPS utilitzat en el nostre estudi indueix a l'agressivitat i augmenta l'ansietat en rates adultes (Márquez et al. 2013; Veenit et al. 2013; Walker et al. 2018). La majoria d'aquests estudis es van realitzar en rates mascles, però es van trobar resultats similars en considerar junts mascles i femelles (Eiland et al. 2012; Ishikawa et al. 2014). En analitzar les dades de l'OF, observarem augments als paràmetres relacionats amb l'ansietat en les femelles i també en considerar tots dos sexes junts.

S'han trobat resultats similars en els comportaments relacionats amb l'ansietat en un estudi recent, en què els ratolins estaven exposats crònicament a estressors físics (estrès lleu) durant el mateix període peripubertal del nostre estudi (Page and Coutellier 2018).

L'activitat d'endrec és un comportament complex que és sensible a l'estrès i, per tant, pot servir com a mesura útil d'ansietat o comportament depressiu en animals de laboratori. Els nostres resultats al test de l'*splash* indiquen ansietat augmentada. En línia amb els altres resultats de comportament, aquests canvis es van observar principalment en femelles o quan els dos sexes van ser analitzats conjuntament.

Totes les alteracions del comportament a llarg termini induïdes pel PPS haurien de ser suportades per canvis en la neurotransmissió, la connectivitat i la fisiologia de les xarxes neuronals. En el present estudi, hem trobat un efecte diferencial de l'estrès sobre la densitat d'espines dendrítiques de les neurones piramidals a la IL segons el sexe analitzat: augmentava en les femelles, mentre que disminuïa en els mascles. Aquests canvis es van restringir al segment més distal de dendrita analitzat, que és una característica comuna en aquest tipus d'anàlisis. Els nostres resultats en mascles són coherents amb els de publicacions anteriors que descriuen una disminució de la densitat d'espines dendrítiques en la mPFC després de l'estrès crònic, tant durant les primeres etapes de la vida com durant l'edat adulta. Tot i que la majoria d'estudis realitzats en ratolins adults s'han centrat en l'escorça prelímbica (PrL), se sap que el tractament crònic amb corticosterona redueix la densitat d'espines dendrítiques en neurones piramidals de la IL adulta (Gourley et al. 2013). Els estudis sobre els efectes de l'estrès crònic durant les etapes primerenques de la vida són escassos, però la restricció crònica (Eiland et al. 2012) o l'estrès social (Urban et al. 2019) durant l'adolescència i la separació maternal (Chocyk et al. 2013) en rates mascles indueixen canvis estructurals similars als observats per nosaltres. Tot i això, cal assenyalar que en aquests estudis els animals es van analitzar immediatament després dels estressors i no a l'edat adulta. També cal esmentar que un altre estudi que utilitza estrès per restricció crònica durant l'adolescència en ratolins mascles i femelles juntes no va trobar alteracions en la densitat d'espines dendrítiques en la mPFC (Chohan et al. 2014). Les rates mascles sotmeses a estrès de xoc al peu durant l'adolescència i analitzades durant l'edat adulta, mostren disminucions en densitat d'espines dendrítiques en neurones piramidals de la PFC, específicament en la IL (Lyttle et al. 2015), que és coherent amb els nostres resultats. En aquesta línia, un estudi previ del nostre laboratori va demostrar que l'aïllament social després del deslletament també va disminuir la densitat d'espines en segments medials / distals de neurones piramidals en la mPFC en ratolins mascles (Gilabert-Juan et al. 2017). No obstant això, estudis recents que van utilitzar l'estrès d'instabilitat social durant l'adolescència en ratolins mascles, van donar resultats contradictoris: mentre que un estudi va trobar

disminucions significatives de la densitat d'espines a la mPFC i específicament a la IL (Wang et al. 2017), altres no van trobar canvis en aquest paràmetre (Breach et al. 2019). Malauradament, els estudis sobre els efectes de l'estrès en les femelles encara són molt escassos. No obstant això, en general mostren que els rosegadors adults sotmesos a estrès no presenten canvis dendrítics o fins i tot poden presentar hipertròfia dendrítica a la mPFC (Wohleb et al. 2018; Breach et al. 2019; Iqbal and Ma 2020).

Aquests canvis en l'estructura de les neurones piramidals poden estar relacionats amb alteracions de l'equilibri excitació / inhibició, que són crucials per a la funció de la PFC i també s'alteren en models d'estrès crònic i trastorns psiquiàtrics relacionats amb l'estrès (Page and Coutellier 2019). Hem analitzat la densitat de puncta que expressen proteïnes sinàptiques inhibidores o excitadores per explorar aquest equilibri. No hem trobat canvis en la densitat de puncta que expressen el marcador excitador VGLUT1, cosa que és coherent amb els nostres resultats anteriors on analitzem els efectes de l'aïllament social postdeslletament en ratolins adults (Gilabert-Juan et al. 2017). Per contra, hem observat un augment significatiu de la densitat de puncta positius per a VGAT, que condueix a una disminució de la proporció entre la densitat dels puncta excitadors i la dels inhibidors. Aquests resultats es poden observar quan es consideren els dos sexes junts i en femelles, el que suggereix una major susceptibilitat de les femelles al PPS. Aquest augment de la densitat de puncta inhibidors suggereix un augment de la neurotransmissió inhibidora i, en conseqüència, una hipoactivitat de la mPFC. Això està d'acord amb els resultats anteriors en rates joves sotmeses a diferents paradigmes d'estrès crònic: l'estrès crònic variable augmentà els terminals postsinàptics inhibidors, cosa que suggereix una elevada alliberació de GABA, acompanyada d'un augment dels terminals inhibidors a les cèl·lules glutamatergiques (McKlveen et al. 2016). No obstant això, treballs anteriors del nostre laboratori, on utilitzarem un paradigma de PPS molt similar en rates mascles, mostraren una expressió reduïda de proteïna GAD6 a la PrL i la IL durant l'edat adulta (Tzanoulinou et al. 2016). Altres estudis en ratolins, que utilitzaren com a estressors una combinació d'aïllament social i la natació forçada durant l'adolescència, trobaren una tendència cap a una reducció de l'ARNm de VGAT, però no de GAD67 o de gefirina en individus adults (Page et al. 2018). Es van trobar resultats negatius similars al nostre laboratori quan analitzarem l'impacte de l'aïllament social després del deslletament (Gilabert-Juan et al. 2017). No hem analitzat l'expressió de GAD67 o GAD65 en el present experiment, però sí seria possible que es donara una reducció de l'expressió d'aquests enzims durant l'edat adulta com a efecte compensatori front a l'augment de les sinapsis inhibidores.

Page i Coutellier (Page and Coutellier 2019) han proposat una hipòtesi interessant: la hipoactivitat de la PFC induïda per l'estrès pot ser deguda a l'augment de l'activació de les cèl·lules que expressen PV. Hem explorat aquesta possibilitat en el nostre model de PPS analitzant l'estructura i la

connectivitat de les interneurons PV+ a la mPFC, així com la presència de PNNs que envolten aquestes cèl·lules inhibidores. Els passos finals de la maduració de la PFC impliquen augments en l'entrada glutamatergica a les cèl·lules PV+ i en l'expressió de PV, que, curiosament, es produeixen abans a les femelles, almenys a l'hipocamp (Wu et al. 2014). Aquestes últimes etapes del desenvolupament de les cèl·lules PV+ també es regeixen per l'aparició de PNNs que envolten aquestes interneurons (Caballero and Tseng 2016; Ueno, Suemitsu, Okamoto, et al. 2017).

L'estrès crònic durant l'edat adulta té un impacte important en les interneurons prefrontocorticals que expressen PV. Estudis amb diversos paradigmes d'estrès en rates i ratolins han reportat augments en el nombre o densitat de cèl·lules immunoreactives per a la PV i l'expressió d'ARNm de PV (Shepard et al. 2016; Shepard and Coutellier 2018; Pesarico et al. 2019). Cal assenyalar, però, que alguns altres estudis no van trobar canvis (Zadrozna et al. 2011) ni van trobar disminucions en aquests paràmetres (Banar et al. 2017; Czéh et al. 2018; Todorović et al. 2019). No obstant això, aquests últims estudis van utilitzar protocols d'estrès més llargs o van seleccionar animals exclusivament anhedònics. Les dades d'animals estressats durant el període peripubertal també són heterogènies. Les nostres dades que indiquen una manca de diferències en la densitat d'interneurons que expressen PV en la mPFC de ratolins mascles concorden amb els estudis que utilitzen una combinació d'aïllament social i natació forçada (Page et al. 2018) o estrès de restricció crònica (Clarke et al. 2019). No obstant això, en un altre estudi, que va utilitzar una combinació d'estressors físics durant l'adolescència trobaren una reducció de la densitat de cèl·lules PV+ a la PrL, tot i que només en ratolins mascles (Page and Coutellier 2018). No es van detectar diferències a la IL ni a l'anàlisi de les femelles (encara que la fase del cicle estral no es va controlar al sacrifici). Ueno i col·laboradors (Ueno et al. 2018) tampoc van trobar diferències en la densitat d'interneurons PV+ a la mPFC després d'aplicar estressors físics a ratolins mascles durant l'etapa de l'adolescència, tot i que aquests resultats s'observaren en animals juvenils. Els nostres resultats suggereixen que els efectes del PPS sobre les interneurons PV+ són més forts en les femelles, que no només presenten una densitat reduïda d'aquestes cèl·lules, sinó que també presenten notablement augmentada l'arborització dendrítica. Aquesta densitat reduïda pot ser deguda a una disminució de l'expressió de la proteïna PV. D'altra banda, l'augment de l'arborització dendrítica pot reflectir un efecte compensatori a la disminució de l'expressió de PV i / o la conseqüència dels canvis en el microcircuit que es comenten a continuació.

S'han trobat resultats contradictoris en diferents estudis sobre el percentatge de cèl·lules PV+ recobertes per PNNs en la PFC de rosegadors adults sotmesos a PPS. Tot i que un estudi va trobar un augment d'aquest percentatge quan les rates van estar exposades a l'aïllament social i a la natació forçada durant l'adolescència (Page et al. 2018), un altre estudi del mateix grup no va trobar

diferències en aquest paràmetre en analitzar ratolins sotmesos a estressors físics peripubertals (Page and Coutellier 2018), la qual cosa és coherent amb els nostres resultats actuals. S'obteniren resultats negatius similars en altres experiments amb estressors físics peripubertals (Ueno et al. 2018). Per contra, l'aïllament social després del deslletament va augmentar el nombre de PNNs i el de les interneurons PV+ cobertes per PNNs a la mPFC (Castillo-Gómez et al. 2017).

Hem trobat que la PPS va augmentar l'expressió de PSA-NCAM, significativament quan els dos sexes es van agrupar. S'han trobat resultats contradictoris sobre aquest paràmetre depenent del moment en que els individus són estressats. Així, en l'experiment d'aïllament social després del deslletament fet al nostre laboratori, observarem que tot i que no es trobaren canvis significatius en l'expressió de PSA-NCAM, es trobà una disminució marcada en l'expressió de l'enzim responsable de la polisial·lilació NCAM en interneurons (St8SialV) (Castillo-Gómez et al. 2017). En estudis d'estrès crònic en rosegadors adults, el resultat també varien; s'han trobat disminucions en l'expressió de PSA-NCAM (Djordjevic et al. 2010, 2012). Aquests resultats són interessants perquè estudis previs del nostre laboratori han demostrat que aquestes variacions a l'expressió de PSA-NCAM té un impacte important sobre l'estructura i la connectivitat de les cèl·lules de cistella PV+ prefrontocorticals (Gilabert-Juan et al. 2011).

Per estudiar les alteracions en la connectivitat inhibidora sobre les neurones piramidals en la PFC dels animals sotmesos a PPS, hem analitzat la densitat de puncta perisomàtics PV+ sobre el seu soma. Sorprenentment, i en contrast amb la majoria dels resultats del nostre estudi, només es va trobar un augment significatiu d'aquest paràmetre en els mascles. Aquests resultats suggereixen un augment de la inhibició de les neurones piramidals. Curiosament, i en línia amb aquests resultats, un estudi recent ha trobat un augment de la densitat de puncta excitadors a les cèl·lules PV+ després d'un estrès crònic imprevisible en ratolins adults (ambdós sexes) (Shepard and Coutellier 2018). De la mateixa manera, les rates adultes sotmeses a 2 setmanes d'estrès crònic imprevisible mostren una inhibició més elevada de les neurones piramidals de la mPFC i un augment de la densitat de puncta perisomàtics inhibidors, que prové principalment de cèl·lules de cistella PV+ (McKlveen et al. 2016). No obstant això, no es van observar canvis en aquests paràmetres en un altre estudi en què les rates adultes van ser sotmeses a estrès per restricció durant 10 dies (Pesarico et al. 2019). Una possible explicació d'aquests resultats contradictoris és que l'activitat de les neurones PV+ pot ser diferent en diferents fases d'estrès, ja que els protocols d'estrès més llargs semblen alterar l'input inhibidor de les interneurons PV+.

A l'escorça cerebral, els CB1R s'expressen majoritàriament als terminals presinàptics de les cèl·lules de cistelles CCK+ i, sobretot, en la PFC s'expressa principalment en les neurones inhibidores (Wędzony

and Chocyk 2009; Katona and Freund 2012). Per analitzar més a fons els efectes del PPS sobre la inhibició perisomàtica de les neurones piramidals, però també per analitzar aquest tipus d'inhibició sobre les neurones que expressen PV, hem estudiat la densitat de punts perisomàtics que expressen CB1R en aquestes dues poblacions neuronals. Observarem que el PPS indueix un augment important d'aquesta densitat en ambdues poblacions, però només en les femelles. També hi ha un augment de la densitat de punts que expressen CB1R a la regió perisomàtica de les neurones piramidals quan vam analitzar tots dos sexes junts. En models animals d'estrès, s'han descrit freqüentment alteracions similars en el sistema cannabinoide. Per exemple, l'estrès per restricció crònica en rates adultes augmenta la unió al receptor CB1R a la mPFC i es pot observar el mateix efecte en rates adolescents (Lee and Hill 2013). L'estrès crònic imprevisible durant l'edat adulta (Hill et al. 2008) i la privació maternal també condueixen a una major expressió de CB1R a la PFC (Marco et al. 2014). D'acord amb aquests resultats i els nostres, un estudi ha descrit que la PFC dorsolateral de pacients amb depressió té una densitat augmentada de CB1R (Choi et al. 2012).

En resum, en aquest treball presentem evidències d'alteracions a llarg termini dels circuits excitadors, i particularment inhibidors, de la PFC i un augment dels comportaments relacionats amb l'ansietat com a conseqüència de l'exposició al PPS, que és especialment visible en les femelles. Aquests resultats destaquen que aquesta etapa primerenca és un període de major vulnerabilitat a les experiències aversives, especialment per a les femelles. Els nostres resultats també remarquen la importància de realitzar estudis d'estrès en ambdós gèneres, que haurien de ser prioritaris atesa la major incidència de trastorns relacionats amb l'estrès en les dones.

V. CONCLUSIONS

- L'estrès crònic per restricció d'1h al dia al llarg de 21 dies no produeix efectes en la densitat d'espines dendrítiques de interneurons SOM+, ni en CA1 ni en CA3.
- L'estrès crònic per restricció d'1h al dia al llarg de 21 dies produeix una reducció de la complexitat de l'arbre dendrític de interneurons SOM+ en CA1, però no en CA3.
- L'estrès crònic per restricció d'1h al dia al llarg de 21 dies no afecta a la densitat d'interneurons SOM+ ni en CA1 ni en CA3.
- L'estrès crònic per restricció d'1h al dia al llarg de 21 dies produeix una disminució de l'expressió de GAD67 en l'estrat *lacunosum-moleculare* de CA1 i en els estrats *lucidum* i *radiatum* de CA3, però no afecta a l'expressió de SYN ni a la de PSA-NCAM en cap de les capes estudiades.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies indueix increments en l'expressió de PSA-NCAM a la regió CA1 de l'hipocamp dorsal, a l'estrat *lacunosum-moleculare*, i a l'hipocamp ventral als estrats *piramidal* i *radiat*, però no altera l'expressió d'aquesta molècula ni a la mPFC ni a la BLA.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies produeix un augment de la densitat de PNNs en la mPFC i un augment de cèl·lules PV+ tant en la mPFC com en la BLA, però no altera la densitat de cèl·lules PV+ envoltades de PNNs en cap d'aquestes regions.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies no afecta a la densitat de cèl·lules PV+ a la regió CA1 de l'hipocamp, tot i que sí que produeix una disminució de la densitat de PNNs en animals sotmesos a l'estrès. Tot i això, la relació de cèl·lules PV+ envoltades de PNNs no presenta diferències significatives en aquesta regió.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies produeix un augment de la intensitat de fluorescència de les PNNs i de les cèl·lules PV+ al TRN.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies produeix un increment del nombre de PNNs en la habènula.
- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies no altera la densitat de puncta SYN+ / PV+ que envolten els somes de les neurones excitadores de la mPFC, però sí que produeix una disminució de la densitat de puncta SYN+ / PV-.

- L'estrès crònic per restricció de rates mascle durant 6h al dia al llarg de 10 dies no altera la densitat de puncta SYN+ / PV+ ni SYN+ / PV- en la BLA.
- L'estrès peripubertal produeix un augment de la locomoció i de comportaments relacionats amb l'ansietat a llarg termini, tant en femelles com quan s'analitzen els dos sexes junts.
- L'estrès peripubertal no produeix canvis en la densitat de puncta VGLUT1+ de la IL en cap dels grups estudiats. La densitat de puncta VGAT+ es veu augmentada en aquesta regió en animals estressats quan s'analitzen els dos sexes junts.
- L'estrès peripubertal produeix un menor ratio E / I en la IL de les femelles i quan s'analitzen els dos sexes junts.
- L'estrès peripubertal redueix la densitat de cèl·lules PV+ en la IL de les femelles adultes.
- L'estrès peripubertal produeix un augment en la complexitat de l'arborització dendrítica de les cèl·lules PV+ de l'escorça IL de les femelles adultes.
- L'estrès peripubertal produeix un augment de la densitat de puncta CB1R+ sobre els somes de les cèl·lules piramidals de la IL tant de mascles, com de femelles, com quan s'analitzen els dos sexes junts. Per contra, la densitat de puncta perisomàtics PV+ sobre les cèl·lules piramidals, sols es veu augmentada al grup dels mascles.
- L'estrès peripubertal produeix un augment de la densitat de punta CBR1+ sobre els somes de les cèl·lules PV+ de la IL únicament en el grup de les femelles.
- L'estrès peripubertal produeix una reducció de la densitat d'espines a les regions distals de les dendrites de les cèl·lules piramidals de la IL dels mascles i un augment d'aquestes en les femelles.
- L'estrès peripubertal no produeix alteracions en la densitat de PNNs, ni en la densitat de cèl·lules PV+ rodejades per aquestes en la IL.
- L'estrès peripubertal produeix un augment de la densitat de somes que expressen PSA-NCAM a la IL quan s'analitzen els dos sexes junts.

ANNEX

ARTICLE 1

Journal: Brain and Behavior

Authors: Clara Bueno-Fernandez*, Javier Gilabert-Juan*, Esther Castillo-Gomez, Juan Nacher

Publication date: June 9th, 2016

Reduced interneuronal dendritic arborization in CA1 but not in CA3 region of mice subjected to chronic mild stress

Javier Gilabert-Juan^{1,2,3,4,*} | Clara Bueno-Fernandez^{1,*} | Esther Castillo-Gomez¹ | Juan Nacher^{1,3,4}

¹Neurobiology Unit, Program in Neurosciences and Interdisciplinary Research Structure for Biotechnology and Biomedicine (BIOTECMED), Universitat de València, Burjassot, Spain

²Genetics Department, Universitat de València, Burjassot, Spain

³CIBERSAM: Spanish National Network for Research in Mental Health, Burjassot, Spain

⁴Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia, INCLIVA, Burjassot, Spain

Correspondence

Javier Gilabert-Juan, Department of Genetics, CIBERSAM, INCLIVA, Burjassot, Spain

Email: javier.gilabert@uv.es

and

Juan Nacher, Neurobiology Unit, Cell Biology Department, Universitat de València, Burjassot, Spain.

Email: nacher@uv.es

Abstract

Introduction: Chronic stress induces dendritic atrophy and decreases spine density in excitatory hippocampal neurons, although there is also ample evidence indicating that the GABAergic system is altered in the hippocampus after this aversive experience. Chronic stress causes dendritic remodeling both in excitatory neurons and interneurons in the medial prefrontal cortex and the amygdala.

Methods: In order to know whether it also has an impact on the structure and neurotransmission of hippocampal interneurons, we have analyzed the dendritic arborization, spine density, and the expression of markers of inhibitory synapses and plasticity in the hippocampus of mice submitted to 21 days of mild restraint stress. The analyses were performed in GIN mice, a strain that displays EGFP-labeled interneurons.

Results: We observed a significant decrease in the dendritic arborization of interneurons in the CA1 region, which did not occur in those in CA3. We found neither changes in dendritic spine density in these regions nor alterations in the number of EGFP-positive interneurons. Nevertheless, the expression of glutamic acid decarboxylase 67 was reduced in different layers of CA1 and CA3 regions of the hippocampus. No significant changes were found in the expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) or synaptophysin.

Conclusions: Chronic stress reduces the interneuronal dendritic arborization in CA1 region of the hippocampus but not in CA3.

KEYWORDS

Hippocampus, Inhibition, GAD67, PSA-NCAM, structural plasticity

1 | INTRODUCTION

Chronic stress alters neuronal structure in different brain regions. Several studies on animal models have demonstrated that this aversive experience causes dendritic atrophy and decreases spine density in principal neurons of the hippocampus and the medial prefrontal cortex (mPFC) (Cook & Wellman, 2004; Radley et al., 2006, 2004; Sousa, Lukoyanov, Madeira, Almeida, & Paula-Barbosa, 2000; Watanabe,

Gould, & McEwen, 1992). By contrast, in the orbitofrontal cortex or the basolateral amygdala, the effect of the chronic stress in principal neurons is the opposite, increasing spine density and dendritic arborization (Liston et al., 2006; Vyas, Mitra, Shankaranarayana Rao, & Chattarji, 2002).

In addition to these structural studies focused on principal neurons, during recent years our laboratory has analyzed the effects of chronic stress on the remodeling of interneurons. We have focused our studies on a subpopulation of spiny interneurons, which mainly express somatostatin and can be classified as Martinotti cells (Oliva,

*These authors have contributed equally to this study.

Jiang, Lam, Smith, & Swann, 2000). We have shown that chronic mild stress induces decreases in the dendritic arborization of interneurons in the lateral and basolateral amygdala of adult mice (Gilabert-Juan, Castillo-Gomez, Pérez-Rando, Moltó, & Nacher, 2011) and increases this parameter in interneurons of the mPFC (Gilabert-Juan, Castillo-Gomez, Guirado, Moltó, & Nacher, 2013). Interestingly, these changes occur in the opposite direction to those observed in principal neurons of these regions (Radley et al., 2004; Vyas et al., 2002). However, despite the dramatic effects of chronic stress on the structure of principal neurons in the hippocampus, there are no studies yet on its impact on the structure of hippocampal interneurons. The development of research on this subject is specially interesting because different lines of evidence indicate that chronic stress has also an important impact on other features of inhibitory hippocampal neurons. This aversive experience reduces the density of different populations of interneurons in distinct hippocampal subregions (Czeh et al., 2005; Czéh et al., 2015; Hu, Zhang, Czéh, Flügge, & Zhang, 2010).

The main objective of this study was to identify structural alterations (dendritic arborization and spine density) in GABAergic interneurons of the hippocampus of chronically stressed mice and to relate these changes to alterations in the expression of molecules implicated in inhibitory neurotransmission and neuronal plasticity, such as the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), the glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), or the marker of synapses, synaptophysin (SYP). In the adult hippocampus PSA-NCAM is strongly expressed in immature granule neurons, but our laboratory also found this molecule in a subpopulation of hippocampal interneurons (Nacher, Blasco-Ibáñez, & McEwen, 2002). These interneurons have reduced dendritic arborization and spine density, as well as decreased density of perisomatic innervation when compared with interneurons lacking PSA-NCAM expression (Gómez-Climent et al., 2011). Consequently, this molecule may play an insulating role, modulating the connectivity of these inhibitory cells.

2 | MATERIAL AND METHODS

Thirteen young-adult (3-month-old) male GIN mice (EGFP-expressing inhibitory neurons, Tg(GadGFP-45704Swn)), in which EGFP expression is under the GAD67 promoter, were used in this experiment (Jackson laboratories, Bar Harbor, ME, USA). The animals were housed in standard conditions, as described previously (Gilabert-Juan et al., 2013). All animal experimentation was conducted in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes and was approved by the Committee on Bioethics of the Universitat de València.

The chronic mild restraint stress procedure and histological techniques were performed as previously described (Gilabert-Juan et al., 2013, 2011). Briefly, mice ($n = 7$) were immobilized for 1 hr per day for 21 days (from 11 to 12 a.m.) in transparent 50-ml plastic conical tubes with many air holes to allow ventilation. Control animals ($n = 6$) were handled daily, but were left undisturbed in their cages after <1 min.

Mice were euthanized 24 hr after the last stress session in a random order, in a different room than the one in which restraints were carried out. Animals were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2). The right hemisphere was cryoprotected in a 30% sucrose solution in PB and cut in a sliding microtome at 50 μ m. These sections were destined for immunohistochemical analyses. The contralateral hemisphere was cut in 100 μ m sections with a vibratome and the resulting sections were used to analyze dendritic spine density on GFP expressing interneurons.

Immunohistochemistry for conventional light microscopy was performed in three subseries (50- μ m-thick sections) from each animal and anti-PSA-NCAM (AbCys, 1:700, Cortabouef, France), anti-GAD67 (Chemicon, 1:500, Millipore EMB, Bedford, MA), and anti-SYP (Sigma, 1:200, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) antibodies were used. In order to amplify the EGFP fluorescent signal in interneurons destined to morphological analysis (dendritic spine density and dendritic arborization), a simple fluorescent immunohistochemistry against EGFP was performed with anti-GFP antibody (Millipore, 1:1,000, Millipore EMB, Bedford, MA).

Sections stained by immunohistochemistry for conventional microscopy were examined with an Olympus CX41 microscope under bright-field illumination, homogeneously lighted and digitalized using a CCD camera. Photographs to the different areas and layers were taken at 20 \times magnification. Gray levels were measured using Image J software (NIH).

Dendritic arborization and spine density were studied in neurons located in the oriens layer of CA1 and CA3 regions. We randomly selected only six isolated GAD-GFP neurons per animal and region as previously described (Gilabert-Juan et al., 2013, 2011; Gómez-Climent et al., 2011). In order to be analyzed, GAD-GFP-expressing cells had to fulfill the following features: (1) the cell must not show any truncated dendrites, (2) the dendritic arbor of the cell must show at least a process with a length greater than 150 μ m, and (3) the soma must be located at least 30 μ m deep from the surface of the tissue. The stacks obtained were then processed using FIJI (ImageJ) software (NIH) in order to render 3D reconstructions. The neurons were traced using the "Simple neurite tracer" ImageJ plugin, which also allowed us to analyze their Sholl profile in 3D (Longair et al., 2011). Spines were defined as any kind of protrusion found in a dendrite and were quantified in three successive segments of 50 μ m distances up to a total length of 150 μ m. Both structural parameters were studied with a confocal microscope (Leica, SPE, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), which allowed us to follow in depth the dendrites unbiasedly.

The number of neuronal somata-expressing GAD67-EGFP covering the total hippocampus and distinguishing by layers (oriens, lucidum, and radiatum) and regions (CA1 and CA3) was estimated using a modified version of the fractionator method (West et al., 1991), as described before (Varea et al., 2007; Castillo-Gómez et al., 2011). Briefly, the fractionator sampling scheme refers to the methodology of examining one of every six brain sections. One from six systematic-random series of sections covering the whole rostral to caudal extension of hippocampus was viewed on an Olympus BX61 fluorescent

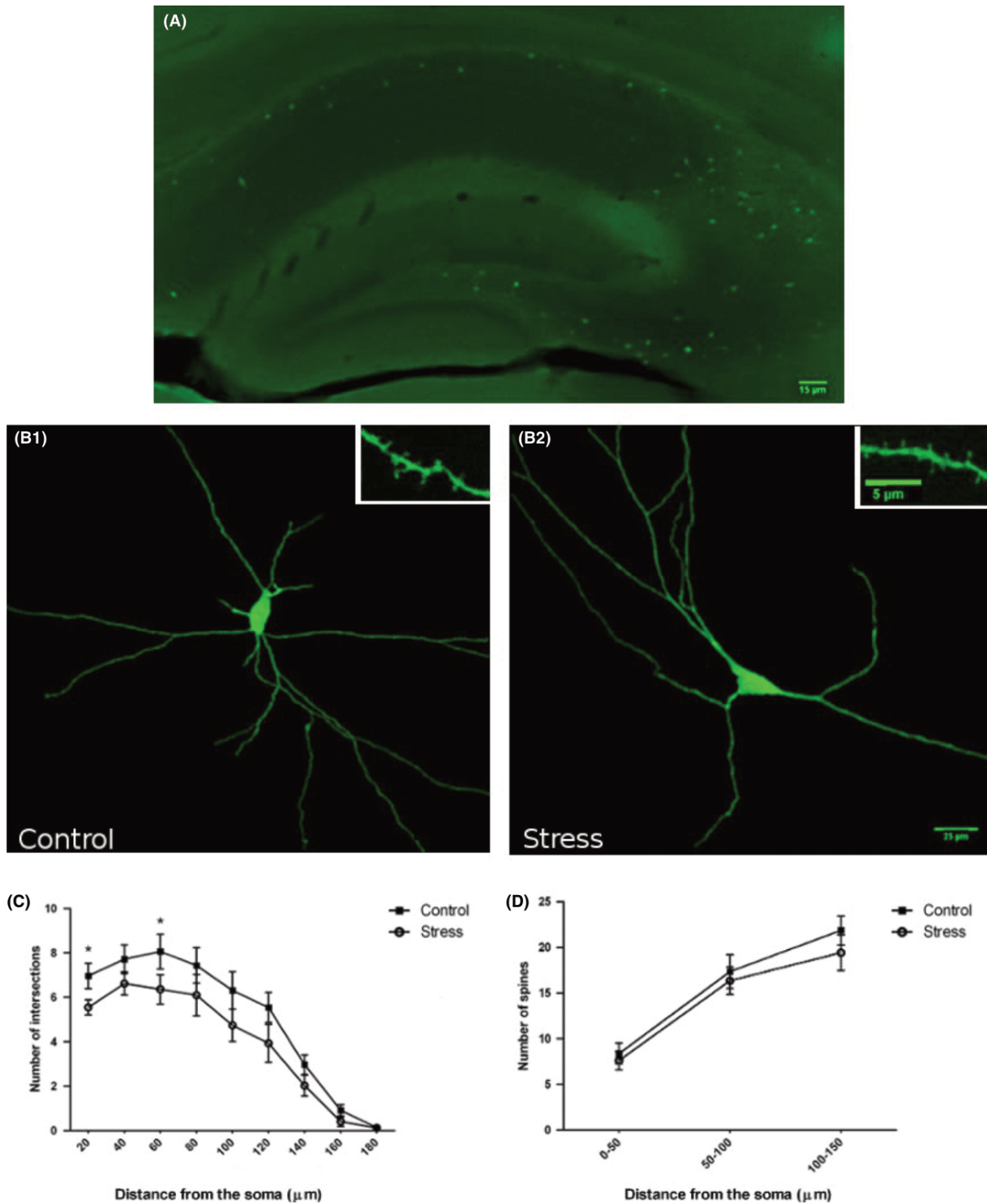


FIGURE 1 (A) Regional eGFP cells labeling pattern and distribution in the hippocampus. (B) 2D projections of GAD67-EGFP-expressing interneurons in the Oriens layer of the CA1 region of control (B1) and chronically stressed animals (B2). *Insets* in A1 and A2 show high-magnification views of dendritic segments bearing spines. (C) Sholl analysis of GAD67-EGFP-expressing interneurons, showing the number of intersections per 20 μm dendritic radial unit distance from the soma. Unpaired Student *t*-test showed a significant reduction in dendritic arborization in stressed mice ($p < .05$) in the 20- and 60- μm segments. (D) Spine density was determined in three 50- μm -length segments located 0–50, 50–100, and 100–150 μm from the soma, respectively. Unpaired Student *t*-test showed no statistically significant differences in any of the segments analyzed. *Scale bar* 15 μm for A1, 25 μm for B1 and B2; 5 μm for *insets*

microscope for GAD67-EGFP cells. Cell somata were identified and counted with a 40× objective. Cells appearing in the upper focal plane were omitted to prevent counting cell caps.

Means were determined for each experimental group and data were analyzed by Student's *t*-test statistical analysis using the SPSS statistics software (IBM, version 19, IBM-Deutschland GmbH, Munich, Germany).

3 | RESULTS

Sholl analysis showed decreased dendritic arborization in GAD67-EGFP expressing neurons in the CA1 region of stressed mice (Fig. 1), but not in those of CA3 (Fig. 2). These differences in CA1 were statistically significant in two of the 20- μ m-length segments of distance from the soma that were analyzed: 0–20 μ m segment ($p = .0034$),

40–60 μ m segment ($p = .0493$), and a trend toward a reduction was observed in the rest of segments. No differences in spine density were found in any segment of the interneurons of CA1 or CA3 regions (Figs. 1, 2).

No significant differences in the number of neuronal somata-expressing GAD67-EGFP were observed in any region or layer of interest, indicating that the number of this subpopulation of interneurons is not altered under stress conditions.

Quantification of neuropil immunoreactivity was performed for each immunostaining (GAD67, PSA-NCAM, and SYP) as previously described (Gilbert-Juan et al., 2011). Different layers of CA1 and CA3 regions were selected in order to measure immunoreactivity (Table 1). In the stressed mice, GAD67 expression was reduced significantly in the stratum lacunosum-moleculare of CA1 ($p = .048$) and in the strata lucidum ($p = .004$) and radiatum ($p = .005$) of CA3. No significant changes induced by stress were observed for SYP or PSA-NCAM

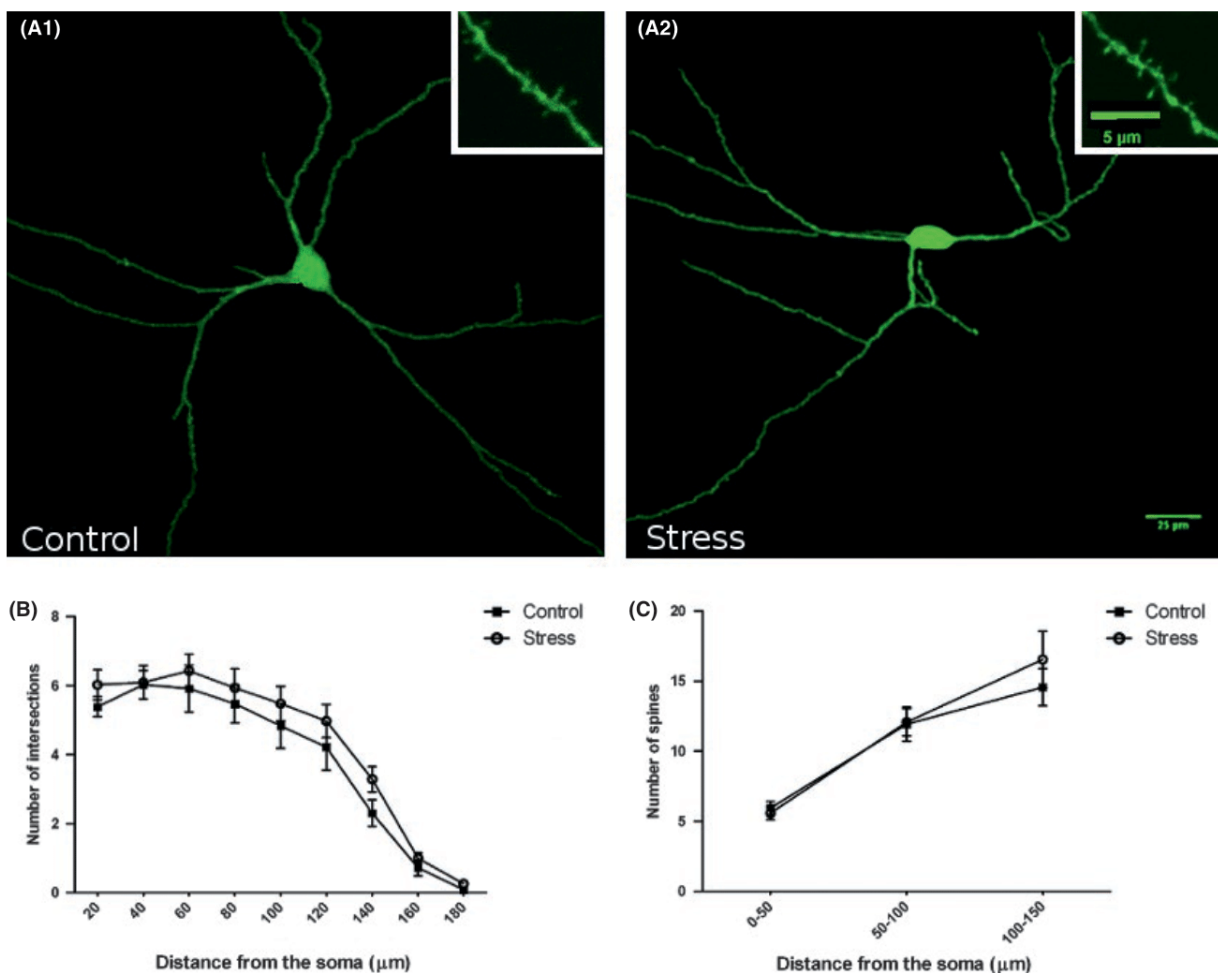


FIGURE 2 2D projections of GAD67-EGFP-expressing interneurons in the Oriens layer of the CA3 region of control (A1) and chronically stressed animals (A2). Insets in A1 and A2 show high-magnification views of dendritic spines of GAD67-EGFP-expressing interneurons. (B) Sholl analysis of GAD67-EGFP-expressing interneurons, showing the number of intersections per 20- μ m dendritic radial unit distance from the soma. Unpaired Student *t*-test showed no statistically significant differences. (C) Spine density was determined in three 50- μ m-length segments located 0–50, 50–100, and 100–150 μ m from the soma, respectively. Unpaired Student *t*-test showed no statistically significant differences in any of the segments analyzed. Scale bar 25 μ m for A1 and A2; 5 μ m for insets

TABLE 1 Staining intensity of GAD67, PSA, and SYP molecules in the different layers of the hippocampus measured in arbitrary units

Region	Layer	Control	Stress	p-value
GAD67				
CA1	Oriens	121.633 ± 8.720	116.366 ± 3.917	.220
	Pyramidal	147.966 ± 9.196	140.533 ± 3.221	.091
	Radiatum	116.933 ± 7.216	113.933 ± 7.216	.399
	Lacunosum-Molec.	128.466 ± 9.931	117.766 ± 6.033	.048*
CA3	Oriens	137.100 ± 14.419	135.133 ± 7.934	.778
	Pyramidal	151.366 ± 9.341	144.400 ± 3.530	.118
	Lucidum	171.266 ± 4.679	163.000 ± 2.561	.004*
	Radiatum	132.900 ± 5.274	123.666 ± 3.545	.005*
	Lacunosum-Molec.	140.200 ± 3.008	138.543 ± 4.853	.786
PSA-NCAM				
CA1	Oriens	121.006 ± 7.258	115.857 ± 4.350	.138
	Pyramidal	133.800 ± 3.706	126.943 ± 2.318	.134
	Radiatum	119.266 ± 6.180	116.371 ± 4.668	.375
	Lacunosum-Molec.	133.933 ± 4.668	136.771 ± 15.247	.735
CA3	Oriens	137.400 ± 7.767	134.914 ± 7.615	.573
	Pyramidal	127.650 ± 1.877	128.029 ± 2.692	.913
	Lucidum	175.566 ± 11.608	165.687 ± 5.728	.099
	Radiatum	124.733 ± 7.355	121.228 ± 1.682	.301
	Lacunosum-Molec.	157.400 ± 3.042	150.314 ± 1.757	.063
SYP				
CA1	Oriens	142.466 ± 10.379	136.00 ± 12.373	.334
	Pyramidal	85.500 ± 4.809	82.571 ± 4.176	.653
	Radiatum	132.266 ± 12.757	125.314 ± 13.485	.363
	Lacunosum-Molec.	102.700 ± 17.850	94.742 ± 13.816	.384
CA3	Oriens	145.880 ± 3.537	141.914 ± 12.243	.503
	Pyramidal	89.067 ± 5.739	84.171 ± 4.255	.499
	Lucidum	143.433 ± 10.074	140 ± 7.185	.555
	Radiatum	132.600 ± 11.625	125.685 ± 11.733	.310
	Lacunosum-Molec.	132.567 ± 5.387	131.000 ± 3.821	.8129

GAD67, glutamic acid decarboxylase 67; PSA-NCAM, polysialylated form of the neural cell adhesion molecule; SYP, synaptophysin.

Significant values ($p \leq 0.05$) are indicated by bold characters and an asterisk.

expression in the different layers and regions studied. We also analyzed the neuropil immunoreactivity in the different layers of the dentate gyrus, but we did not find any significant difference induced by stress (data not shown).

4 | DISCUSSION

The animals used in this study did not present stress-induced changes in their body weight (Gilabert-Juan et al., 2011), contrary to what it has been found in other strains (Chmielarz et al., 2006). Although there are no other experiments of chronic restraint stress using this strain, it is possible that it may be particularly resilient to weight changes, as other chronic stressors, such as social isolation, also failed to induce changes in body weight (Volden et al., 2013). Future studies should measure corticosterone levels and adrenal/thymus weights in order to reveal physiological changes associated with the stress-induced neuronal plasticity.

Our results show a reduction in the dendritic arborization of interneurons in the CA1, but not in CA3, after chronic stress. This chronic restraint stress paradigm (1 hr per day, 21 days) should be considered

mild. In fact, previous studies have demonstrated that in rats 2 hr of restraint per day are not enough to induce dendritic remodeling in pyramidal hippocampal neurons (McLaughlin, Gomez, Baran, & Conrad, 2007). However, similar restraint durations (2–3 hr) are able to induce morphological, neurochemical, and behavioral changes in mice (Qin, Xia, Huang, & Smith, 2011; Satoh, Tada, & Matsuhisa, 2011) and our previous experiments using the present strain and stress paradigm showed changes in the structure of amygdaloid and hippocampal interneurons (Gilabert-Juan et al., 2013, 2011). The EGFP-labeled cells in the CA1 region of GIN mice are O-LM interneurons, which project to the distal apical dendrites of pyramidal neurons in the stratum lacunosum-moleculare (Oliva et al., 2000). Previous studies in rats have revealed that chronic stress can induce atrophy of the apical dendritic tree of CA1 pyramidal neurons, including a retraction of their dendritic terminal segments (Sousa et al., 2000). Similar results have been obtained in the CA1 region of some mice strains subjected to chronic stress, where apical dendritic atrophy and spine density reduction have been observed (Christian, Miracle, Wellman, & Nakazawa, 2011; Magariños et al., 2011; Pawlak et al., 2005). It is possible that the reduction in dendritic arborization in the O-LM interneurons may also result in a decrease in the density or alterations

in the neurotransmission of the synaptic contacts that they make on the distal dendrites of pyramidal neurons. In the opposite direction, the atrophy of the distal arbor of pyramidal neurons may also induce reductions in the number of synaptic contacts made by O-LM interneurons or their function and this has an impact on their dendritic arborization. Future experiments should explore in detail the time course of the neuronal remodeling induced by stress in both principal neurons and interneurons. Notwithstanding, the reduction in GAD67 expression that we have observed in the CA1 stratum lacunosum-moleculare after stress is consistent with these putative reductions in the input that O-LM cells send to the distal dendrites of pyramidal neurons. No changes in GAD67 expression were detected in the stratum lacunosum-moleculare of CA3, which may be explained, at least partially, by the lack of structural remodeling in CA3 O-LM interneurons. However, reductions in GAD67 expression have been observed in the strata lucidum and radiatum, which most likely are due to changes in other interneuronal subpopulations, such as the mossy fiber-associated (MFA) or the calbindin-expressing multipolar interneurons of CA3, among others (Freund & Buzsáki, 1996; Vida & Frotscher, 2000). It is also possible that at least part of this reduction could be due to cell death. Although there is no evidence of neuronal degeneration in this hippocampal region after this paradigm of chronic stress, a 3-week treatment with corticosterone produced a decrease in the density of cells in the CA3 but not in the CA1 of adult rats (Sapolsky, Krey, & McEwen, 1985). The previous literature on the expression of this marker of inhibitory neurotransmission in the CA1 has described increases after chronic social stress (Makinson, Lundgren, Seroogy, & Herman, 2015), but not after chronic variable intermittent stress (Bowers, Cullinan, & Herman, 1998). However, these studies measured mRNA expression and were not focused in a particular layer.

Our results on the analysis of PSA-NCAM expression are similar to those found previously in the mPFC of GIN mice, where chronic stress did not induce changes (Gilabert-Juan et al., 2013). Previous studies in rats have found increases in the hippocampal expression of this plasticity-related molecule after chronic restraint stress (Pham, Nacher, Hof, & McEwen, 2003; Sandi, Merino, Cordero, Touyarot, & Venero, 2001). However, the daily restraint period used was considerably longer in rats than in our mice. Moreover, the increased expression of PSA-NCAM in rats appears to be associated mainly with changes in granule neurons and their projections to CA3 stratum lucidum (Pham et al., 2003).

Our study adds to the growing evidence that hippocampal inhibitory networks are also the targets of chronic stress. A negative impact of this aversive experience on the density of interneurons-expressing parvalbumin, calretinin, and also in those expressing neuropeptide Y and somatostatin has been recently described in rats (Czéh et al., 2015). Although most of EGFP-labeled interneurons in the hippocampus of GIN mice express somatostatin, we have failed to find decreases in the number of these interneurons in our model. This discrepancy may be explained by the longer exposure to stressor in the Czéh et al. (2015) study (9 weeks vs. 3 weeks in our study), as well as by species differences in the response to chronic stressors.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare no conflict of interest.

FUNDING INFORMATION

Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. Grant Number: BFU2012-32512, Generalitat Valenciana Prometeo Excellence Program. Grant Number: PROMETEO2013/069 and the Fundación Alicia Koplowitz to JN.

REFERENCES

- Bowers, G., Cullinan, W. E., & Herman, J. P. (1998). Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *Journal of Neuroscience*, *18*, 5938–5947.
- Castillo-Gomez, E., Varea, E., Blasco-Ibanez, J. M., Crespo, C., & Nacher, J. (2011). Polysialic acid is required for dopamine d2 receptor-mediated plasticity involving inhibitory circuits of the rat medial prefrontal cortex. *PLoS One*, *6*, e29516.
- Chmielarz, P., Kreiner, G., Kuśmierczyk, J., Kowalska, M., Roman, A., Tota, K., & Nalepa, I. (2006). Depressive-like immobility behavior and genotype × stress interactions in male mice of selected strains. *Stress*, *19*, 206–213.
- Christian, K. M., Miracle, A. D., Wellman, C. L., & Nakazawa, K. (2011). Chronic stress-induced hippocampal dendritic retraction requires CA3 NMDA receptors. *Neuroscience*, *174*, 26–36. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.11.033
- Cook, S. C., & Wellman, C. L. (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Journal of Neurobiology*, *60*, 236–248. doi:10.1002/neu.20025
- Czeh, B., Simon, M., van der Hart, M. G., Schmelting, B., Hesselink, M. B., & Fuchs, E. (2005). Chronic stress decreases the number of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus: Prevention by treatment with a substance P receptor (NK1) antagonist. *Neuropsychopharmacology*, *30*, 67–79. doi:10.1038/sj.npp.1300581
- Czéh, B., Varga, Z. K. K., Henningsen, K., Kovács, G. L., Miseta, A., & Wiborg, O. (2015). Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences. *Hippocampus*, *25*, 393–405. doi:10.1002/hipo.22382
- Freund, T. F., & Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, *6*, 347–470. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4 <347:AID-HIPO1 > 3.0.CO;2-I
- Gilabert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Guirado, R., Moltó, M. D., & Nacher, J. (2013). Chronic stress alters inhibitory networks in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Brain Structure and Function*, *218*, 1591–1605. doi:10.1007/s00429-012-0479-1
- Gilabert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Pérez-Rando, M., Moltó, M. D., & Nacher, J. (2011). Chronic stress induces changes in the structure of interneurons and in the expression of molecules related to neuronal structural plasticity and inhibitory neurotransmission in the amygdala of adult mice. *Experimental Neurology*, *232*, 33–40. doi:10.1016/j.expneurol.2011.07.009
- Gómez-Climent, M. Á., Guirado, R., Castillo-Gómez, E., Varea, E., Gutierrez-Mecinas, M., Gilabert-Juan, J., ... Nacher, J. (2011). The polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) is expressed in a subpopulation of mature cortical interneurons characterized by reduced structural features and connectivity. *Cerebral Cortex*, *21*, 1028–1041. doi:10.1093/cercor/bhq177

- Hu, W., Zhang, M., Czéh, B., Flügge, G., & Zhang, W. (2010). Stress impairs GABAergic network function in the hippocampus by activating nongenomic glucocorticoid receptors and affecting the integrity of the parvalbumin-expressing neuronal network. *Neuropsychopharmacology*, *35*, 1693–1707. doi:10.1038/npp.2010.31
- Liston, C., Miller, M. M., Goldwater, D. S., Radley, J. J., Rocher, A. B., Hof, P. R., ... McEwen, B. S. (2006). Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *Journal of Neuroscience*, *26*, 7870–7874. doi:10.1523/JNEUROSCI.1184-06.2006
- Longair, M. H., Baker, D. A., & Armstrong, J. D. (2011). Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics*, *27*, 2453–2454.
- Magariños, A. M., Li, C. J., Gal Toth, J., Bath, K. G., Jing, D., Lee, F. S., & McEwen, B. S. (2011). Effect of brain-derived neurotrophic factor haploinsufficiency on stress-induced remodeling of hippocampal neurons. *Hippocampus*, *21*, 253–264. doi:10.1002/hipo.20744
- Makinon, R., Lundgren, K. H., Seroogy, K. B., & Herman, J. P. (2015). Chronic social subordination stress modulates glutamic acid decarboxylase (GAD) 67 mRNA expression in central stress circuits. *Physiology & Behavior*, *146*, 7–15. doi:10.1016/j.physbeh.2015.04.025
- McLaughlin, K. J., Gomez, J. L., Baran, S. E., & Conrad, C. D. (2007). The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: An evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Research*, *1161*, 56–64. doi:10.1016/j.brainres.2007.05.042
- Nacher, J., Blasco-Ibáñez, J. M., & McEwen, B. S. (2002). Non-granule PSA-NCAM immunoreactive neurons in the rat hippocampus. *Brain Research*, *930*, 1–11.
- Oliva, A. A., Jiang, M., Lam, T., Smith, K. L., & Swann, J. W. (2000). Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *Journal of Neuroscience*, *20*, 3354–3368.
- Pawlak, R., Rao, B. S. S., Melchor, J. P., Chattarji, S., McEwen, B., & Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*, 18201–18206. doi:10.1073/pnas.0509232102
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P. R., & McEwen, B. S. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, *17*, 879–886.
- Qin, M., Xia, Z., Huang, T., & Smith, C. B. (2011). Effects of chronic immobilization stress on anxiety-like behavior and basolateral amygdala morphology in Fmr1 knockout mice. *Neuroscience*, *194*, 282–290. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.047
- Radley, J. J., Rocher, A. B., Miller, M., Janssen, W. G. M., Liston, C., Hof, P. R., ... Morrison, J. H. (2006). Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, *16*, 313–320. doi:10.1093/cercor/bhi104
- Radley, J. J., Sisti, H. M., Hao, J., Rocher, A. B., McCall, T., Hof, P. R., ... Morrison, J. H. (2004). Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, *125*, 1–6. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.01.006
- Sandi, C., Merino, J. J., Cordero, M. I., Touyarot, K., & Venero, C. (2001). Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. *Neuroscience*, *102*, 329–339.
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., & McEwen, B. S. (1985). Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: Implications for aging. *Journal of Neuroscience*, *5*, 1222–1227.
- Satoh, E., Tada, Y., & Matsuhisa, F. (2011). Chronic stress enhances calcium mobilization and glutamate exocytosis in cerebrocortical synaptosomes from mice. *Neurological Research*, *33*, 899–907. doi:10.1179/1743132811Y.0000000033
- Sousa, N., Lukoyanov, N. V., Madeira, M. D., Almeida, O. F., & Paula-Barbosa, M. M. (2000). Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*, *97*, 253–266.
- Varea, E., Blasco-Ibanez, J. M., Gomez-Climent, M. A., Castillo-Gomez, E., Crespo, C., Martinez-Guijarro, F. J., & Nacher, J. (2007). Chronic fluoxetine treatment increases the expression of PSA-NCAM in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, *32*, 803–812.
- Vida, I., & Frotscher, M. (2000). A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*, 1275–1280.
- Volden, P. A., Wonder, E. L., Skor, M. N., Carmean, C. M., Patel, F. N., Ye, H., ... Conzen, S. D. (2013). Chronic social isolation is associated with metabolic gene expression changes specific to mammary adipose tissue. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, *6*, 634–645.
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B. S., & Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *Journal of Neuroscience*, *22*, 6810–6818.
- Watanabe, Y., Gould, E., & McEwen, B. S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research*, *588*, 341–345.
- West, M. J., Slomianka, L., & Gundersen, H. J. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record*, *231*, 482–497.

How to cite this article: Gilabert-Juan, J., Bueno-Fernandez, C., Castillo-Gomez, E. and Nacher, J. (2016), Reduced interneuronal dendritic arborization in CA1 but not in CA3 region of mice subjected to chronic mild stress, *Brain and Behavior*, 00: 1–7. e00534, doi: 10.1002/brb3.534

ARTICLE 2

Journal: Frontiers in Cellular Neuroscience

Authors: Clara Bueno-Fernandez*, Ana Paula Pesarico*, Ramón Guirado, María Ángeles Gómez-Climent, Yasmina Curto, Hector Carceller i Juan Nacher.

Publication date: May 7th, 2019



Chronic Stress Modulates Interneuronal Plasticity: Effects on PSA-NCAM and Perineuronal Nets in Cortical and Extracortical Regions

OPEN ACCESS

Edited by:

Boldizsar Czeh,
University of Pécs, Hungary

Reviewed by:

Dragana Filipovic,
Vinča Nuclear Institute, University
of Belgrade, Serbia
Pascal Steullet,
Lausanne University Hospital (CHUV),
Switzerland
Tamas Kovács-Öller,
University of Pécs, Hungary

*Correspondence:

Juan Nacher
nacher@uv.es

†These authors have contributed
equally to this work

‡Present address:

María Ángeles Gómez-Climent,
Universidad Internacional de la Rioja,
Facultad de Educación,
Avenida de la Paz, Logroño, Spain

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Neurophysiology,
a section of the journal
Frontiers in Cellular Neuroscience

Received: 24 December 2018

Accepted: 18 April 2019

Published: 07 May 2019

Citation:

Pesarico AP, Bueno-Fernandez C,
Guirado R, Gómez-Climent MÁ,
Curto Y, Carceller H and Nacher J
(2019) Chronic Stress Modulates
Interneuronal Plasticity: Effects on
PSA-NCAM and Perineuronal Nets
in Cortical and Extracortical Regions.
Front. Cell. Neurosci. 13:197.
doi: 10.3389/fncel.2019.00197

Ana Paula Pesarico^{1†}, Clara Bueno-Fernandez^{1†}, Ramón Guirado¹,
María Ángeles Gómez-Climent^{1‡}, Yasmina Curto¹, Hector Carceller¹ and
Juan Nacher^{1,2,3*}

¹ Neurobiology Unit, Program in Neurosciences and Interdisciplinary Research Structure for Biotechnology and Biomedicine (BIOTECMED), Universitat de València, Burjassot, Spain, ² Spanish National Network for Research in Mental Health, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, Spain, ³ Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia, INCLIVA, Valencia, Spain

Chronic stress has an important impact on the adult brain. However, most of the knowledge on its effects is focused on principal neurons and less on inhibitory neurons. Consequently, recent reports have begun to describe stress-induced alterations in the structure, connectivity and neurochemistry of interneurons. Some of these changes appear to be mediated by certain molecules particularly associated to interneurons, such as the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) and components of the perineuronal nets (PNN), specialized regions of the extracellular matrix. These plasticity-related molecules modulate interneuronal structure and connectivity, particularly of parvalbumin expressing basket interneurons, both during development and adult life. These inhibitory neurons are specially affected after chronic stress and in some stress-related disorders, in which the expression of PSA-NCAM and certain components of PNN are also altered. For these reasons we have decided to study PSA-NCAM, PNN and parvalbumin expressing interneurons after 10 days of chronic restraint stress, a time point in which its behavioral consequences are starting to appear. We have focused initially on the medial prefrontal cortex (mPFC), basolateral amygdala (BLA) and hippocampus, regions affected by stress and stress-related psychiatric diseases, but we have also explored the habenula and the thalamic reticular nucleus (TRN) due to the important presence of PNN and their relationship with certain disorders. PSA-NCAM expression was increased by stress in the stratum lacunosum-moleculare of CA1. Increases in parvalbumin immunoreactive cells were detected in the mPFC and the BLA, but were not accompanied by increases in the number of parvalbumin expressing perisomatic puncta on the somata of principal neurons. The number of PNN was also increased in the mPFC and the habenula, although habenular PNN were not associated to parvalbumin cells. Increased expression of parvalbumin and components of PNN were also detected in the TRN after chronic restraint stress,

revealing for the first time substantial effects on this region. Our study shows that, even a short chronic stress protocol, can induce consistent changes in interneuronal plasticity-related molecules in cortical and extracortical regions, which may represent initial responses of inhibitory circuits to counteract the effects of this aversive experience.

Keywords: chronic stress, perineuronal net, PSA-NCAM, medial prefrontal cortex, basolateral amygdala, reticular thalamic nucleus, habenula, hippocampus

INTRODUCTION

Stress, a prevalent experience in modern society, is a major predisposing and triggering factor to mood disorders in humans. Studies in both humans and rodents show that stress impairs the functioning of the medial prefrontal cortex (mPFC) and basolateral amygdala (BLA) (Shepard et al., 2016; Pesarico et al., 2017; Sachs et al., 2018), which are two of the brain regions predominantly dysfunctional in stress-related psychiatric disorders, such as generalized anxiety, major depression and post-traumatic stress disorder (PTSD) (Drevets et al., 2008). The effects of stress and stress-related disorders are not, however, restricted to these two regions and have been also detected in the hippocampus or the habenula, among others (Jacinto et al., 2017; Belleau et al., 2018). Several studies have demonstrated the existence of profound changes in the structure and connectivity of excitatory neurons in the aforementioned regions after chronic stress (McEwen, 2000; Roozendaal et al., 2009; Radley et al., 2015; Jacinto et al., 2017). More recently, it has become evident that chronic stress also induces changes in inhibitory circuits of the adult brain and that similar alterations can be found in patients suffering from major depression or PTSD. At the cellular level these alterations include decreases in the density (Czeh et al., 2005, 2015) and changes in the structure (Gilbert-Juan et al., 2011, 2013, 2017) of certain interneuronal subpopulations. Interestingly, one group of interneurons specially affected by chronic stress are those expressing parvalbumin (PV): decreases in the density of PV+ interneurons have been detected in the mPFC and the hippocampus of adult rats submitted to chronic stress (Czeh et al., 2005, 2015, 2018; Zadrozna et al., 2011; Banasr et al., 2017). Moreover, a reduction of synaptic release has been described in the perisomatic region of mPFC pyramidal neurons, where most of these PV+ interneurons establish their synaptic contacts (Czeh et al., 2018). However, it is not known whether chronic stress could induce changes in this population of interneurons in other brain regions affected in stress-related disorders, such as the amygdala or the habenula.

The maturation and plasticity of PV+ interneurons are mediated by the presence of molecules that influence their structure and connectivity. Recently, different laboratories, including our own, have been studying the role of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) and of perineuronal nets (PNN) on the plasticity of PV+ interneurons. PSA-NCAM is expressed by a subpopulation of interneurons in the adult telencephalon, and particularly it is present in some of the boutons that PV+ basket cells establish on the somata of pyramidal neurons (Castillo-Gomez et al., 2011). The expression of PSA-NCAM is critical for the regulation of this inhibitory input, both during their development

(Di Cristo et al., 2007) and during adulthood (Castillo-Gomez et al., 2011, 2016). PNN are specialized regions of the extracellular matrix, which are particularly abundant surrounding the somata, dendrites and proximal axon segment of fast-spiking, PV+ interneurons (Hartig et al., 1992). Although the function of PNN has not yet been fully resolved, research conducted has suggested that these structures are involved in the closure and reopening of critical periods, response to aversive experiences such as fear and the regulation of synaptic plasticity (Gogolla et al., 2009; Carulli et al., 2010; Pantazopoulos and Berretta, 2016; Sorg et al., 2016; Banerjee et al., 2017).

These important roles of PSA-NCAM and PNN in the development and plasticity of interneuronal circuits are probably reflected in the alterations of their expression levels found in different psychiatric disorders (Varea et al., 2012; Berretta et al., 2015). Moreover, the study of rodent models of chronic stress has revealed alterations in the expression of PSA-NCAM and some of the molecules integrated in the PNN, which may suggest their involvement on the plasticity associated to this aversive experience, particularly on that of inhibitory neurons (Sandi, 2004; Nacher et al., 2013; Soleman et al., 2013). Unfortunately, the information on the expression of these plasticity-related molecules after stress is still fragmentary. The expression of these molecules has not been studied yet in some regions of the adult CNS after chronic stress and most of the information regarding changes in PNN has been obtained in models subjected to stress in early life (Castillo-Gomez et al., 2017; Ueno et al., 2018).

The main objective of the present study was to study the effects of a short period of chronic stress, 10 days of restraint, on PV+ interneurons, PSA-NCAM and PNN in the brain of adult rats. We have focused on the effects on the mPFC and the BLA, because in these regions previous reports already have shown alterations in interneurons after chronic stress, but we have also explored other regions affected by this aversive experience, such as the hippocampus and the habenula. We have also studied the thalamic reticular nucleus (TRN), a region with a very high density of PNN surrounding PV+ interneurons. Interestingly, the density of both PV+ interneurons and PNN is altered in this thalamic region in patients suffering from schizophrenia and bipolar disorder (Steullet et al., 2017), two psychiatric disorders in which stress may act as a precipitating factor.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Stress Procedure

Adult male Sprague-Dawley rats (13 weeks-old at the beginning of the experiment; 381.9 ± 4.1 g; Harlan Interfauna Iberica S.L.,

Barcelona, Spain) were used for all experimental procedures. Animals were housed in groups of 3 in a temperature- and humidity-controlled environment and maintained on a 12 h light/dark cycle with food and water available *ad libitum*. Rats were allowed to habituate to our facilities 1 week prior to the start of the experiments. All experiments were performed during the lights on period, and were conducted in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes and was approved by the Committee on Bioethics of the Universitat de València. Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

Twelve rats were used for repeated restraint stress experiment. One group of rats ($n = 6$) were stressed 6 h per day (10:00 a.m.) for 10 consecutive days. These rats were kept inside wire mesh restrainers that were clamped at both openings and were placed inside their home cages during the restraint sessions. Six rats were left undisturbed in their home cages and served as controls for this experiment. The control and stressed rats were kept in separate cages. The animals were euthanized 24 h after the last stress session in a random order, in a different room than the one in which restraints were carried out.

Perfusion, Microtomy, and Immunohistochemistry

Animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde solution in phosphate buffer (PB) 0.1 M. The brains were cryoprotected (30% sucrose in PB 0.1 M, 48 h) and afterward cut in 50- μ m-thick coronal sections, using a freezing-sliding microtome (LEICA SM2000R, Leica). Sections were collected in 10 subseries.

Two subseries of sections were processed “free-floating” for immunohistochemistry. Briefly, sections were washed in PBS and then incubated for 1 h in 10% normal donkey serum (NDS; Abcys) in PBS with 0.2% Triton X-100 (PBST; Sigma-Aldrich). Afterward, they were incubated for 48 h at 4°C with the appropriate primary antibody or antibody cocktail (see **Table 1**) diluted in PBST and 5% NDS: (a) a double staining with an antibody against parvalbumin (PV) and a biotin-conjugated lectin from *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA) to label PNN and (b) a triple immunostaining using an

anti-CaMKII- α primary antibody in combination with anti-PV and anti-synaptophysin (SYN) primary antibodies, to study the perisomatic innervation of pyramidal neurons. After washing, sections were incubated for 2 h at room temperature with appropriate fluorochrome conjugated secondary antibodies or avidin (see **Table 1**), which were also diluted in PBST. Finally, sections were washed in PB 0.1 M, mounted on slides and coverslipped using fluorescence mounting medium (Dako).

Another subseries of sections was processed “free-floating” for conventional immunohistochemistry as follows. Briefly, sections were incubated for 1 min in an antigen unmasking solution (0.01 M citrate buffer, pH 6) at 100°C. After cooling down the sections to room temperature, they were incubated with 10% methanol, 3% H₂O₂ in phosphate buffered saline (PBS) for 10 min to block endogenous peroxidase activity. After this, sections were treated for 1 h with 5% NDS (Jackson Laboratories) in PBS with 0.2% Triton-X100 (Sigma) and were incubated overnight at room temperature in mouse monoclonal Men-B anti-PSA-NCAM antibody (1:1400; Abcys). After washing, sections were incubated for 30 min with donkey anti-mouse IgM or donkey anti-mouse IgG biotinylated antibodies (Jackson Laboratories, 1:250), followed by an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC, Vector Laboratories) for 30 min in PBS. Color development was achieved by incubating with 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) for 4 min. PBS containing 0.2% Triton-X100 and 3% NDS was used for primary and secondary antibodies dilution. All of the sections studied passed through all procedures simultaneously, to minimize any differences from immunohistochemical staining itself.

Quantification of PSA-NCAM Expression

We determined PSA-NCAM immunoreactivity intensity in the neuropil of the different regions studied [superficial and deep layers of cingulate 1 (Bregma 3.7 to Bregma -1.4), prelimbic (Bregma 4.7 to Bregma 2.2) and infralimbic (Bregma 3.2 to Bregma 2.2) cortices, BLA (Bregma -1.6 to Bregma -4.16) and all layers in the CA1 region of the ventral (Bregma -4.3 to Bregma -6.3) and dorsal (Bregma -1.6 to Bregma -4.3) hippocampus] using a previously described methodology (Varea et al., 2007). We analyzed 7 slices per animal for the mPFC, 2 for the BLA and 3 for the ventral and dorsal hippocampus. Sections were examined under bright-field illumination, homogeneously lighted and digitalized using a CCD camera. Photographs were taken at 20 \times magnification. The different regions of interest were delineated using the polygon selection tool in free Java image- processing program Fiji (Schindelin et al., 2012). Gray levels were then converted to optical densities (OD). In order to normalize the values, the gray levels obtained from photographs of the corpus callosum in each section were subtracted from those obtained in the different layers. We used a parallel subseries of section stained with toluidine blue in order to better delineate the regions, subregions and layers under study. We were able to distinguish the border of CA1/CA2 region with the aid of our subseries of sections stained with WFA. This lectin labels intensely the neuropil of the CA2 region making it easily discernible (Lensjo et al., 2017).

TABLE 1 | List of primary and secondary antibodies used in the study.

	Dilution	Company
Primary antibodies		
Polyclonal guinea pig anti-parvalbumin	1:2000	Synaptic Systems
WFA lectin biotin-conjugated	1:200	Sigma
Polyclonal rabbit anti- synaptophysin	1:500	Millipore
Monoclonal mouse anti-CaMKII	1:500	Abcam
Secondary antibodies		
Goat anti-mouse A635-conjugated	1:200	Life Technology
Goat anti-guinea pig A555-conjugated	1:200	Life Technology
Donkey anti-rabbit A488-conjugated	1:200	Invitrogen
Avidin A647-conjugated	1:200	Invitrogen

Quantification of PV Expressing Cells and PNN

The total number of PV+ neurons, PNN, and PV+ neurons surrounded by PNN from the hippocampus, BLA, habenula and mPFC (including the cingulate 1, prelimbic and infralimbic cortices) were estimated using a modified version of the fractionator method (West, 1993; Nacher et al., 2002; Varea et al., 2007). We counted cells covering 100% of the sample area, that is, within each section, all labeled cells in the different subdivision and layers were counted. The fractionator sampling scheme refers to the methodology of examining one out of every 10 brain sections. Thus, our modification of the optical dissector combined with a 1:10 fractionator sampling is truly a modification of the optical fractionator method. 1:10 systematic-random series of sections covering the whole rostral to caudal extension of the structures were viewed on an Olympus CX41 microscope. The volume of the different regions analyzed was determined for each animal using the Cavalieri's principle (Gundersen and Jensen, 1987) and no differences between groups were observed.

Cell somata were identified and counted with a 40× objective using a fluorescence microscope (Olympus CX41). Cells appearing in the upper focal plane were omitted to prevent counting cell caps. In order to classify a cell as positive for PNN or PV every somata was surrounded by a polygon selection using FIJI. Then we analyzed the mean gray value of this selection. Only cells with values higher than 60 were considered positive.

Quantification of PV and PNN Fluorescence Intensity in the Thalamic Reticular Nucleus and the CA2 Region of the Hippocampus

The high density of PV+ somata and PNN in the TRN made impossible the counting of individual neurons in these structures. Therefore, we measured the intensity of their fluorescence in the reticular thalamic nucleus in order to have an estimation of their abundance and the expression of these markers in this region. We also applied this methodology in the CA2 region, where no individually discernible PNN could be found; WFA labeling was very intense and widespread. Three slices per animal containing the TRN (Bregma -1.3 to Bregma -3.8) and 3 containing the dorsal hippocampus (Bregma -1.7 to Bregma -2.18) were studied. Photographs were taken at 20× magnification with a confocal microscope (Leica TCS SPE). The TRN and the CA2 region were delineated using the polygon selection tool in Fiji (Schindelin et al., 2012). In order to normalize the values, the gray levels obtained from photographs of the external capsule in each section were subtracted from those obtained in the different layers.

Quantification of Perisomatic Puncta on Pyramidal Neurons

The density of puncta expressing SYN and PV surrounding principal neuron somata (identified by CaMKII- α expression)

was analyzed in the regions showing alterations in the number of PV+ cells. For this purpose, we followed a previously described protocol (Guirado et al., 2014). In the mPFC and BLA, between 20 and 25 pyramidal neurons were imaged per animal in three different sections. Confocal z-stacks covering the whole depth of the neuron somata were taken with 0.5 μm step size using a 63× oil objective with 2× digital zoom magnification (Leica TCS SPE confocal microscope). The profile of the soma of these neurons was drawn manually, then a macro was used to analyze the density of puncta around the perimeter. The manual selection was enlarged 1 μm in order to define the perisomatic area. Images were then processed to binarize the 5% brightest elements of the histogram. All particles displaying an area not smaller than 0.15 μm^2 and not larger than 2.5 μm^2 were defined as puncta (Di Cristo et al., 2007). The definition of puncta was based on previous literature (Di Cristo et al., 2007). We analyzed areas acquired by the confocal microscope that were averaged 3 times (each confocal plane), decreasing noise significantly. The smallest puncta we recognized had a lateral size of 0.38 μm , which is above the lateral resolution of the confocal microscope.

Statistics

All slides were coded prior to quantitative analysis, and the code was not broken until the quantification was completed. All experimental results are given as the mean \pm S.E.M. First, we evaluated the normality of data using the D'Agostino and Pearson omnibus test. Comparisons between control and stressed groups were performed by the Student's *t*-test. Probability values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as statically significant. The correlation coefficients between the number of PV positive neurons and that of PNN in different brain regions, in control and stressed animals, were tested by using Pearson's correlation analysis. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Effects of Restraint Stress on PSA-NCAM Expression

We have analyzed PSA-NCAM expression in the neuropil of different telencephalic regions in which this molecule has a considerable expression and in which we have previously detected changes in its expression or in those of molecules involved in inhibitory neurotransmission after chronic stress: the mPFC, the BLA and the dorsal and ventral hippocampus, see Nacher et al. (2013) for review. Chronic stress induced increases in the expression of PSA-NCAM in the CA1 region of the ventral and dorsal hippocampus (Figures 1A–D): In the dorsal hippocampus we observed a significant increase in the stratum lacunosum-moleculare, the layer with higher levels of expression of this molecule (Figure 1C; $p = 0.006$). In the ventral hippocampus we found significant increases in the strata pyramidale and radiatum (Figure 1D; $p = 0.021$, $p = 0.038$). Ten days of restraint stress did not induce significant changes in

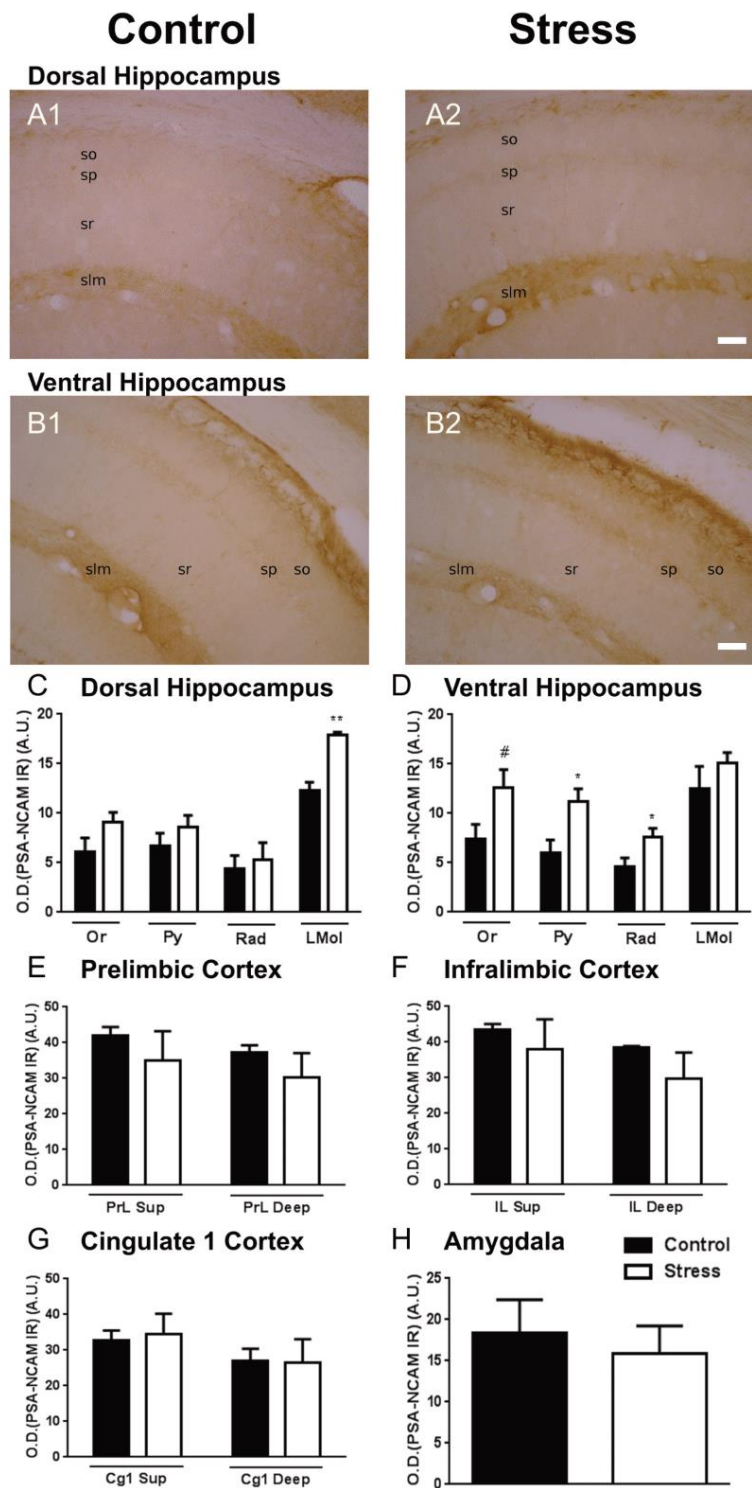


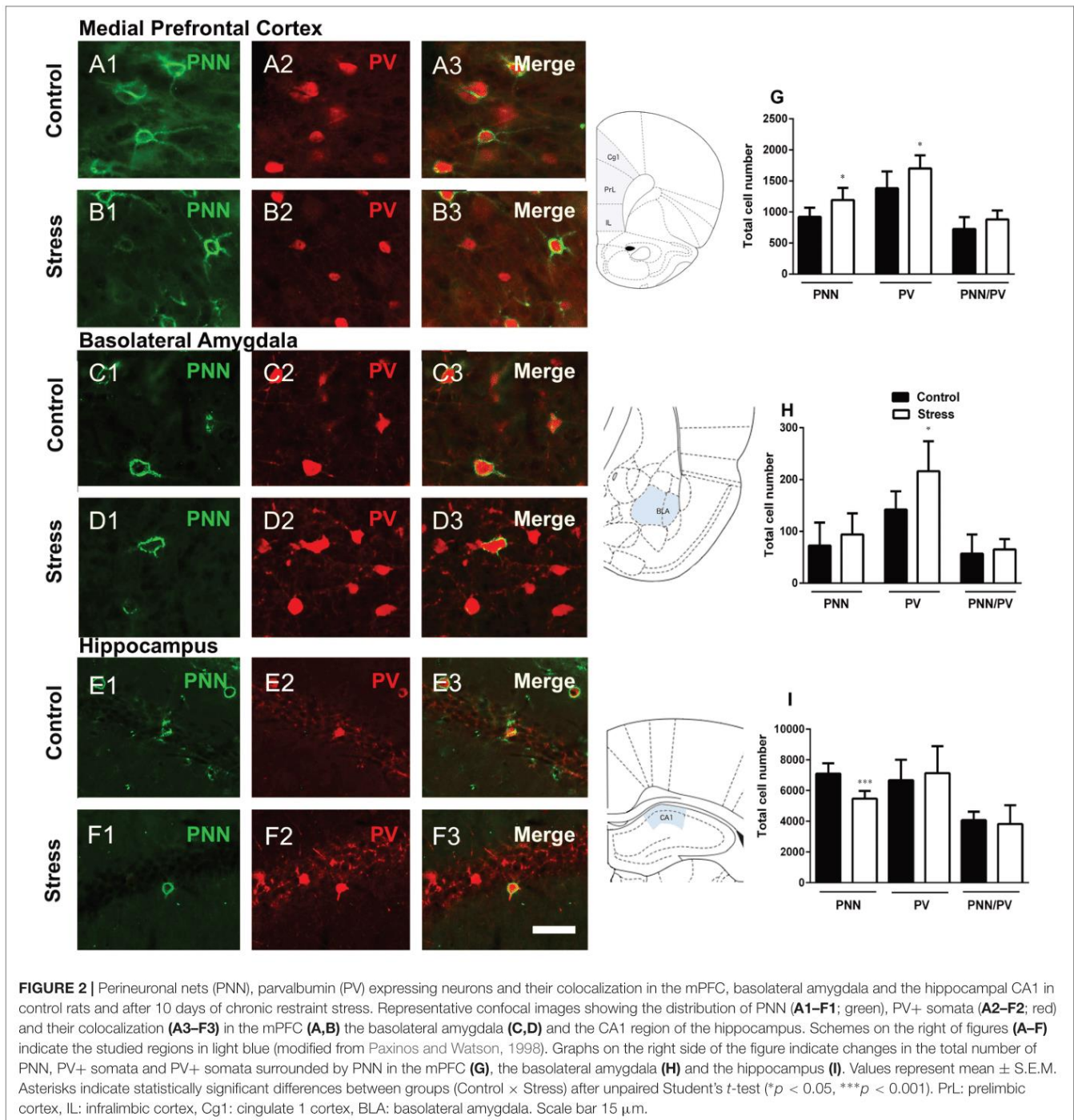
FIGURE 1 | Graphs representing the changes in the intensity of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) immunostaining in the neuropil of different telencephalic regions. **(A,B)** Microphotographs of the dorsal **(A)** and ventral **(B)** hippocampus of a control **(A1,B1)** and a chronically stressed **(A2,B2)** rat. **(C,D)** CA1 region of the dorsal **(C)** and ventral **(D)** hippocampus, including the strata oriens (Or), pyramidale (Py) radiatum (Rad) and lacunosum-moleculare (LMol). **(E–G)** superficial (I–III, Sup) and deep (IV–VI) layers of the mPFC, including the prelimbic (PrL, **E**), infralimbic (IL, **F**) and cingulate 1 (Cg1, **G**) cortices. **(H)** Basolateral amygdala (BLA). Values represent mean \pm S.E.M. Asterisks indicate statistically significant differences between groups (Control \times Stress) after unpaired Student's *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; # $0.1 < p < 0.05$). Scale bars: 15 μ m.

neuropil PSA-NCAM immunostaining in any of the regions of the mPFC (Figures 1E–G) or in the BLA (Figure 1H).

Effects of Restraint Stress in the Number of PNN and PV+ Cells

The number of PNN ($p = 0.022$) and parvalbumin expressing (PV+) cells ($p = 0.045$) in the mPFC (including the infralimbic, prelimbic and cingulate 1 cortices) were significantly increased

in stressed rats when compared to controls. However, there was no significant difference in the number of PV+ cells surrounded by PNN ($p = 0.146$) between the groups (Figures 2A,B,G). The density of PV+ neurons and PNN showed a strong and significant positive linear correlation in the mPFC of control animals ($r = 0.9118$, $p < 0.01$), but this correlation was not significant in stressed individuals ($r = 0.717$, $p < 0.108$). We also investigated whether repeated restraint stress altered the number of PV+ cells and PNN in the BLA. The number

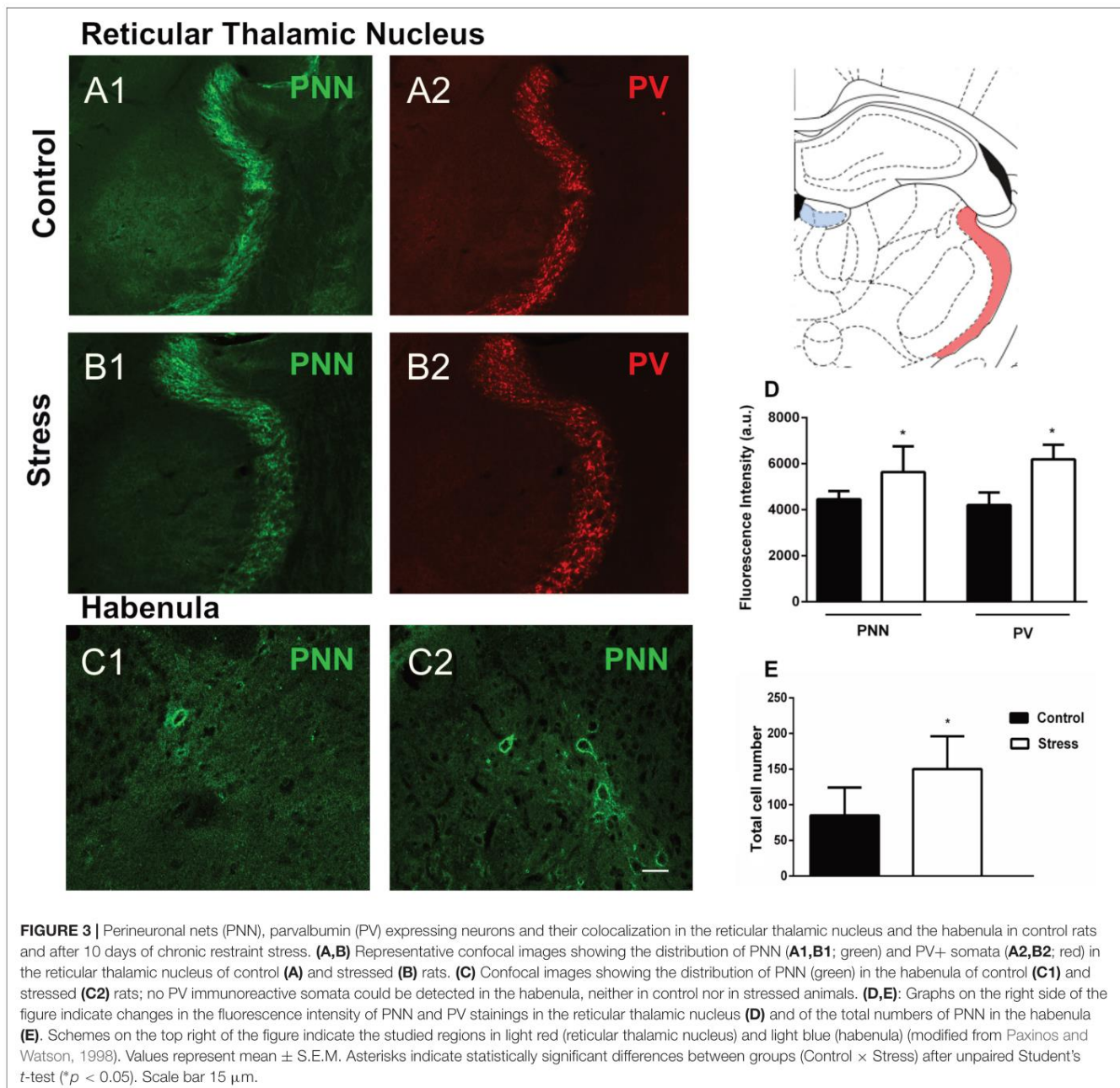


of PV+ cells in this amygdaloid region was significantly increased in stressed rats ($p = 0.023$). There were no significant differences in the number of PNN ($p = 0.407$) or PNN/PV+ cells ($p = 0.653$) (Figures 2C,D,H). The number of PV+ and PNN neurons showed a significant positive linear correlation in the BLA of control animals ($r = 0.804, p < 0.05$), but such correlation did not exist in stressed individuals ($r = -0.04, p < 0.941$).

The analysis of the number of PNN in the hippocampal CA1 region revealed a significant decrease in stressed rats when compared to controls ($p = 0.0008$). There were no significant differences in the number of PV+ cells ($p = 0.626$)

or PNN/PV+ cells ($p = 0.670$) (Figures 2E,F,I). The number of PV+ neurons and PNN did not show a significant linear correlation neither in the CA1 of control animals ($r = -0.407, p < 0.422$), nor in that of stressed individuals ($r = 0.681, p < 0.136$).

We also studied whether repeated restraint stress affected PNN and PV+ cells in the TRN. By analyzing the intensity of fluorescence, we found that stress clearly increased the immunoreactivity of PNN ($p = 0.033$) and PV ($p = 0.0002$) (Figures 3A,B,D). Using the same methodology, we analyzed WEA fluorescence in the hippocampal CA2 and did not find significant differences ($p = 0.448$) after



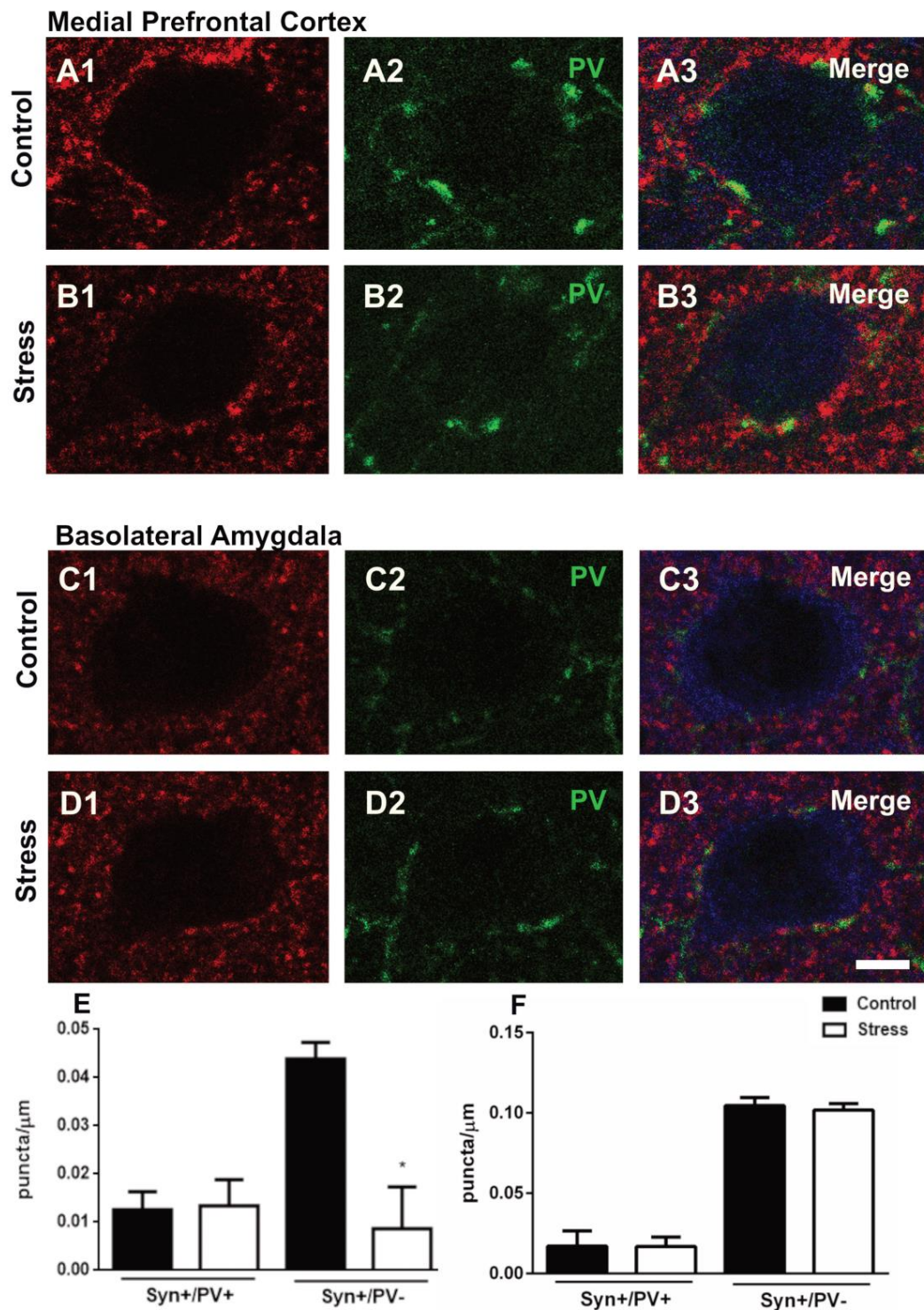


FIGURE 4 | Confocal microscopic analysis of parvalbumin (PV) and synaptophysin (SYN) expressing puncta in the perisomatic region of excitatory neurons in the mPFC and basolateral amygdala in control rats and after 10 days of chronic restraint stress. Single confocal planes of principal neuron somata (immunolabeled for CaMKII- α ; blue) showing perisomatic puncta immunoreactive for SYN (A1–D1; red) and PV (A2–D2; green) and their colocalization (A3–D3) in the mPFC (A,B) and the basolateral amygdala (C,D). Graphs on the bottom of the figure show changes in the linear density (number of puncta/ μm of soma perimeter) of synaptophysin expressing perisomatic puncta with (Syn+/PV+) or without (Syn+/PV-) PV coexpression (E: mPFC; F: BLA). Values represent mean \pm S.E.M. Asterisks indicate statistically significant differences between groups (Control \times Stress) after unpaired Student's *t*-test ($*p < 0.05$). Scale bar 5 μm .

chronic stress. In accordance with previous reports (Smith et al., 1987; Li et al., 2011; Meye et al., 2013) we failed to detect parvalbumin expressing interneurons in the habenula, although some PNN could be observed and quantified. The number of these PV-/PNN was significantly increased ($p = 0.025$) after 10 days of chronic restraint stress (Figures 3C,E).

Effects of Restraint Stress on PV Immunoreactive Puncta on the Perisomatic Region of mPFC and Basolateral Amygdala Excitatory Neurons

Since repeated restraint stress altered the number of PV+ interneurons in the mPFC and the BLA and given the importance of these cells on the perisomatic inhibition of excitatory neurons, we decided to analyze the density of synaptophysin (SYN) expressing puncta with or without PV immunoreactivity surrounding the somata of these principal neurons. The excitatory neuronal somata were identified by the presence of CAMKII immunoreactivity. In the mPFC repeated restraint stress did not change the density of SYN+/PV+ puncta but decreased significantly that of PV-/SYN expressing puncta ($p = 0.019$), (Figures 4A,B,E). Chronic stress did not significantly change the density of perisomatic puncta on excitatory neurons of the BLA (Figures 4C,D,F).

DISCUSSION

The main objective of this study was to evaluate the effects of chronic stress on molecules related to interneuronal plasticity in different regions of the adult CNS. Our results reveal only local effects on PSA-NCAM expression in the hippocampal CA1 region. By contrast, they show wider and more profound alterations in the number of PNN, which in some cases are associated to PV+ and in some others appear to be independent from these interneurons. Interestingly, these alterations in PNN are not only found in the commonly studied regions in chronic stress models, but also in less explored areas, such as the habenula or the reticular thalamic nucleus.

We first evaluated the expression of PSA-NCAM, since this molecule is expressed by a subpopulation of interneurons in the adult telencephalon and regulates their structure and connectivity (Gomez-Climent et al., 2011). We have only found a considerable increase in PSA-NCAM expression in the stratum lacunosum-moleculare of CA1. It is probable that these changes affect mainly O-LM cells, which are interneurons that project specifically to this layer and which morphology and connectivity is particularly regulated by PSA (Guirado et al., 2014). Moreover, changes in the structure of these interneurons and of GAD67 expression in CA1 have been observed in mice subjected to chronic stress (Gilabert-Juan et al., 2017). The presence of higher levels of PSA-NCAM expression in these cells may thus increase their insulation, leading to decreases in dendritic complexity and reduced connectivity (Gomez-Climent et al., 2011). However, in

the CA1 PSA-NCAM is not exclusively associated to inhibitory elements (Gomez-Climent et al., 2011) and, consequently, changes in the expression of this molecule might be also affecting the connectivity of principal neurons.

The other focus of our study was on parvalbumin expressing interneurons and their relationship with PNN. Our results showing an increase in the number of PV expressing neurons in the mPFC or the BLA are apparently in contrast with previous reports describing decreases in prefrontocortical PV+ somata after chronic stress [5 weeks of chronic unpredictable stress (Banasr et al., 2017)], although some were only found in anhedonic animals (9 weeks of chronic mild stress) (Czeh et al., 2018). Another report, using 2 weeks of chronic unpredictable stress or 8 weeks of chronic mild stress, did not find changes in the density of PV+ somata in the mPFC of Wistar rats (Zadrozna et al., 2011). However, in agreement with our results, recent studies with shorter periods (2 weeks) of chronic stress have found significant increases in the number of PV+ cells and PV mRNA in the mPFC of adult female mice and in the density of excitatory puncta on the perisomatic region of PV cells in both sexes (Shepard et al., 2016; Shepard and Coutellier, 2018). Furthermore, Filipovic et al. (2018) and Todorovic et al. (2019) demonstrated that chronic social isolation leads to a decreased number of PV+ cells in the mPFC and hippocampus of adult male Wistar rats.

Additionally, chronic variable stress for 2 weeks in the same rat strain used in our experiment increased the inhibition of mPFC pyramidal cells and the density of inhibitory puncta around the somata of these principal neurons (McKlveen et al., 2016). In contrast with these results, we have failed to find decreases in the density of puncta coexpressing PV and synaptophysin (SYN) in our stressed animals. However, the density of PV-SYN+ puncta decreased markedly, which may indicate a reduction in other type of perisomatic synapses, more likely of those coming from cholecystokinin (CCK) expressing basket interneurons. This is in accordance with the recently found reductions in the number of CCK+ neurons in the mPFC of rats subjected to 9 weeks of chronic mild stress (Czeh et al., 2018).

The variability in the results obtained in our study and the previous ones on the effects of chronic stress on PV+ cells may obey to differences in the rat strain used, the lack of discrimination between different prefrontocortical regions and, particularly, to differences in the duration and nature of the stress protocol employed. It is possible that in animals submitted to shorter stress protocols PV+ interneurons were activated, leading to an increased inhibition on pyramidal neurons. On the other hand, in longer protocols, in which depressive-like behaviors become persistent, these interneurons may show a decrease in their activity and parvalbumin expression. It is also important to note that there is a decrease in excitatory neurotransmission on PV+ interneurons of the mPFC in learned helplessness and that the suppression of the activity of these inhibitory cells promotes the apparition of this depressive-like behavior (Perova et al., 2015). Consequently, the activation of PV+ interneurons in the mPFC in earlier phases of chronic stress may be interpreted as a response to promote the establishment of resilient behaviors, as Shepard and Coutellier (2018), Shepard et al. (2016) and our

own data suggest. In fact, previous reports strongly suggest that the end of the 10 days of restraint coincides with a period in which the behavioral effects of stress are starting to be observed (McLaughlin et al., 2007; Reznikov et al., 2008; Grillo et al., 2015).

Similar to what we have observed in the mPFC, we also found an increase in the number of PV+ cells in the BLA of our stressed rats. Reznikov et al. (2008), using the same stress paradigm employed in the present study did not find changes in the density of PV+ cells in the BLA. This discrepancy may arise from differences in the methodology employed for quantification: We estimated the total number of PV+ interneurons in the whole BLA using a modified version of the fractionator method (West, 1993; Nacher et al., 2002), while cell densities were calculated specifically from the medial-caudal extent of the anterior subdivision of this amygdaloid region (Reznikov et al., 2008). It has to be noted, however, that Reznikov et al. (2008) observed a marked increase in the percentage of PV+ cells displaying *c-Fos* immunoreactivity in their nuclei, which also suggest an activation of these interneurons in this stress protocol.

We do not believe that the increase in PV+ interneurons is due to the incorporations of new cells to the circuitry. We think that the increase in number reflects an increase in the expression of this calcium binding protein and that some interneurons that expressed very low levels of PV (and thus were not detected in control animals), increase their PV expression and become detectable in the stressed animals. A similar switch toward high parvalbumin expression has been observed in the hippocampus after fear conditioning (Donato et al., 2013). Previous results from our laboratory have also described this phenomenon in the infralimbic cortex after social isolation rearing (Castillo-Gomez et al., 2017) or after treatment with a dopamine D2 receptor agonist (Castillo-Gomez et al., 2011). The decrease in the number of PV expressing neurons is not due to a decrease in the volume of the neuropil because for applying the modified version of the fractionator method we calculated the volumes of the areas and found no differences between groups.

There is another report studying the effects of chronic stress on PNN during adulthood, using a social defeat-induced persistent stress (SDPS) in Wistar rats, a very long-lasting protocol, which induces persistent depressive-like behavior (Riga et al., 2017). In this study the authors found a marked increase in the density of PNN in the hippocampal CA1 and specifically of those surrounding PV+ interneurons. These results are in sharp contrast with our present findings in this hippocampal region, where we observe a significant decreased density of PNN. However, we did not find changes in the number of PV+ neurons surrounded by PNN. In fact, we do not observe significant linear correlations between PV+ cells and PNN in the CA1, neither in controls nor in stressed animals, suggesting that the reduction in PNN that we observe may be due to decreases in PNN associated to other cell types, more likely excitatory neurons. Although Riga et al. (2017) found that in Wistar rats more than 90% of PNN in the CA1 were associated to PV+ neurons, and other authors found around 80% in Long-Evans rats (Lensjo et al., 2017), in our study we only found around 60%. Interestingly, although we find positive correlations between the numbers of PV+ interneurons and PNN in the mPFC and the BLA in control

animals, such correlations did not exist in stressed individuals, which suggest that the changes that we observe after stress in the PV subpopulation of interneurons may be independent of the presence of PNN surrounding them.

In the case of the TRN the effects of stress should mainly affect PV+ cells, since these neurons are a large proportion of the cellular constituents of this thalamic nucleus and most, if not all of them, are surrounded by PNN. Our results on this nucleus are particularly interesting because of their robustness and because they clearly show for the first time the involvement of this thalamic region in the response to chronic stress during adulthood. A previous study already highlighted the putative involvement of this nucleus in the response to acute stress, due to an important increase in *c-Fos* expression (Ons et al., 2004). Further research in this region needs to be done to understand how the structure, neurotransmission and connectivity of its neurons is affected by stress.

To our knowledge there is only one study describing PNN in the habenula, focused on their postnatal development in mice (Hori-Hayashi et al., 2015); the present data is the first to describe their presence in adult animals and their modulation by chronic stress. We do not know yet the phenotype of the habenular neurons surrounded by these PNN, but most likely they are excitatory neurons, since interneurons are very rare in this thalamic region (Smith et al., 1987; Li et al., 2011; Meye et al., 2013). The present results support previous work pointing out a prominent role of the habenula in the response to chronic stress (Wirtshafter et al., 1994; Aizawa et al., 2013; Jacinto et al., 2017).

The significance of the increases in PNN numbers that we have found in the present study is still far from clear. It has been proposed that PNN may act by protecting fast spiking neurons from oxidative stress (Cabungcal et al., 2013). Since chronic stress induces high levels of reactive oxygen species (Madrigal et al., 2006), the increases in PNN at this early phase of stress may represent an attempt of the neurons to counteract the effects of this oxidative stress. Studies using longer stress duration are needed to know whether at later stages of chronic stress the numbers of PNN and PV+ cells decrease or return to control levels. Transgenic mice with impaired redox regulation show decreased number of PV+ neurons and PNN in their PFC and TRN (Cabungcal et al., 2013; Steullet et al., 2017). Interestingly, patients suffering from schizophrenia, in which stress is known to be a precipitating factor, also show reductions in the density of PV+ cells and PNN in this two regions (Mauney et al., 2013; Steullet et al., 2017). PNN may also act by influencing synaptic plasticity, constituting a physical barrier to stabilize synaptic contacts or to prevent the formation of new contacts through the expression of inhibitory molecules (Nowicka et al., 2009; Sorg et al., 2016).

In conclusion, our data demonstrate that a short chronic stress can induce changes in molecules involved in interneuronal plasticity, not only in "classical" regions involved in the stress response, but also in the habenula or the TRN, a region in which we have described for the first time alterations induced by this aversive experience. This supports the hypothesis that alterations in inhibitory networks and of molecules involved in

their plasticity, particularly the PNN, underlie the impact of stress in the CNS and may participate in the development of certain psychiatric disorders.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JN, AP, and MG-C designed the experiments. AP, MG-C, CB-F, YC, and HC performed the experiments. AP, RG, and JN wrote the manuscript. JN supervised the experiments and wrote the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Aizawa, H., Cui, W., Tanaka, K., and Okamoto, H. (2013). Hyperactivation of the habenula as a link between depression and sleep disturbance. *Front. Hum. Neurosci.* 7:826. doi: 10.3389/fnhum.2013.00826
- Banasr, M., Lepack, A., Fee, C., Duric, V., Maldonado-Aviles, J., DiLeone, R., et al. (2017). Characterization of GABAergic marker expression in the chronic unpredictable stress model of depression. *Chronic Stress* 1. doi: 10.1177/2470547017720459
- Banerjee, S. B., Gutzeit, V. A., Baman, J., Aoued, H. S., Doshi, N. K., Liu, R. C., et al. (2017). Perineuronal nets in the adult sensory cortex are necessary for fear learning. *Neuron* 95, 169–179.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.007
- Belleau, E. L., Treadway, M. T., and Pizzagalli, D. A. (2018). The impact of stress and major depressive disorder on hippocampal and medial prefrontal cortex morphology. *Biol. Psychiatry* 85, 443–453. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.09.031
- Berretta, S., Pantazopoulos, H., Markota, M., Brown, C., and Batzianouli, E. T. (2015). Losing the sugar coating: potential impact of perineuronal net abnormalities on interneurons in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 167, 18–27. doi: 10.1016/j.schres.2014.12.040
- Cabungcal, J. H., Stellet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., et al. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 9130–9135. doi: 10.1073/pnas.1300454110
- Carulli, D., Pizzorusso, T., Kwok, J. C., Putignano, E., Poli, A., Forostyak, S., et al. (2010). Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* 133(Pt 8), 2331–2347. doi: 10.1093/brain/awq145
- Castillo-Gomez, E., Perez-Rando, M., Belles, M., Gilabert-Juan, J., Llorens, J. V., Carceller, H., et al. (2017). Early social isolation stress and perinatal NMDA receptor antagonist treatment induce changes in the structure and neurochemistry of inhibitory neurons of the adult amygdala and prefrontal cortex. *eNeuro* 4:ENEURO.0034-17.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0034-17.2017
- Castillo-Gomez, E., Varea, E., Blasco-Ibanez, J. M., Crespo, C., and Nacher, J. (2011). Polysialic acid is required for dopamine D2 receptor-mediated plasticity involving inhibitory circuits of the rat medial prefrontal cortex. *PLoS One* 6:e29516. doi: 10.1371/journal.pone.0029516
- Castillo-Gomez, E., Varea, E., Blasco-Ibanez, J. M., Crespo, C., and Nacher, J. (2016). Effects of chronic dopamine D2R agonist treatment and polysialic acid depletion on dendritic spine density and excitatory neurotransmission in the mPFC of adult rats. *Neural Plast.* 2016:1615363. doi: 10.1155/2016/1615363
- Czeh, B., Simon, M., van der Hart, M. G., Schmelting, B., Hesselink, M. B., and Fuchs, E. (2005). Chronic stress decreases the number of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus: prevention by treatment with a substance P receptor (NK1) antagonist. *Neuropsychopharmacology* 30, 67–79. doi: 10.1038/sj.npp.1300581
- Czeh, B., Vardya, I., Varga, Z., Febraro, F., Csabai, D., Martis, L. S., et al. (2018). Long-term stress disrupts the structural and functional integrity of GABAergic neuronal networks in the medial prefrontal cortex of rats. *Front. Cell. Neurosci.* 12:148. doi: 10.3389/fncel.2018.00148
- Czeh, B., Varga, Z. K., Henningsen, K., Kovacs, G. L., Miseta, A., and Wiborg, O. (2015). Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences. *Hippocampus* 25, 393–405. doi: 10.1002/hipo.22382
- Di Cristo, G., Chattopadhyaya, B., Kuhlman, S. J., Fu, Y., Belanger, M. C., Wu, C. Z., et al. (2007). Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat. Neurosci.* 10, 1569–1577. doi: 10.1038/nn2008
- Donato, F., Rompani, S. B., and Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* 504, 272–276. doi: 10.1038/nature12866
- Drevets, W. C., Price, J. L., and Furey, M. L. (2008). Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct. Funct.* 213, 93–118. doi: 10.1007/s00429-008-0189-x
- Filipovic, D., Stanisavljevic, A., Jasic, N., Bernardi, R. E., Inta, D., Peric, I., et al. (2018). Chronic treatment with fluoxetine or clozapine of socially isolated rats prevents subsector-specific reduction of parvalbumin immunoreactive cells in the hippocampus. *Neuroscience* 371, 384–394. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.12.020
- Gilabert-Juan, J., Bueno-Fernandez, C., Castillo-Gomez, E., and Nacher, J. (2017). Reduced interneuronal dendritic arborization in CA1 but not in CA3 region of mice subjected to chronic mild stress. *Brain Behav.* 7:e00534. doi: 10.1002/brb3.534
- Gilabert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Guirado, R., Molto, M. D., and Nacher, J. (2013). Chronic stress alters inhibitory networks in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Brain Struct. Funct.* 218, 1591–1605. doi: 10.1007/s00429-012-0479-1
- Gilabert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Perez-Rando, M., Molto, M. D., and Nacher, J. (2011). Chronic stress induces changes in the structure of interneurons and in the expression of molecules related to neuronal structural plasticity and inhibitory neurotransmission in the amygdala of adult mice. *Exp. Neurol.* 232, 33–40. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.07.009
- Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., and Herry, C. (2009). Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science* 325, 1258–1261. doi: 10.1126/science.1174146
- Gomez-Climent, M. A., Guirado, R., Castillo-Gomez, E., Varea, E., Gutierrez-Mecinas, M., Gilabert-Juan, J., et al. (2011). The polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) is expressed in a subpopulation of mature cortical interneurons characterized by reduced structural features and connectivity. *Cereb. Cortex* 21, 1028–1041. doi: 10.1093/cercor/bhq177
- Grillo, C. A., Risher, M., Macht, V. A., Bumgardner, A. L., Hang, A., Gabriel, C., et al. (2015). Repeated restraint stress-induced atrophy of glutamatergic pyramidal neurons and decreases in glutamatergic efflux in the rat amygdala are prevented by the antidepressant agomelatine. *Neuroscience* 284, 430–443. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.047
- Guirado, R., Perez-Rando, M., Sanchez-Matarredona, D., Castillo-Gomez, E., Liberia, T., Rovira-Esteban, L., et al. (2014). The dendritic spines of interneurons are dynamic structures influenced by PSA-NCAM expression. *Cereb. Cortex* 24, 3014–3024. doi: 10.1093/cercor/bht156

FUNDING

AP work was conducted during a scholarship supported by the International Cooperation Program CAPES at the University of Valencia. Financed by CAPES – Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education within the Ministry of Education of Brazil. This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Competitiveness and Universities Project to JN (SAF2015-68436-R), Predoctoral fellowships to HC (FPU15/01233), YC (FPU13/04764) and postdoctoral fellowship “Juan de la Cierva” to RG.

- Gundersen, H. J., and Jensen, E. B. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* 147(Pt 3), 229–263. doi: 10.1111/j.1365-2818.1987.tb02837.x
- Hartig, W., Brauer, K., and Bruckner, G. (1992). Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport* 3, 869–872. doi: 10.1097/00001756-199210000-00012
- Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., Matsunaga, W., and Nishi, M. (2015). Development and structural variety of the chondroitin sulfate proteoglycans-contained extracellular matrix in the mouse brain. *Neural Plast.* 2015:256389. doi: 10.1155/2015/256389
- Jacinto, L. R., Mata, R., Novais, A., Marques, F., and Sousa, N. (2017). The habenula as a critical node in chronic stress-related anxiety. *Exp. Neurol.* 289, 46–54. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.12.003
- Lenz, K. K., Christensen, A. C., Tennoe, S., Fyhn, M., and Hafting, T. (2017). Differential expression and cell-type specificity of perineuronal nets in hippocampus, medial entorhinal cortex, and visual cortex examined in the rat and mouse. *eNeuro* 4:ENEURO.0379-16.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0379-16.2017
- Li, B., Piriz, J., Mirrione, M., Chung, C., Proulx, C. D., Schulz, D., et al. (2011). Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature* 470, 535–539. doi: 10.1038/nature09742
- Madrigal, J. L., Garcia-Bueno, B., Caso, J. R., Perez-Nievas, B. G., and Leza, J. C. (2006). Stress-induced oxidative changes in brain. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5, 561–568. doi: 10.2174/187152706778559327
- Mauney, S. A., Athanas, K. M., Pantazopoulos, H., Shaskan, N., Passeri, E., Berretta, S., et al. (2013). Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 74, 427–435. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.05.007
- McEwen, B. S. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 886, 172–189. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02950-4
- McKlveen, J. M., Morano, R. L., Fitzgerald, M., Zoubovsky, S., Cassella, S. N., Scheimann, J. R., et al. (2016). Chronic stress increases prefrontal inhibition: a mechanism for stress-induced prefrontal dysfunction. *Biol. Psychiatry* 80, 754–764. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.03.2101
- McLaughlin, K. J., Gomez, J. L., Baran, S. E., and Conrad, C. D. (2007). The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Res.* 1161, 56–64. doi: 10.1016/j.brainres.2007.05.042
- Meye, F. J., Lecca, S., Valentinova, K., and Mamei, M. (2013). Synaptic and cellular profile of neurons in the lateral habenula. *Front. Hum. Neurosci.* 7:860. doi: 10.3389/fnhum.2013.00860
- Nacher, J., Alonso-Llosa, G., Rosell, D., and McEwen, B. (2002). PSA-NCAM expression in the piriform cortex of the adult rat. Modulation by NMDA receptor antagonist administration. *Brain Res.* 927, 111–121. doi: 10.1016/s0006-8993(01)03241-3
- Nacher, J., Guirado, R., and Castillo-Gomez, E. (2013). Structural plasticity of interneurons in the adult brain: role of PSA-NCAM and implications for psychiatric disorders. *Neurochem. Res.* 38, 1122–1133. doi: 10.1007/s11064-013-0977-4
- Nowicka, D., Soulsby, S., Skangiel-Kramska, J., and Glazewski, S. (2009). Parvalbumin-containing neurons, perineuronal nets and experience-dependent plasticity in murine barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 30, 2053–2063. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06996.x
- Ons, S., Marti, O., and Armario, A. (2004). Stress-induced activation of the immediate early gene Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: relationship to c-fos mRNA. *J. Neurochem.* 89, 1111–1118. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02396.x
- Pantazopoulos, H., and Berretta, S. (2016). In sickness and in health: perineuronal nets and synaptic plasticity in psychiatric disorders. *Neural Plast.* 2016:9847696. doi: 10.1155/2016/9847696
- Paxinos, G., and Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic Press. doi: 10.4236/pp.2011.24049
- Perova, Z., Delevich, K., and Li, B. (2015). Depression of excitatory synapses onto parvalbumin interneurons in the medial prefrontal cortex in susceptibility to stress. *J. Neurosci.* 35, 3201–3206. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2670-14.2015
- Pesarico, A. P., Rosa, S. G., Martini, F., Goulart, T. A., Zeni, G., and Nogueira, C. W. (2017). Brain-derived neurotrophic factor signaling plays a role in resilience to stress promoted by isoquinoline in defeated mice. *J. Psychiatr. Res.* 94, 78–87. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.06.012
- Radley, J., Morilak, D., Viau, V., and Campeau, S. (2015). Chronic stress and brain plasticity: mechanisms underlying adaptive and maladaptive changes and implications for stress-related CNS disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 58, 79–91. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.06.018
- Reznikov, L. R., Reagan, L. P., and Fadel, J. R. (2008). Activation of phenotypically distinct neuronal subpopulations in the anterior subdivision of the rat basolateral amygdala following acute and repeated stress. *J. Comp. Neurol.* 508, 458–472. doi: 10.1002/cne.21687
- Riga, D., Kramvis, I., Koskinen, M. K., van Bokhoven, P., van der Harst, J. E., Heistek, T. S., et al. (2017). Hippocampal extracellular matrix alterations contribute to cognitive impairment associated with a chronic depressive-like state in rats. *Sci. Transl. Med.* 9:eaa18753. doi: 10.1126/scitranslmed.aa18753
- Roosendaal, B., McEwen, B. S., and Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 423–433. doi: 10.1038/nrn2651
- Sachs, B. D., Tran, H. L., Folse, E., and Caron, M. G. (2018). Brain-region-specific molecular responses to maternal separation and social defeat stress in mice. *Neuroscience* 373, 122–136. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.018
- Sandi, C. (2004). Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 917–930. doi: 10.1038/nrn1555
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Shepard, R., and Coutellier, L. (2018). Changes in the prefrontal glutamatergic and parvalbumin systems of mice exposed to unpredictable chronic stress. *Mol. Neurobiol.* 55, 2591–2602. doi: 10.1007/s12035-017-0528-0
- Shepard, R., Page, C. E., and Coutellier, L. (2016). Sensitivity of the prefrontal GABAergic system to chronic stress in male and female mice: relevance for sex differences in stress-related disorders. *Neuroscience* 332, 1–12. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.038
- Smith, Y., Seguela, P., and Parent, A. (1987). Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the thalamus of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Neuroscience* 22, 579–591. doi: 10.1016/0306-4522(87)90355-1
- Soleman, S., Filippov, M. A., Dityatev, A., and Fawcett, J. W. (2013). Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience* 253, 194–213. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.050
- Sorg, B. A., Berretta, S., Blacktop, J. M., Fawcett, J. W., Kitagawa, H., Kwok, J. C., et al. (2016). Casting a wide net: role of perineuronal nets in neural plasticity. *J. Neurosci.* 36, 11459–11468. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2351-16.2016
- Stullet, P., Cabungcal, J. H., Bukhari, S. A., Ardel, M. I., Pantazopoulos, H., Hamati, F., et al. (2017). The thalamic reticular nucleus in schizophrenia and bipolar disorder: role of parvalbumin-expressing neuron networks and oxidative stress. *Mol. Psychiatry* 23, 2057–2065. doi: 10.1038/mp.2017.230
- Todorovic, N., Micic, B., Schwirtlich, M., Stevanovic, M., and Filipovic, D. (2019). Subregion-specific protective effects of fluoxetine and clozapine on parvalbumin expression in medial prefrontal cortex of chronically isolated rats. *Neuroscience* 396, 24–35. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.11.008
- Ueno, H., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Matsumoto, Y., et al. (2018). Juvenile stress induces behavioral change and affects perineuronal net formation in juvenile mice. *BMC Neurosci.* 19:41. doi: 10.1186/s12868-018-0442-z
- Varea, E., Blasco-Ibanez, J. M., Gomez-Climent, M. A., Castillo-Gomez, E., Crespo, C., Martinez-Guijarro, F. J., et al. (2007). Chronic fluoxetine treatment increases the expression of PSA-NCAM in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 32, 803–812. doi: 10.1038/sj.npp.1301183
- Varea, E., Guirado, R., Gilbert-Juan, J., Marti, U., Castillo-Gomez, E., Blasco-Ibanez, J. M., et al. (2012). Expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the amygdala of psychiatric disorder patients. *J. Psychiatr. Res.* 46, 189–197. doi: 10.1016/j.jpsychires.2011.10.011

- West, M. J. (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol. Aging* 14, 275–285. doi: 10.1016/0197-4580(93)90112-o
- Wirtshafter, D., Asin, K. E., and Pitzer, M. R. (1994). Dopamine agonists and stress produce different patterns of Fos-like immunoreactivity in the lateral habenula. *Brain Res.* 633, 21–26. doi: 10.1016/0006-8993(94)91517-2
- Zadrozna, M., Nowak, B., Lason-Tyburkiewicz, M., Wolak, M., Sowa-Kucma, M., Papp, M., et al. (2011). Different pattern of changes in calcium binding proteins immunoreactivity in the medial prefrontal cortex of rats exposed to stress models of depression. *Pharmacol. Rep.* 63, 1539–1546. doi: 10.1016/s1734-1140(11)70718-6

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Pesarico, Bueno-Fernandez, Guirado, Gómez-Climent, Curto, Carceller and Nacher. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

VI. BIBLIOGRAFIA

- A. Pitkänen. 2000. The amygdala: a functional analysis. Connectivity of the rat amygdaloid complex [WWW Document]. Oxford Univ Press. URL https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The+Amygdala:+A+Functional+Analysis&author=A.+Pitkänen&publication_year=2000&
- Acsády L, Arabadzisz D, Freund TF. 1996. Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience*. 73:299–315.
- Aguilera G. 2011. HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging. *Exp Gerontol*. 46:90–95.
- Aizawa H, Amo R, Okamoto H. 2011. Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Front Neurosci*. 5.
- Aizawa H, Cui W, Tanaka K, Okamoto H. 2013. Hyperactivation of the habenula as a link between depression and sleep disturbance. *Front Hum Neurosci*. 7.
- Alcaide J, Guirado R, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Varea E, Sanjuan J, Nacher J. 2019. Alterations of perineuronal nets in the dorsolateral prefrontal cortex of neuropsychiatric patients. *Int J Bipolar Disord*. 7.
- Alpár A, Gärtner U, Härtig W, Brückner G. 2006. Distribution of pyramidal cells associated with perineuronal nets in the neocortex of rat. *Brain Res*. 1120:13–22.
- Arnsten AFT. 2015. Stress weakens prefrontal networks: molecular insults to higher cognition. *Nat Neurosci*. 18:1376–1385.
- Aronsson M, Fuxe K, Dong Y, Agnati LF, Okret S, Gustafsson JA. 1988. Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:9331–9335.
- Arslan-Ergul A, Ozdemir AT, Adams MM. 2013. Aging, neurogenesis, and caloric restriction in different model organisms. *Aging Dis*. 4:221–232.
- Avital A, Richter-Levin G. 2005. Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat. *Int J Neuropsychopharmacol*. 8:163–173.
- Ball WS, Byars AW, Schapiro M, Bommer W, Carr A, German A, Dunn S, Rivkin MJ, Waber D, Mulkern R, Vajapeyam S, Chiverton A, Davis P, Koo J, Marmor J, Mrakotsky C, Robertson R, McAnulty G, Brandt ME, Fletcher JM, Kramer LA, Yang G, McCormack C, Hebert KM, Volero H, Botteron K, McKinstry RC, Warren W, Nishino T, Almli CR, Todd R, Constantino J, McCracken JT, Levitt J, Alger J, O’Neill J, Toga A, Asarnow R, Fadale D, Heinichen L, Ireland C, Wang DJ, Moss E, Zimmerman RA, Bintliff B, Bradford R, Newman J, Evans AC, Arnaoutelis R, Pike GB, Collins DL, Leonard G, Paus T, Zijdenbos A, Das S, Fonov V, Fu L, Harlap J, Leppert I, Milovan D, Vins D, Zeffiro T, Van Meter J, Lange N, Froimowitz MP, Botteron K, Almli C, Rainey C, Henderson S, Nishino T, Warren W, Edwards JL, Dubois D, Smith K, Singer T, Wilber AA, Pierpaoli C, Basser PJ, Chang LC, Walker L, Freund L, Rumsey J, Baskir L, Stanford L, Sirocco K, Gwinn-Hardy K, Spinella G, McCracken JT, Alger JR, Levitt J, O’Neill J. 2012. Total and regional brain volumes in a population-based normative sample from 4 to 18 years: The NIH MRI study of normal brain development. *Cereb Cortex*. 22:1–12.
- Banasr M, Lepack A, Fee C, Duric V, Maldonado-Aviles J, DiLeone R, Sibille E, Duman RS, Sanacora G.

2017. Characterization of GABAergic Marker Expression in the Chronic Unpredictable Stress Model of Depression. *Chronic Stress*. 1:247054701772045.
- Banerjee SB, Gutzeit VA, Baman J, Aoued HS, Doshi NK, Liu RC, Ressler KJ. 2017. Perineuronal Nets in the Adult Sensory Cortex Are Necessary for Fear Learning. *Neuron*. 95:169-179.e3.
- Bangasser DA, Valentino RJ. 2014. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives. *Front Neuroendocrinol*. 35:303–319.
- Bechara A, Damasio H, Damasio AR. 2000. Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex*. 10:295–307.
- Beck DA, Koenig HG, Beck JS. 1998. Depression. *Clin Geriatr Med*.
- Belleau EL, Treadway MT, Pizzagalli DA. 2019. The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. *Biol Psychiatry*. 85:443–453.
- Benes FM, Berretta S. 2001. GABAergic interneurons: Implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 25:1–27.
- Bernard C. 1855. *Leçons de physiologie expérimentale appliquée à la médecine*.
- Berretta S, Pantazopoulos H, Markota M, Brown C, Batzianouli ET. 2015. Losing the sugar coating: Potential impact of perineuronal net abnormalities on interneurons in schizophrenia. *Schizophr Res*. 167:18–27.
- Bizon JL, Helm KA, Han JS, Chun HJ, Pucilowska J, Lund PK, Gallagher M. 2001. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats. *Eur J Neurosci*. 14:1739–1751.
- Bloss EB, Janssen WG, McEwen BS, Morrison JH. 2010. Interactive effects of stress and aging on structural plasticity in the prefrontal cortex. *J Neurosci*. 30:6726–6731.
- Bloss EB, Janssen WG, Ohm DT, Yuk FJ, Wadsworth S, Saardi KM, McEwen BS, Morrison JH. 2011. Evidence for reduced experience-dependent dendritic spine plasticity in the aging prefrontal cortex. *J Neurosci*. 31:7831–7839.
- Breach MR, Moench KM, Wellman CL. 2019. Social instability in adolescence differentially alters dendritic morphology in the medial prefrontal cortex and its response to stress in adult male and female rats. *Dev Neurobiol*. 79:839–856.
- Brenhouse HC, Andersen SL. 2011. Developmental trajectories during adolescence in males and females: A cross-species understanding of underlying brain changes. *Neurosci Biobehav Rev*. 35:1687–1703.
- Brivio E, Lopez JP, Chen A. 2020. Sex differences: Transcriptional signatures of stress exposure in male and female brains. *Genes, Brain Behav*. 19.
- Brown VJ, Bowman EM. 2002. Rodent models of prefrontal cortical function. *Trends Neurosci*. 25:340–343.
- Brückner G, Brauer K, Härtig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH, Reichenbach A. 1993. Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of

- microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia*. 8:183–200.
- Bukalo O, Schachner M, Dityatev A. 2007. Hippocampal metaplasticity induced by deficiency in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *J Neurosci*. 27:6019–6028.
- Caballero A, Tseng KY. 2016. GABAergic Function as a Limiting Factor for Prefrontal Maturation during Adolescence. *Trends Neurosci*. 39:441–448.
- Cabungcal JH, Steullet P, Morishita H, Kraftsik R, Cuenod M, Hensch TK, Do KQ. 2013. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:9130–9135.
- Caligioni CS. 2009. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*.
- Campos AC, Fogaça M V., Aguiar DC, Guimarães FS. 2013. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev Bras Psiquiatr*. 35:S101–S111.
- Carlén M. 2017. What constitutes the prefrontal cortex? *Science* (80-). 358:478–482.
- Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JCF, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT, Fawcett JW. 2010. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain*. 133:2331–2347.
- Castillo-Gómez E, Pérez-Rando M, Bellés M, Gilabert-Juan J, Llorens JV, Carceller H, Bueno-Fernández C, García-Mompó C, Ripoll-Martínez B, Curto Y, Sebastiá-Ortega N, Moltó MD, Sanjuan J, Nacher J. 2017. Early social isolation stress and perinatal nmda receptor antagonist treatment induce changes in the structure and neurochemistry of inhibitory neurons of the adult amygdala and prefrontal cortex. *eNeuro*. 4.
- Castillo-Gómez E, Varea E, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Nacher J. 2011. Polysialic acid is required for dopamine D2 receptor-mediated plasticity involving inhibitory circuits of the rat medial prefrontal cortex. *PLoS One*. 6.
- Castillo-Gómez E, Varea E, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Nacher J. 2016. Effects of chronic dopamine D2R agonist treatment and polysialic acid depletion on dendritic spine density and excitatory neurotransmission in the mPFC of adult rats. *Neural Plast*.
- Chidambaram SB, Rathipriya AG, Bolla SR, Bhat A, Ray B, Mahalakshmi AM, Manivasagam T, Thenmozhi AJ, Essa MM, Guillemain GJ, Chandra R, Sakharkar MK. 2019. Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 92:161–193.
- Chmielarz P, Kreiner G, Kuśmierczyk J, Kowalska M, Roman A, Tota K, Nalepa I. 2016. Depressive-like immobility behavior and genotype × stress interactions in male mice of selected strains. *Stress*. 19:206–213.
- Chocyk A, Majcher-Maoelanka I, Dudys D, Przyborowska A, Wêdzony K. 2013. Impact of early-life stress on the medial prefrontal cortex functions—a search for the pathomechanisms of anxiety and mood disorders. *Pharmacol Reports*. 65:1462–1470.
- Chohan TW, Nguyen A, Todd SM, Bennett MR, Callaghan P, Arnold JC. 2014. Partial genetic deletion of neuregulin 1 and adolescent stress interact to alter NMDA receptor binding in the medial prefrontal cortex. *Front Behav Neurosci*. 8.

- Choi K, Le T, McGuire J, Xing G, Zhang L, Li H, Parker CC, Johnson LR, Ursano RJ. 2012. Expression pattern of the cannabinoid receptor genes in the frontal cortex of mood disorder patients and mice selectively bred for high and low fear. *J Psychiatr Res.* 46:882–889.
- Christian KM, Miracle AD, Wellman CL, Nakazawa K. 2011. Chronic stress-induced hippocampal dendritic retraction requires CA3 NMDA receptors. *Neuroscience.* 174:26–36.
- Clarke DJ, Chohan TW, Kassem MS, Smith KL, Chesworth R, Karl T, Kuligowski MP, Fok SY, Bennett MR, Arnold JC. 2019. Neuregulin 1 Deficiency Modulates Adolescent Stress-Induced Dendritic Spine Loss in a Brain Region-Specific Manner and Increases Complement 4 Expression in the Hippocampus. *Schizophr Bull.* 45:339–349.
- Concha ML, Wilson SW. 2001. Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J Anat.* 199:63–84.
- Conrad CD, LeDoux JE, Magariños AM, McEwen BS. 1999. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci.* 113:902–913.
- Cook SC, Wellman CL. 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol.* 60:236–248.
- Csabai D, Seress L, Varga Z, Ábrahám H, Miseta A, Wiborg O, Czéh B. 2017. Electron Microscopic Analysis of Hippocampal Axo-Somatic Synapses in a Chronic Stress Model for Depression. *Hippocampus.* 27:17–27.
- Csabai D, Wiborg O, Czéh B. 2018. Reduced synapse and axon numbers in the prefrontal cortex of rats subjected to a chronic stress model for depression. *Front Cell Neurosci.* 12.
- Czéh B, Fuchs E, Wiborg O, Simon M. 2016. Animal models of major depression and their clinical implications. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 64:293–310.
- Czeh B, Simon M, Van Der Hart MGC, Schmelting B, Hesselink MB, Fuchs E. 2005. Chronic stress decreases the number of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus: Prevention by treatment with a substance P receptor (NK1) antagonist. *Neuropsychopharmacology.* 30:67–79.
- Czéh B, Vardya I, Varga Z, Febraro F, Csabai D, Martis LS, Højgaard K, Henningsen K, Bouzinova E V., Miseta A, Jensen K, Wiborg O. 2018. Long-term stress disrupts the structural and functional integrity of GABAergic neuronal networks in the medial prefrontal cortex of rats. *Front Cell Neurosci.* 12.
- Czéh B, Varga Z, Henningsen K, Kovács GL, Miseta A, Wiborg O. 2015. Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences. *Hippocampus.* 25:393–405.
- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW. 2004. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev.* 28:771–784.
- Dalm S, Enthoven L, Meijer OC, Van Der Mark MH, Karssen AM, De Kloet ER, Oitzl MS. 2005. Age-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male C57BL/6J mice. *Neuroendocrinology.* 81:372–380.
- Dauth S, Grevesse T, Pantazopoulos H, Campbell PH, Maoz BM, Berretta S, Parker KK. 2016.

- Extracellular matrix protein expression is brain region dependent. *J Comp Neurol.* 524:1309–1336.
- Davis MT, Holmes SE, Pietrzak RH, Esterlis I. 2017. Neurobiology of Chronic Stress-Related Psychiatric Disorders: Evidence from Molecular Imaging Studies. *Chronic Stress.* 1:1-21.
- de Araújo Costa Folha OA, Bahia CP, de Aguiar GPS, Herculano AM, Coelho NLG, de Sousa MBC, Shiramizu VKM, de Menezes Galvão AC, de Carvalho WA, Pereira A. 2017. Effect of chronic stress during adolescence in prefrontal cortex structure and function. *Behav Brain Res.* 326:44–51.
- de Biasi S, Frassoni C, Spreafico R. 1986. GABA immunoreactivity in the thalamic reticular nucleus of the rat. A light and electron microscopical study. *Brain Res.* 399:143–147.
- De Luca C, Papa M. 2016. Looking Inside the Matrix: Perineuronal Nets in Plasticity, Maladaptive Plasticity and Neurological Disorders. *Neurochem Res.* 41:1507–1515.
- Dembrow NC, Zemelman B V., Johnston D. 2015. Temporal dynamics of I5 dendrites in medial prefrontal cortex regulate integration versus coincidence detection of afferent inputs. *J Neurosci.* 35:4501–4514.
- Di Cristo G, Chattopadhyaya B, Kuhlman SJ, Fu Y, Bélanger M-CC, Wu CZ, Rutishauser U, Maffei L, Huang ZJ. 2007. Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat Neurosci.* 10:1569–1577.
- Diester CM, Banks ML, Neigh GN, Negus SS. 2019. Experimental design and analysis for consideration of sex as a biological variable. *Neuropsychopharmacology.* 44:2159–2162.
- Dixon ML, Thiruchselvam R, Todd R, Christoff K. 2017. Emotion and the prefrontal cortex: An integrative review. *Psychol Bull.* 143:1033–1081.
- Djordjevic A, Adzic M, Djordjevic J, Radojic MB. 2010. Chronic social isolation suppresses proplastic response and promotes proapoptotic signalling in prefrontal cortex of Wistar rats. *J Neurosci Res.* 88:2524–2533.
- Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Radojic MB. 2012. Effects of chronic social isolation on wistar rat behavior and brain plasticity markers. *Neuropsychobiology.* 66:112–119.
- Donato F, Rompani SB, Caroni P. 2013. Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature.* 504:272–276.
- Drevets WC, Price JL, Furey ML. 2008. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: Implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct.* 213:93–118.
- Ducottet C, Belzung C. 2004. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiol Behav.* 81:417–426.
- Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciochi S, Herry C, Lüthi A. 2009. Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron.* 62:757–771.
- Eid RS, Gobinath AR, Galea LAM. 2019. Sex differences in depression: Insights from clinical and preclinical studies. *Prog Neurobiol.* 176:86–102.

- Eiland L, Ramroop J, Hill MN, Manley J, McEwen BS. 2012. Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 37:39–47.
- Esclapez M, Tillakaratne NJK, Kaufman DL, Tobin AJ, Houser CR. 1994. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci*. 14:1834–1855.
- Farrell MR, Holland FH, Shansky RM, Brenhouse HC. 2016. Sex-specific effects of early life stress on social interaction and prefrontal cortex dendritic morphology in young rats. *Behav Brain Res*. 310:119–125.
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR. 2000. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*. 28:41–51.
- Ferguson BR, Gao WJ. 2018. PV interneurons: critical regulators of E/I balance for prefrontal cortex-dependent behavior and psychiatric disorders. *Front Neural Circuits*. 12:37.
- Ferrarelli F, Tononi G. 2011. The thalamic reticular nucleus and schizophrenia. *Schizophr Bull*. 37:306–315.
- Figueiredo HF, Ulrich-Lai YM, Choi DC, Herman JP. 2007. Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 292:E1173-E1182.
- Filipović D, Stanisavljević A, Jasnić N, Bernardi RE, Inta D, Perić I, Gass P. 2018. Chronic Treatment with Fluoxetine or Clozapine of Socially Isolated Rats Prevents Subsector-Specific Reduction of Parvalbumin Immunoreactive Cells in the Hippocampus. *Neuroscience*. 371:384–394.
- Foggetti A, Baccini G, Arnold P, Schiffelholz T, Wulff P. 2019. Spiny and Non-spiny Parvalbumin-Positive Hippocampal Interneurons Show Different Plastic Properties. *Cell Rep*. 27:3725-3732.e5.
- Forrest MP, Parnell E, Penzes P. 2018. Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci*. 19:215–234.
- Fremeau RT, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH. 2002. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:14488–14493.
- Freund TF. 2003. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci*. 26:489–495.
- Freund TF, Buzsáki G. 1996. Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus*. 6:347–470.
- Fu M, Zuo Y. 2011. Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends Neurosci*. 34:177–187.
- Fuchs E, Flügge G. 2003. Chronic social stress: Effects on limbic brain structures. *Physiol Behav*. 79:417–427.
- Fuster JM. 2002. Frontal lobe and cognitive development. *J Neurocytol*. 31:373–385.

- Garrett JE, Wellman CL. 2009. Chronic stress effects on dendritic morphology in medial prefrontal cortex: sex differences and estrogen dependence. *Neuroscience*. 162:195–207.
- Gerardo CM, Manuel MMV. 2020. The thalamic reticular nucleus: A common nucleus of neuropsychiatric diseases and deep brain stimulation. *J Clin Neurosci*. 73:1–7.
- Gilabert-Juan J, Bueno-Fernandez C, Castillo-Gomez E, Nacher J. 2017. Reduced interneuronal dendritic arborization in CA1 but not in CA3 region of mice subjected to chronic mild stress. *Brain Behav*. 7.
- Gilabert-Juan J, Castillo-Gomez E, Guirado R, Moltó MD, Nacher J. 2013. Chronic stress alters inhibitory networks in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Brain Struct Funct*. 218:1591-1605.
- Gilabert-Juan J, Castillo-Gomez E, Pérez-Rando M, Moltó MD, Nacher J. 2011. Chronic stress induces changes in the structure of interneurons and in the expression of molecules related to neuronal structural plasticity and inhibitory neurotransmission in the amygdala of adult mice. *Exp Neurol*. 232:33–40.
- Gildawie KR, Honeycutt JA, Brenhouse HC. 2020. Region-specific Effects of Maternal Separation on Perineuronal Net and Parvalbumin-expressing Interneuron Formation in Male and Female Rats. *Neuroscience*. 428:23–37.
- Gogolla N, Caroni P, Lüthi A, Herry C. 2009. Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science*. 325:1258–1261.
- Goldwater DS, Pavlides C, Hunter RG, Bloss EB, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2009. Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. *Neuroscience*. 164:798–808.
- Golgi C. 1903. *Opera omnia: Vol.1 Istologia normale (1870-1883) Vol. 2 Istologia normale (1883-1902) Vol. 3 Patologia hererale e Isto-patologia (1868-1894)*, Antiquariat Botanicum, ABAA.
- Gómez-Climent MÁ, Guirado R, Castillo-Gómez E, Varea E, Gutierrez-Mecinas M, Gilabert-Juan J, García-Mompó C, Vidueira S, Sanchez-Mataredona D, Hernández S, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Rutishauser U, Schachner M, Nacher J. 2011. The polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) is expressed in a subpopulation of mature cortical interneurons characterized by reduced structural features and connectivity. *Cereb Cortex*. 21:1028-1041.
- Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A. 2008. Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat*. 1:3.
- Gourley SL, Swanson AM, Koleske AJ. 2013. Corticosteroid-induced neural remodeling predicts behavioral vulnerability and resilience. *J Neurosci*. 33:3107–3112.
- Granon S, Poucet B. 2000. Involvement of the rat prefrontal cortex in cognitive functions: A central role for the prelimbic area. *Psychobiology*. 28:229–237.
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. 2002. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci*. 22:5442–5451.
- Grillo CA, Risher M, Macht VA, Bumgardner AL, Hang A, Gabriel C, Mocaër E, Piroli GG, Fadel JR,

- Reagan LP. 2015. Repeated restraint stress-induced atrophy of glutamatergic pyramidal neurons and decreases in glutamatergic efflux in the rat amygdala are prevented by the antidepressant agomelatine. *Neuroscience*. 284:430–443.
- Gruber D, Gilling KE, Albrecht A, Bartsch JC, Çalişkan G, Richter-Levin G, Stork O, Heinemann U, Behr J. 2015. 5-HT receptor-mediated modulation of granule cell inhibition after juvenile stress recovers after a second exposure to adult stress. *Neuroscience*. 293:67–79.
- Guirado R, Carceller H, Castillo-Gómez E, Castrén E, Nacher J. 2018. Automated analysis of images for molecular quantification in immunohistochemistry. *Heliyon*. 4.
- Guirado R, Perez-Rando M, Ferragud A, Gutierrez-Castellanos N, Umemori J, Carceller H, Nacher J, Castillo-Gómez E. 2020. A Critical Period for Prefrontal Network Configurations Underlying Psychiatric Disorders and Addiction. *Front Behav Neurosci*. 14:51.
- Guirado R, Perez-Rando M, Sanchez-Matarredona D, Castillo-Gómez E, Liberia T, Rovira-Esteban L, Varea E, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Nacher J. 2014. The dendritic spines of interneurons are dynamic structures influenced by PSA-NCAM expression. *Cereb Cortex*. 24:3014–3024.
- Guirado R, Perez-Rando M, Sanchez-Matarredona D, Castrén E, Nacher J. 2014. Chronic fluoxetine treatment alters the structure, connectivity and plasticity of cortical interneurons. *Int J Neuropsychopharmacol*. 17:1635–1646.
- Gulyás AI, Hájos N, Freund TF. 1996. Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 16:3397–3411.
- Gundersen HJG, Jensen EB. 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 147:229–263.
- Hammen C. 2005. Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol*. 1:293–319.
- Härtig W, Brauer K, Brückner G. 1992. Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport*. 3:869–872.
- Heim C, Nemeroff CB. 2001. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: Preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry*. 49:1023–1039.
- Hendry SH, Schwark HD, Jones EG, Yan J. 1987. Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J Neurosci*. 7:1503–1519.
- Herkenham M, Nauta WJH. 1977. Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *J Comp Neurol*. 173:123–145.
- Herkenham M, Nauta WJH. 1979. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 187:19–47.
- Herman JP. 1998. Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci*. 18:5938–5947.
- Hika B, Al Khalili Y. 2020. *Neuronatomy, Prefrontal Association Cortex*, StatPearls. StatPearls Publishing.

- Hikosaka O. 2010. The habenula: From stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci.* 11:503–513.
- Hill MN, Carrier EJ, McLaughlin RJ, Morrish AC, Meier SE, Hillard CJ, Gorzalka BB. 2008. Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: Effects of concurrent antidepressant treatment. *J Neurochem.* 106:2322–2336.
- Hill MN, Hellemans KGC, Verma P, Gorzalka BB, Weinberg J. 2012. Neurobiology of chronic mild stress: Parallels to major depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 36:2085–2117.
- Hodes GE, Epperson CN. 2019. Sex Differences in Vulnerability and Resilience to Stress Across the Life Span. *Biol Psychiatry.* 86:421–432.
- Hollis F, Isgor C, Kabbaj M. 2013. The consequences of adolescent chronic unpredictable stress exposure on brain and behavior. *Neuroscience.* 249:232–241.
- Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W, Nishi M. 2015. Development and Structural Variety of the Chondroitin Sulfate Proteoglycans-Contained Extracellular Matrix in the Mouse Brain. *Neural Plast.*
- Horváth HR, Fazekas CL, Balázsfi D, Jain SK, Haller J, Zelena D. 2018. Contribution of Vesicular Glutamate Transporters to Stress Response and Related Psychopathologies: Studies in VGLUT3 Knockout Mice. *Cell Mol Neurobiol.* 38:37–52.
- Hu W, Zhang M, Czéh B, Flügge G, Zhang W. 2010. Stress impairs GABAergic network function in the hippocampus by activating nongenomic glucocorticoid receptors and affecting the integrity of the parvalbumin-expressing neuronal network. *Neuropsychopharmacology.* 35:1693–1707.
- Inda MC, DeFelipe J, Muñoz A. 2009. Morphology and distribution of chandelier cell axon terminals in the mouse cerebral cortex and claustramygdaloid complex. *Cereb Cortex.* 19:41–54.
- Iqbal J, Ma XM. 2020. Impact of subchronic variable stress on ovariectomy and dendritic spine density in prefrontal cortex in mice. *Neuroreport.* 31:213–219.
- Ishikawa J, Ogawa Y, Owada Y, Ishikawa A. 2014. Hyperlocomotor activity and stress vulnerability during adulthood induced by social isolation after early weaning are prevented by voluntary running exercise before normal weaning period. *Behav Brain Res.* 264:197–206.
- Jacinto LR, Mata R, Novais A, Marques F, Sousa N. 2017. The habenula as a critical node in chronic stress-related anxiety. *Exp Neurol.* 289:46–54.
- Janak PH, Tye KM. 2015. From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature.* 517:284–292.
- Joëls M, Vreugdenhil E. 1998. Corticosteroids in the brain: Cellular and molecular actions. *Mol Neurobiol.* 17:87–108.
- Johnson A, Rainville JR, Rivero-Ballon GN, Dhimitri K, Hodes GE. 2020. Testing the Limits of Sex Differences Using Variable Stress. *Neuroscience.*
- Juruena MF, Erer F, Cleare AJ, Young AH. 2020. The role of early life stress in HPA axis and anxiety. *Adv Exp Med Biol.* 1191:141–153.
- Kaiser T, Ting JT, Monteiro P, Feng G. 2016. Transgenic labeling of parvalbumin-expressing neurons

- with tdTomato. *Neuroscience*. 321:236–245.
- Kamigaki T. 2019. Prefrontal circuit organization for executive control. *Neurosci Res*. 140:23–36.
- Karnani MM, Jackson J, Ayzenshtat I, Sichani XH, Manoocheri K, Kim S, Yuste R. 2016. Opening holes in the blanket of inhibition: Localized lateral disinhibition by vip interneurons. *J Neurosci*. 36:3471–3480.
- Katona I, Freund TF. 2012. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci*. 35:529–558.
- Katona I, Sperl agh B, S ik A, K afalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. 1999. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci*. 19:4544–4558.
- Katz RJ. 1981. Animal model of depression: Effects of electroconvulsive shock therapy. *Neurosci Biobehav Rev*. 5:273–277.
- Kawaguchi Y, Kondo S. 2002. Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol*. 31:277–287.
- Kessler RC. 2003. Epidemiology of women and depression. *J Affect Disord*. 74:5–13.
- Khoo GH, Lin YT, Tsai TC, Hsu K Sen. 2019. Perineuronal Nets Restrict the Induction of Long-Term Depression in the Mouse Hippocampal CA1 Region. *Mol Neurobiol*. 56:6436–6450.
- Kirby ED, Muroy SE, Sun WG, Covarrubias D, Leong MJ, Barchas LA, Kaufer D. 2013. Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2. *Elife*.
- Kisv arday ZF, Gulyas A, Beroukas D, North JB, Chubb IW, Somogyi P. 1990. Synapses, axonal and dendritic patterns of gaba-immunoreactive neurons in human cerebral cortex. *Brain*. 113:793–812.
- Knierim JJ. 2015. The hippocampus. *Curr Biol*. 25:R1116–R1121.
- Kolb B, Pellis S, Robinson TE. 2004. Plasticity and functions of the orbital frontal cortex. *Brain Cogn*. 55:104–115.
- Krugers HJ, Karst H, Joels M. 2012. Interactions between noradrenaline and corticosteroids in the brain: From electrical activity to cognitive performance. *Front Cell Neurosci*. 6:15.
- Kubota Y. 2014. Untangling GABAergic wiring in the cortical microcircuit. *Curr Opin Neurobiol*. 26:7–14.
- Kyrou I, Tsigos C. 2009. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol*. 9:787–793.
- Lebron-Milad K, Abbs B, Milad MR, Linnman C, Rougemont-B ucking A, Zeidan MA, Holt DJ, Goldstein JM. 2012. Sex differences in the neurobiology of fear conditioning and extinction: a preliminary fMRI study of shared sex differences with stress-arousal circuitry. *Biol Mood Anxiety Disord*. 2:7.

- Lecourtier L, DeFrancesco A, Moghaddam B. 2008. Differential tonic influence of lateral habenula on prefrontal cortex and nucleus accumbens dopamine release. *Eur J Neurosci*. 27:1755–1762.
- Lee TTY, Hill MN. 2013. Age of stress exposure modulates the immediate and sustained effects of repeated stress on corticolimbic cannabinoid CB1 receptor binding in male rats. *Neuroscience*. 249:106–114.
- Lensjø KK, Christensen AC, Tennøe S, Fyhn M, Hafting T. 2017. Differential expression and cell-type specificity of perineuronal nets in hippocampus, medial entorhinal cortex, and visual cortex examined in the rat and mouse. *eNeuro*. 4:3.
- Leonard CM. 2016. Finding prefrontal cortex in the rat. *Brain Res*. 1645:1–3.
- Lesuis SL, Timmermans W, Lucassen PJ, Hoogenraad CC, Krugers HJ. 2020. Glucocorticoid and β -adrenergic regulation of hippocampal dendritic spines. *J Neuroendocrinol*. 32.
- Li B, Piriz J, Mirrione M, Chung C, Proulx CD, Schulz D, Henn F, Malinow R. 2011. Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature*. 470:535–541.
- Liguz-Leczna M, Urban-Ciecko J, Kossut M. 2016. Somatostatin and somatostatin-containing neurons in shaping neuronal activity and plasticity. *Front Neural Circuits*. 10:48.
- Liston C, Miller MM, Goldwater DS, Radley JJ, Rocher AB, Hof PR, Morrison JH, McEwen BS. 2006. Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J Neurosci*. 26:7870–7874.
- Longair MH, Baker DA, Armstrong JD. 2011. Simple neurite tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics*. 27:2453–2454.
- Luna B, Marek S, Larsen B, Tervo-Clemmens B, Chahal R. 2015. An Integrative Model of the Maturation of Cognitive Control. *Annu Rev Neurosci*. 38:151–170.
- Lyttle K, Ohmura Y, Konno K, Yoshida T, Izumi T, Watanabe M, Yoshioka M. 2015. Repeated fluvoxamine treatment recovers juvenile stress-induced morphological changes and depressive-like behavior in rats. *Brain Res*. 1616:88–100.
- M. Madrigal J, Garcia-Bueno B, Caso J, Perez-Nievas B, Leza J. 2008. Stress-Induced Oxidative Changes in Brain. *CNS Neurol Disord - Drug Targets*. 5:561–568.
- Machado DG, Cunha MP, Neis VB, Balen GO, Colla A, Grandó J, Brocardo PS, Bettio LEB, Capra JC, Rodrigues ALS. 2012. Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. *Pharmacol Biochem Behav*. 103:220–229.
- Magariños AM, Li CJ, Gal Toth J, Bath KG, Jing D, Lee FS, McEwen BS. 2011. Effect of brain-derived neurotrophic factor haploinsufficiency on stress-induced remodeling of hippocampal neurons. *Hippocampus*. 21:253–264.
- Makinson R, Lundgren KH, Seroogy KB, Herman JP. 2015. Chronic social subordination stress modulates glutamic acid decarboxylase (GAD) 67 mRNA expression in central stress circuits. *Physiol Behav*. 146:7–15.

- Mañas-Ojeda A, Ros-Bernal F, Olucha-Bordonau FE, Castillo-Gómez E. 2020. Becoming stressed: Does the age matter? Reviewing the neurobiological and socio-affective effects of stress throughout the lifespan. *Int J Mol Sci.* 21:1–23.
- Marco EM, Echeverry-Alzate V, López-Moreno JA, Giné E, Peñasco S, Viveros MP. 2014. Consequences of early life stress on the expression of endocannabinoid- related genes in the rat brain. *Behav Pharmacol.* 25:547–556.
- Markham JA, Mullins SE, Koenig JI. 2013. Periadolescent maturation of the prefrontal cortex is sex-specific and is disrupted by prenatal stress. *J Comp Neurol.* 521:1828–1843.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci.* 5:793–807.
- Márquez C, Poirier GL, Cordero MI, Larsen MH, Groner A, Marquis J, Magistretti PJ, Trono D, Sandi C. 2013. Peripuberty stress leads to abnormal aggression, altered amygdala and orbitofrontal reactivity and increased prefrontal MAOA gene expression. *Transl Psychiatry.* 3:e216.
- Mauney SA, Athanas KM, Pantazopoulos H, Shaskan N, Passeri E, Berretta S, Woo TUW. 2013. Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 74:427–435.
- Mazure CM, Maciejewski PK, Jacobs SC, Bruce ML. 2002. Stressful life events interacting with cognitive/personality styles to predict late-onset major depression. *Am J Geriatr Psychiatry.* 10:297–304.
- McCormick CM, Green MR. 2013. From the stressed adolescent to the anxious and depressed adult: Investigations in rodent models. *Neuroscience.* 249:242–257.
- McDonald AJ, Betette RL. 2001. Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: Morphology and co-localization of Calbindin-D28k. *Neuroscience.* 102:413–425.
- McDonald AJ, Mascagni F. 2002. Immunohistochemical characterization of somatostatin containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.* 943:237–244.
- McEwen BS. 1999. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 22:105–122.
- McEwen BS. 2000. The neurobiology of stress: From serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 886:172–189.
- McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, Nasca C. 2015. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci.* 18:1353–1363.
- McEwen BS, Morrison JH. 2013. The Brain on Stress: Vulnerability and Plasticity of the Prefrontal Cortex over the Life Course. *Neuron.* 79:16–29.
- McEwen BS, Sapolsky RM. 1995. Stress and cognitive function Introduction Catecholamines and glucocorticoids. *Curr Opin Neurobiol.* 5:205–216.
- McGonagle KA, Kessler RC. 1990. Chronic stress, acute stress, and depressive symptoms. *Am J Community Psychol.* 18:681–706.
- McKlveen JM, Morano RL, Fitzgerald M, Zoubovsky S, Cassella SN, Scheimann JR, Ghosal S, Mahbod

- P, Packard BA, Myers B, Baccei ML, Herman JP. 2016. Chronic Stress Increases Prefrontal Inhibition: A Mechanism for Stress-Induced Prefrontal Dysfunction. *Biol Psychiatry*. 80:754–764.
- McLaughlin KJ, Gomez JL, Baran SE, Conrad CD. 2007. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: An evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Res*. 1161:56–64.
- Metzger M, Bueno D, Lima LB. 2017. The lateral habenula and the serotonergic system. *Pharmacol Biochem Behav*. 162:22–28.
- Metzger M, Souza R, Lima LB, Bueno D, Gonçalves L, Segó C, Donato J, Shammah-Lagnado SJ. 2019. Habenular connections with the dopaminergic and serotonergic system and their role in stress-related psychiatric disorders. *Eur J Neurosci*.
- Meye FJ, Lecca S, Valentinova K, Mameli M. 2013. Synaptic and cellular profile of neurons in the lateral habenula. *Front Hum Neurosci*. 7:860.
- Meyer SE, Chrousos GP, Gold PW. 2001. Major depression and the stress system: A life span perspective. *Dev Psychopathol*. 13:565–580.
- Milner TA, Burstein SR, Marrone GF, Khalid S, Gonzalez AD, Williams TJ, Schierberl KC, Torres-Reveron A, Gonzales KL, McEwen BS, Waters EM. 2013. Stress differentially alters mu opioid receptor density and trafficking in parvalbumin-containing interneurons in the female and male rat hippocampus. *Synapse*. 67:757–772.
- Miyata S, Komatsu Y, Yoshimura Y, Taya C, Kitagawa H. 2012. Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat Neurosci*. 15:414–422.
- Morales M, Bloom FE. 1997. The 5-HT₃ receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. *J Neurosci*. 17:3157–3167.
- Mudra Rakshasa A, Tong MT. 2020. Making “Good” Choices: Social Isolation in Mice Exacerbates the Effects of Chronic Stress on Decision Making. *Front Behav Neurosci*. 14:81.
- Mukhara D, Banks ML, Neigh GN. 2018. Stress as a risk factor for substance use disorders: A mini-review of molecular mediators. *Front Behav Neurosci*. 12:309.
- Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ. 2003. Synaptic connections of distinct interneuronal subpopulations in the rat basolateral amygdalar nucleus. *J Comp Neurol*. 456:217–236.
- Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ. 2007. Postsynaptic targets of somatostatin-containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol*. 500:513–529.
- Murphy EK, Spencer RL, Sipe KJ, Herman JP. 2002. Decrements in nuclear glucocorticoid receptor (GR) protein levels and DNA binding in aged rat hippocampus. *Endocrinology*. 143:1362–1370.
- Murthy S, Kane GA, Katchur NJ, Lara Mejia PS, Obiofuma G, Buschman TJ, McEwen BS, Gould E. 2019. Perineuronal Nets, Inhibitory Interneurons, and Anxiety-Related Ventral Hippocampal Neuronal Oscillations Are Altered by Early Life Adversity. *Biol Psychiatry*. 85:1011–1020.
- Nacher J, Alonso-Llosa G, Rosell D, McEwen B. 2002. PSA-NCAM expression in the piriform cortex of the adult rat. Modulation by NMDA receptor antagonist administration. *Brain Res*. 927:111–121.

- Nacher J, Blasco-Ibáñez JM, McEwen BS. 2002. Non-granule PSA-NCAM immunoreactive neurons in the rat hippocampus. *Brain Res.* 930:1–11.
- Nacher J, Guirado R, Castillo-Gómez E. 2013. Structural plasticity of interneurons in the adult brain: Role of PSA-NCAM and implications for psychiatric disorders. *Neurochem Res.* 38:1122–1133.
- Nacher J, Lanuza E, McEwen BS. 2002. Distribution of PSA-NCAM expression in the amygdala of the adult rat. *Neuroscience.* 113:479–484.
- Nakagawa F, Schulte BA, Spicer SS. 1986. Selective cytochemical demonstration of glycoconjugate-containing terminal N-acetylgalactosamine on some brain neurons. *J Comp Neurol.* 243:280–290.
- Nandam LS, Brazel M, Zhou M, Jhaveri DJ. 2020. Cortisol and Major Depressive Disorder—Translating Findings From Humans to Animal Models and Back. *Front Psychiatry.* 10:974.
- Ng LHL, Huang Y, Han L, Chang RCC, Chan YS, Lai CSW. 2018. Ketamine and selective activation of parvalbumin interneurons inhibit stress-induced dendritic spine elimination. *Transl Psychiatry.* 8:272.
- Nowicka D, Soulsby S, Skangiel-Kramska J, Glazewski S. 2009. Parvalbumin-containing neurons, perineuronal nets and experience-dependent plasticity in murine barrel cortex. *Eur J Neurosci.* 30:2053–2063.
- Obermayer J, Heistek TS, Kerkhofs A, Goriounova NA, Kroon T, Baayen JC, Idema S, Testa-Silva G, Couey JJ, Mansvelder HD. 2018. Lateral inhibition by Martinotti interneurons is facilitated by cholinergic inputs in human and mouse neocortex. *Nat Commun.* 9:4101.
- Ohta K ichi, Suzuki S, Warita K, Sumitani K, Tenkumo C, Ozawa T, Ujihara H, Kusaka T, Miki T. 2020. The effects of early life stress on the excitatory/inhibitory balance of the medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res.* 379.
- Oliva AA, Jiang M, Lam T, Smith KL, Swann JW. 2000. Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J Neurosci.* 20:3354–3368.
- Ons S, Martí O, Armario A. 2004. Stress-induced activation of the immediate early gene *Arc* (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: Relationship to *c-fos* mRNA. *J Neurochem.* 89:1111–1118.
- Ootsuka Y, Mohammed M. 2015. Activation of the habenula complex evokes autonomic physiological responses similar to those associated with emotional stress. *Physiol Rep.* 3:2.
- Page CE, Alexander J, Shepard R, Coutellier L. 2018. *Npas4* deficiency interacts with adolescent stress to disrupt prefrontal GABAergic maturation and adult cognitive flexibility. *Genes Brain Behav.* 17:e12459.
- Page CE, Coutellier L. 2018. Adolescent Stress Disrupts the Maturation of Anxiety-related Behaviors and Alters the Developmental Trajectory of the Prefrontal Cortex in a Sex- and Age-specific Manner. *Neuroscience.* 390:265–277.
- Page CE, Coutellier L. 2019. Prefrontal excitatory/inhibitory balance in stress and emotional disorders: Evidence for over-inhibition. *Neurosci Biobehav Rev.* 105:39–51.

- Palanza P. 2001. Animal models of anxiety and depression: How are females different? *Neurosci Biobehav Rev.* 25:219–233.
- Pantazopoulos H, Berretta S. 2016. In sickness and in health: Perineuronal nets and synaptic plasticity in psychiatric disorders. *Neural Plast.*
- Papilloud A, Guillot de Suduiraut I, Zanoletti O, Grosse J, Sandi C. 2018. Peripubertal stress increases play fighting at adolescence and modulates nucleus accumbens CB1 receptor expression and mitochondrial function in the amigdala. *Transl Psychiatry.* 8:156.
- Papp M, Willner P, Muscat R. 1991. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology (Berl).* 104:255–259.
- Paus T, Keshavan M, Giedd JN. 2008. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci.* 9:947–957.
- Pawlak R, Rao BSS, Melchor JP, Chattarji S, McEwen B, Strickland S. 2005. Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18201–18206.
- Paxinos G, Franklin K. 2019. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press.
- Perova Z, Delevich K, Li B. 2015. Depression of excitatory synapses onto parvalbumin interneurons in the medial prefrontal cortex in susceptibility to stress. *J Neurosci.* 35:3201–3206.
- Pesarico AP, Bueno-Fernandez C, Guirado R, Gómez-Climent MÁ, Curto Y, Carceller H, Nacher J. 2019. Chronic Stress Modulates Interneuronal Plasticity: Effects on PSA-NCAM and Perineuronal Nets in Cortical and Extracortical Regions. *Front Cell Neurosci.* 13:197.
- Pesarico AP, Rosa SG, Martini F, Goulart TA, Zeni G, Nogueira CW. 2017. Brain-derived neurotrophic factor signaling plays a role in resilience to stress promoted by isoquinoline in defeated mice. *J Psychiatr Res.* 94:78–87.
- Petanjek Z, Judaš M, Šimić G, Rašin MR, Uylings HBM, Rakic P, Kostović I. 2011. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:13281–13286.
- Pfeffer CK, Xue M, He M, Huang ZJ, Scanziani M. 2013. Inhibition of inhibition in visual cortex: The logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat Neurosci.* 16:1068–1076.
- Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS. 2003. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 17:879–886.
- Pi HJ, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JI, Huang ZJ, Kepecs A. 2013. Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature.* 503:521–524.
- Pieraut S, Goukko N, Sando R, Dang W, Rebboah E, Panda S, Madisen L, Zeng H, Maximov A. 2014. Experience-dependent remodeling of basket cell networks in the dentate gyrus. *Neuron.* 84:107–122.
- Pinault D. 2004. The thalamic reticular nucleus: Structure, function and concept. *Brain Res Rev.* 46:1–

31.

- Pinzón-Parra C, Vidal-Jiménez B, Camacho-Abrego I, Flores-Gómez AA, Rodríguez-Moreno A, Flores G. 2019. Juvenile stress causes reduced locomotor behavior and dendritic spine density in the prefrontal cortex and basolateral amygdala in Sprague-Dawley rats. *Synapse*. 73:e22066.
- Platt JE, Stone EA. 1982. Chronic restraint stress elicits a positive antidepressant response on the forced swim test. *Eur J Pharmacol*. 82:179–181.
- Pratt JA, Morris BJ. 2015. The thalamic reticular nucleus: A functional hub for thalamocortical network dysfunction in schizophrenia and a target for drug discovery. *J Psychopharmacol*. 29:127–137.
- Qiao H, Li MX, Xu C, Chen H Bin, An SC, Ma XM. 2016. Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plast*.
- Qin M, Xia Z, Huang T, Smith CB. 2011. Effects of chronic immobilization stress on anxiety-like behavior and basolateral amygdala morphology in Fmr1 knockout mice. *Neuroscience*. 194:282–290.
- Radley J, Morilak D, Viau V, Campeau S. 2015. Chronic stress and brain plasticity: Mechanisms underlying adaptive and maladaptive changes and implications for stress-related CNS disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 58:79–91.
- Radley JJ, Morrison JH. 2005. Repeated stress and structural plasticity in the brain. *Ageing Res Rev*. 16:313-320.
- Radley JJ, Rocher AB, Janssen WGM, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2005. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp Neurol*. 196:199–203.
- Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WGM, Liston C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2006. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 16:313–320.
- Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dammann M, McEwen BS, Morrison JH, Wearne SL, Hof PR. 2008. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol*. 507:1141–1150.
- Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2004. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*. 125:1–6.
- Rainnie DG, Mania I, Mascagni F, McDonald AJ. 2006. Physiological and morphological characterization of parvalbumin-containing interneurons of the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol*. 498:142–161.
- Ramón y Cajal S. 1909. *Histologie du système nerveux de l'homme*. Paris : A. Maloine.
- Renaud S. 1959. Improved restraint-technique for producing stress and cardiac necrosis in rats. *J Appl Physiol*. 14:868–869.
- Reznikov LR, Reagan LP, Fadel JR. 2008. Activation of phenotypically distinct neuronal subpopulations

- in the anterior subdivision of the rat basolateral amygdala following acute and repeated stress. *J Comp Neurol.* 508:458–472.
- Rice D, Barone Jr. S. 2000. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System : Evidence from Humans and Animal Models Critical Periods of Vulnerabilityfor the Developing Nervous System : Evidence from Humans and Animal Models Development of the Brain in Utero. *Environ Health Perspect.* 108:511–533.
- Riedemann T. 2019. Diversity and function of somatostatin-expressing interneurons in the cerebral cortex. *Int J Mol Sci.* 20:2952.
- Riga D, Kramvis I, Koskinen MK, Van Bokhoven P, Van Der Harst JE, Heistek TS, Timmerman AJ, Van Nierop P, Van Der Schors RC, Pieneman AW, De Weger A, Van Mourik Y, Schoffelmeer ANM, Mansvelder HD, Meredith RM, Hoogendijk WJG, Smit AB, Spijker S. 2017. Hippocampal extracellular matrix alterations contribute to cognitive impairment associated with a chronic depressive-like state in rats. *Sci Transl Med.* 9.
- Riga D, Schmitz LJM, Hoogendijk WJG, Smit AB, Spijker S. 2017. Temporal profiling of depression vulnerability in a preclinical model of sustained depression. *Sci Rep.* 7:8570.
- Rolls ET. 2019. The cingulate cortex and limbic systems for action, emotion, and memory. *Handb Clin Neurol.* 166:23–37.
- Roosendaal B, McEwen BS, Chattarji S. 2009. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci.* 10:423–433.
- Rovira-Esteban L, Péterfi Z, Vikór A, Máté Z, Szabó G, Hájos N. 2017. Morphological and physiological properties of CCK/CB1R-expressing interneurons in the basal amygdala. *Brain Struct Funct.* 222:3543–3565.
- Rudy B, Fishell G, Lee SH, Hjerling-Leffler J. 2011. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol.* 71:45–61.
- Ruigrok ANV, Salimi-Khorshidi G, Lai MC, Baron-Cohen S, Lombardo M V., Tait RJ, Suckling J. 2014. A meta-analysis of sex differences in human brain structure. *Neurosci Biobehav Rev.* 39:34-50.
- Rutishauser U. 2008. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 9:26–35.
- Sachs BD, Tran HL, Folse E, Caron MG. 2018. Brain-region-specific Molecular Responses to Maternal Separation and Social Defeat Stress in Mice. *Neuroscience.* 373:122–136.
- Safari MA, Jahromi MK, Rezaei R, Aligholi H, Brand S. 2020. The effect of swimming on anxiety-like behaviors and corticosterone in stressed and unstressed rats. *Int J Environ Res Public Health.* 17:1–19.
- Sah P, Faber ESL, De Armentia ML, Power J. 2003. The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. *Physiol Rev.* 83:803–834.
- Sandi C. 2004. Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat Rev Neurosci.* 5:917–930.
- Sandi C, Merino JJ, Cordero MI, Touyarot K, Venero C. 2001. Effects of chronic stress on contextual

- fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. *Neuroscience*. 102:329–339.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. 1985. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: Implications for aging. *J Neurosci*. 5:1222–1227.
- Satoh E, Tada Y, Matsuhisa F. 2011. Chronic stress enhances calcium mobilization and glutamate exocytosis in cerebrocortical synaptosomes from mice. *Neurol Res*. 33:899–907.
- Scharfman HE. 2016. The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nat Rev Neurosci*. 17:562–575.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 9:676–682.
- Seay MJ, Natan RG, Geffen MN, Buonomano D V. 2020. Differential short-term plasticity of PV and SST neurons accounts for adaptation and facilitation of cortical neurons to auditory tones Title: Differential short-term plasticity of PV and SST neurons accounts for adaptation and facilitation of cortical neurons to auditory tones. Running title: STP accounts for A1 adaptation and facilitation Journal section: Systems/Circuits. 39:34-50.
- Seidel K, Helmeke C, Poeggel G, Braun K. 2008. Repeated neonatal separation stress alters the composition of neurochemically characterized interneuron subpopulations in the rodent dentate gyrus and basolateral amygdala. *Dev Neurobiol*. 68:1137–1152.
- Seki T, Arai Y. 1999. Different polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression patterns in distinct types of mossy fiber boutons in the adult hippocampus. *J Comp Neurol*. 410:115–125.
- Selye H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J*. 1:1383–1392.
- Shaw GA, Dupree JL, Neigh GN. 2020. Adolescent maturation of the prefrontal cortex: Role of stress and sex in shaping adult risk for compromise. *Genes Brain Behav*. 19:e12626.
- Shepard R, Coutellier L. 2018. Changes in the prefrontal glutamatergic and parvalbumin systems of mice exposed to unpredictable chronic stress. *Mol Neurobiol*. 55:2591–2602.
- Shepard R, Page CE, Coutellier L. 2016. Sensitivity of the prefrontal GABAergic system to chronic stress in male and female mice: Relevance for sex differences in stress-related disorders. *Neuroscience*. 332:1–12.
- Shi W, Wei X, Wang X, Du S, Liu W, Song J, Wang Y. 2019. Perineuronal nets protect long-term memory by limiting activity-dependent inhibition from parvalbumin interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116:27063–27073.
- Sholl DA. 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*. 87:387–406.
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ. 2011. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*. 36:529–538.
- Sik A, Penttonen M, Ylinen A, Buzsáki G, Buzsaki G. 1995. Hippocampal CA1 interneurons: An in vivo intracellular labeling study. *J Neurosci*. 15:6651–6665.

- Simon P, Dupuis R, Costentin J. 1994. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res.* 61:59–64.
- Smith Y, Séguéla P, Parent A. 1987. Distribution of gaba-immunoreactive neurons in the thalamus of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Neuroscience.* 22:579–591.
- Soleman S, Filippov MA, Dityatev A, Fawcett JW. 2013. Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience.* 253:194–213.
- Somogyi J, Baude A, Omori Y, Shimizu H, El Mestikawy S, Fukaya M, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P. 2004. GABAergic basket cells expressing cholecystinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur J Neurosci.* 19:552–569.
- Somogyi P. 1977. A specific “axo-axonal” interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res.* 136:345–350.
- Sorg BA, Berretta S, Blacktop JM, Fawcett JW, Kitagawa H, Kwok JCF, Miquel M. 2016. Casting a wide net: Role of perineuronal nets in neural plasticity. *J Neurosci.* 36:11459–11468.
- Sousa N, Lukoyanov N V., Madeira MD, Almeida OFX, Paula-Barbosa MM. 2000. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience.* 97:253–266.
- Sousa RJ, Tannery NH, Lafer EM. 1989. In situ hybridization mapping of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in rat brain. *Mol Endocrinol.* 3:481–494.
- Spampanato J, Polepalli J, Sah P. 2011. Interneurons in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology.* 60:765–773.
- Spear LP. 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.* 24:417–463.
- Spijker S, Koskinen MK, Riga D. 2020. Incubation of depression: ECM assembly and parvalbumin interneurons after stress. *Neurosci Biobehav Rev.* 118:65–79.
- Spruston N. 2008. Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci.* 9:206–221.
- Stairs DJ, Chacho NM, Wunsch C, Pipitone L, Dravid SM. 2020. Environmental enrichment increases cue-dependent freezing and behavioral despair but decreases anxiety-like behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 196:172979.
- Stephenson-Jones M, Floros O, Robertson B, Grillner S. 2012. Evolutionary conservation of the habenular nuclei and their circuitry controlling the dopamine and 5-hydroxytryptophan (5-HT) systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:3.
- Steullet P, Cabungcal JH, Bukhari SA, Ardelt MI, Pantazopoulos H, Hamati F, Salt TE, Cuenod M, Do KQ, Berretta S. 2018. The thalamic reticular nucleus in schizophrenia and bipolar disorder: role of parvalbumin-expressing neuron networks and oxidative stress. *Mol Psychiatry.* 23:2057–2065.
- Takahashi LK. 2014. Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. *Front*

Behav Neurosci. 8:72.

- Takamori S. 2006. VGLUTs: “Exciting” times for glutamatergic research? *Neurosci Res.* 55:343–351.
- Taniguchi H, Lu J, Huang ZJ. 2013. The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science.* 339:70–74.
- Testa D, Prochiantz A, Di Nardo AA. 2019. Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 89:125–135.
- Tirelli E, Laviola G, Adriani W. 2003. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 27:163–178.
- Todorović N, Mičić B, Schwirtlich M, Stevanović M, Filipović D. 2019. Subregion-specific Protective Effects of Fluoxetine and Clozapine on Parvalbumin Expression in Medial Prefrontal Cortex of Chronically Isolated Rats. *Neuroscience.* 396:24–35.
- Tsoory M, Guterman A, Richter-Levin G. 2008. Exposure to stressors during juvenility disrupts development-related alterations in the PSA-NCAM to NCAM expression ratio: Potential relevance for mood and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology.* 33:378–393.
- Tsuchimine S, Matsuno H, O’Hashi K, Chiba S, Yoshimura A, Kunugi H, Sohya K. 2020. Comparison of physiological and behavioral responses to chronic restraint stress between C57BL/6J and BALB/c mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 525:33–38.
- Tuncdemir SN, Wamsley B, Stam FJ, Osakada F, Goulding M, Callaway EM, Rudy B, Fishell G. 2016. Early Somatostatin Interneuron Connectivity Mediates the Maturation of Deep Layer Cortical Circuits. *Neuron.* 89:521–535.
- Tzakis N, Holahan MR. 2019. Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. *Front Behav Neurosci.* 13:233.
- Tzanoulinou S, García-Mompó C, Castillo-Gómez E, Veenit V, Nacher J, Sandi C. 2014. Long-term behavioral programming induced by peripuberty stress in rats is accompanied by gabaergic-related alterations in the amygdala. *PLoS One.* 9:e94666.
- Tzanoulinou S, García-Mompó C, Riccio O, Grosse J, Zanoletti O, Dedousis P, Nacher J, Sandi C. 2016. Neuroligin-2 Expression in the Prefrontal Cortex is Involved in Attention Deficits Induced by Peripubertal Stress. *Neuropsychopharmacology.* 41:751–761.
- Tzanoulinou S, Riccio O, De Boer MW, Sandi C. 2014. Peripubertal stress-induced behavioral changes are associated with altered expression of genes involved in excitation and inhibition in the amygdala. *Transl Psychiatry.* 4.
- Ueno H, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, Matsumoto Y, Okamoto M, Aoki S, Ishihara T. 2018. Juvenile stress induces behavioral change and affects perineuronal net formation in juvenile mice. *BMC Neurosci.* 19:1–21.
- Ueno H, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, Okamoto M, Matsumoto Y, Ishihara T. 2017. Region-specific impairments in parvalbumin interneurons in social isolation-reared mice. *Neuroscience.* 359:196–208.

- Ueno H, Suemitsu S, Okamoto M, Matsumoto Y, Ishihara T. 2017. Parvalbumin neurons and perineuronal nets in the mouse prefrontal cortex. *Neuroscience*. 343:115–127.
- Urban KR, Geng E, Bhatnagar S, Valentino RJ. 2019. Age- and sex-dependent impact of repeated social stress on morphology of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *Neurobiol Stress*. 10.
- Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B. 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res*. 146:3–17.
- van Bokhoven H, Selten M, Nadif Kasri N. 2018. Inhibitory control of the excitatory/inhibitory balance in psychiatric disorders. *F1000Research*. 7:23.
- Van Groen T, Kadish I, Wyss JM. 2002. Species differences in the projections from the entorhinal cortex to the hippocampus. *Brain Res Bull*. 57:553–556.
- Varea E, Blasco-Ibáñez JM, Gómez-Climent MÁ, Castillo-Gómez E, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ, Nàcher J. 2007. Chronic fluoxetine treatment increases the expression of PSA-NCAM in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 32:803–812.
- Varea E, Castillo-Gómez E, Gómez-Climent MÁ, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ, Nàcher J. 2007. PSA-NCAM expression in the human prefrontal cortex. *J Chem Neuroanat*. 33:202–209.
- Varea E, Guirado R, Gilabert-Juan J, Martí U, Castillo-Gomez E, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Nacher J. 2012. Expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the amygdala of psychiatric disorder patients. *J Psychiatr Res*. 46:189–197.
- Varea E, Nàcher J, Blasco-Ibáñez JM, Gómez-Climent MÁ., Castillo-Gómez E, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ. 2005. PSA-NCAM expression in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience*. 136:435–443.
- Varoqui H, Schäfer MKH, Zhu H, Weihe E, Erickson JD. 2002. Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci*. 22:142–155.
- Veenit V, Cordero MI, Tzanoulinou S, Sandi C. 2013. Increased corticosterone in peripubertal rats leads to long-lasting alterations in social exploration and aggression. *Front Behav Neurosci*. 7:26.
- Vida I, Frotscher M. 2000. A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1275–1280.
- Volden PA, Wonder EL, Skor MN, Carmean CM, Patel FN, Ye H, Kocherginsky M, McClintock MK, Brady MJ, Conzen SD. 2013. Chronic social isolation is associated with metabolic gene expression changes specific to mammary adipose tissue. *Cancer Prev Res*. 6:634–645.
- Vollmayr B, Henn FA. 2003. Stress models of depression. *Clin Neurosci Res*. 3:245–251.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*. 22:6810–6818.
- Walker SE, Sandi C. 2018. Long-term programming of psychopathology-like behaviors in male rats by

- peripubertal stress depends on individual's glucocorticoid responsiveness to stress. *Stress*. 21:433-442.
- Walker SE, Wood TC, Cash D, Mesquita M, Williams SCR, Sandi C. 2018. Alterations in brain microstructure in rats that develop abnormal aggression following peripubertal stress. *Eur J Neurosci*. 48:1818–1832.
- Wang D, Fawcett J. 2012. The perineuronal net and the control of cns plasticity. *Cell Tissue Res*. 349:147–160.
- Wang H, Xiao L, Wang H, Wang G. 2020. Involvement of chronic unpredictable mild stress-induced hippocampal LRP1 up-regulation in microtubule instability and depressive-like behavior in a depressive-like adult male rat model. *Physiol Behav*. 215.
- Wang Q, Timberlake MA, Prall K, Dwivedi Y. 2017. The recent progress in animal models of depression. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 77:99-109.
- Wang Y, Zhang P, Wyskiel DR. 2016. Chandelier cells in functional and dysfunctional neural circuits. *Front Neural Circuits*. 10:33.
- Waraich P, Goldner EM, Somers JM, Hsu L. 2004. Prevalence and Incidence Studies of Mood Disorders: A Systematic Review of the Literature. *Can J Psychiatry*. 49:124–138.
- Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*. 588:341–345.
- Watt MJ, Weber MA, Davies SR, Forster GL. 2017. Impact of juvenile chronic stress on adult cortico-accumbal function: Implications for cognition and addiction. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 79:136–154.
- Wearne TA, Cornish JL. 2019. Inhibitory regulation of the prefrontal cortex following behavioral sensitization to amphetamine and/or methamphetamine psychostimulants: A review of GABAergic mechanisms. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 95.
- Wędzony K, Chocyk A. 2009. Cannabinoid CB1 receptors in rat medial prefrontal cortex are colocalized with calbindin- but not parvalbumin- and calretinin-positive GABA-ergic neurons. *Pharmacol Reports*. 61:1000–1007.
- Weissman MM, Klerman GL. 1977. Sex Differences and the Epidemiology of Depression. *Arch Gen Psychiatry*. 34:98–111.
- Wellman CL, Bollinger JL, Moench KM. 2020. Effects of stress on the structure and function of the medial prefrontal cortex: Insights from animal models. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc. p. 129–153.
- West MJ. 1993. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging*. 14:275–285.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec*. 231:482–497.
- Willner P. 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural- neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 52:90–110.

- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. 1987. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*. 93:358–364.
- Wirtshafter D, Asin KE, Pitzer MR. 1994. Dopamine agonists and stress produce different patterns of Fos-like immunoreactivity in the lateral habenula. *Brain Res*. 633:21–26.
- Wohleb ES, Terwilliger R, Duman CH, Duman RS. 2018. Stress-Induced Neuronal Colony Stimulating Factor 1 Provokes Microglia-Mediated Neuronal Remodeling and Depressive-like Behavior. *Biol Psychiatry*. 83:38–49.
- Wolff SBE, Gründemann J, Tovote P, Krabbe S, Jacobson GA, Müller C, Herry C, Ehrlich I, Friedrich RW, Letzkus JJ, Lüthi A. 2014. Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. *Nature*. 509:453–458.
- Wood GE, Young LT, Reagan LP, McEwen BS. 2003. Acute and chronic restraint stress alter the incidence of social conflict in male rats. *Horm Behav*. 43:205–213.
- Wu YWC, Du X, Van den Buuse M, Hill RA. 2014. Sex differences in the adolescent developmental trajectory of parvalbumin interneurons in the hippocampus: A role for estradiol. *Psychoneuroendocrinology*. 45:167–178.
- Xu X, Roby KD, Callaway EM. 2010. Immunohistochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: Three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol*. 518:389–404.
- Yapıcı-Eser H, Dönmez-Demir B, Kılıç K, Eren-Koçak E, Dalkara T. 2018. Stress modulates cortical excitability via α -2 adrenergic and glucocorticoid receptors: As assessed by spreading depression. *Exp Neurol*. 307:45–51.
- Yavorska I, Wehr M. 2016. Somatostatin-expressing inhibitory interneurons in cortical circuits. *Front Neural Circuits*. 10.
- Young NM, Williams RE. 1985. Assignment of lectins specific for D-galactose or N-acetyl-D-galactosamine to two groups, based on their circular dichroism. *Can J Biochem Cell Biol*. 63:268–271.
- Zadrozna M, Nowak B, Łason-Tyburkiewicz M, Wolak M, Sowa-Kucrna M, Papp M, Ossowska G, Pilc A, Nowak G. 2011. Different pattern of changes in calcium binding proteins immunoreactivity in the medial prefrontal cortex of rats exposed to stress models of depression. *Pharmacol Reports*. 63:1539–1546.
- Zaletel I, Filipović D, Puškaš N. 2016. Chronic stress, hippocampus and parvalbumin-positive interneurons: What do we know so far? *Rev Neurosci*. 27:397–409.
- Zhang L, Luo J, Zhang M, Yao W, Ma X, Yu SY. 2014. Effects of curcumin on chronic, unpredictable, mild, stress-induced depressive-like behaviour and structural plasticity in the lateral amygdala of rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 17:793–806.