

2016

Caracterización de la expresión de glucosaminoglicanos de matriz extracelular del SNC murino

Monografía CCGI 2 – Sexto año
Departamento de Histología y Embriología
Facultad de Medicina

Tutor: Dr. Javier Nogueira

Estudiantes:

Romina Arbilla

Sofía Cerri

Victoria Graña

Tania Ivanoff

Florencia Piaggio



ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN	4
GENERALIDADES DEL SNC.....	4
CORTEZA CEREBRAL	6
DESARROLLO DE LA CORTEZA CEREBRAL	7
MATRIZ EXTRACELULAR, REDES PERINEURONALES, TÉCNICA DE TINCIÓN.....	8
DESARROLLO POST NATAL Y PLASTICIDAD.....	10
REDES PERINEURONALES Y PATOLOGÍA.....	11
OBJETIVOS	13
METODOLOGÍA	14
RESULTADOS.....	15
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	21

RESUMEN

La matriz extracelular (MEC) confiere propiedades estructurales a células y tejidos, y está compuesta por una compleja mezcla de proteínas, proteoglicanos (PG) y glucoproteínas (GP) (1). En este último tiempo se ha demostrado que no es una sustancia inerte, si no que cumple múltiples funciones, algunas de las cuales se relacionan con el sistema nervioso central (SNC) (1). Por esta razón es que el presente trabajo pretende caracterizar el patrón de expresión de los glucosaminoglicanos (GAG) de la MEC de la corteza cerebral de ratones adultos, utilizando la técnica de tinción Aglutinina de *Westeria Floribunda* (WFA); y concomitantemente la puesta a punto de dicha técnica.

Para realizar el mismo utilizamos 5 ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57/B16, hembras adultas, cumpliendo con las normas de experimentación animal previstas por la CHEA. Los cerebros de los mismos fueron procesados y se realizaron cortes histológicos para analizar la marcación con WFA, el análisis mediante microscopía óptica de luz, y el muestreo fotográfico de las áreas de interés. Finalmente concluimos que la técnica de WFA es efectiva para la marcación de GAG distribuidos en diferentes regiones del SNC.

Actualmente se encuentra en estudio el rol de la MEC en diferentes patologías neurológicas, como el autismo, la esquizofrenia, entre otros, por lo cual contar con una técnica eficaz para el análisis de la misma resulta de gran interés científico.

Palabras clave: sistema nervioso central, matriz extracelular, glucosaminoglicanos, Aglutinina de *Westeria Floribunda*.

INTRODUCCIÓN

El presente reporte expone los resultados obtenidos durante el trabajo de puesta a punto de la técnica de detección de GAG de la MEC en el SNC, mediante la utilización de la WFA. Este es un paso previo y necesario para el abordaje del estudio de la expresión de elementos de la MEC y su papel en los procesos de desarrollo y maduración del sistema nervioso, así como su implicancia en la patogenia de los síndromes del espectro autista, que se lleva a cabo en el laboratorio del Dr. Nogueira en el Departamento de Histología y Embriología. Además, nos proponemos introducir al lector en aspectos relacionados a las generalidades del SNC y dentro de este brindar información acerca de la MEC y las patologías relacionadas con alteraciones en la misma.

GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El SNC forma parte de un sistema de comunicación que recoge estímulos externos e internos al organismo, los transforma en señales que procesa e integra para que a partir de ellas se elabore una respuesta.

En el podemos reconocer dos porciones bien diferenciadas:

a) La sustancia gris, que ocupa la porción central de la médula espinal, ganglios basales, núcleos del tronco, cerebelo y porción superficial de la corteza cerebral y cerebelosa. En estas áreas es donde se encuentran los somas de las neuronas, dendritas, porciones iniciales de los axones, porciones terminales de los axones que proceden de neuronas adyacentes o lejanas, neuroglia (microglia, astrocitos y oligodendrocitos); además de una profusa red de capilares sanguíneos. El análisis detallado de la ultraestructura de la sustancia gris tejido nervioso permite reconocer dos grandes regiones, una es la ocupada por los somas neuronales, y la otra es la formada por la red de prolongaciones axonales, dendríticas, y ramificaciones de células gliales, y se denomina neuropilo. En el neuropilo se localizan la mayor parte de los contactos sinápticos del SNC.

b) La sustancia blanca, la cual posee axones mielinizados y no mielinizados que forman haces más o menos paralelos, carece de contactos sinápticos y función principal es la conducción de los estímulos nerviosos.

Las células mencionadas anteriormente conforman los dos tipos celulares principales del SN (Sistema Nervioso), las neuronas y las células de la neuroglia. Las neuronas, tienen como característica la excitabilidad, conocida como la capacidad de responder frente a estímulos físicos y químicos, y la conductividad, la cual conduce la excitación originada por los estímulos a neuronas, células musculares y células glandulares, para manifestar una respuesta. Están

formadas por un cuerpo celular o soma que contiene el núcleo y la mayoría de los organelos. El soma es el centro trófico de la célula y de él parten prolongaciones: dendritas y axón.

Las dendritas son prolongaciones ramificadas donde se localizan la mayor parte de los contactos sinápticos que recibe una neurona. Estas poseen función receptora ya que capta estímulos de otras neuronas o del medio externo. En algunas ocasiones presentan protuberancias denominadas espinas dendríticas las cuales representan puntos de contacto sináptico.

El axón, es la prolongación efectora única para cada neurona que transmite estímulos que nacen desde la porción denominada como axónico. Tanto axones como dendritas constituyen entre ellos una red de comunicación neuronal denominada sinapsis. Según el mecanismo de propagación existen dos tipos de sinapsis; eléctrica y química.

La sinapsis eléctrica es una sinapsis en la que la transición de la primera neurona y la segunda es por el pasaje de iones de una célula a otra a través de uniones gap.

La sinapsis química tiene su base en la liberación de neurotransmisores que toman contacto con receptores específicos de la neurona pos sináptica determinando cambios en la excitabilidad y expresión génica de la neurona receptora.

Muy cercano al núcleo encontramos diversos organelos, entre ellos un aparato de Golgi muy desarrollado, un retículo endoplásmico rugoso (RER) con gran cantidad de cisternas, ribosomas libres, y cuerpos de Nissl que corresponden a estructuras provenientes del RER. El cuerpo celular contiene abundantes filamentos intermedios llamados neurofilamentos dispuestos en haces que ocupan los espacios que están entre los cuerpos de Nissl y los complejos de Golgi, y brindan sostén interno adicional a la neurona. También presenta microfilamentos de actina y microtúbulos largos relacionados con el transporte de organelos y vesículas.

Existen cuatro tipos principales de neuroglia en el SNC, que se presentan de diferentes formas y cumplen diferentes funciones. Estas son: astrocitos, oligodendrocitos, microglíocitos y células ependimarias.

Los astrocitos son células que le dan sostén físico y metabólico a las neuronas del SNC. Tienen una asociación estrecha con las neuronas para sustentar y modular sus actividades. Hay dos tipos, los astrocitos protoplasmáticos, que presentan abundantes prolongaciones citoplasmáticas y los podemos encontrar principalmente en la sustancia gris; y los astrocitos fibrosos, que son comunes en la sustancia blanca y que tienen menos prolongaciones. Las prolongaciones de los astrocitos tienen sus extremos expandidos, que forman una vaina que recubre por completo los capilares, sirviendo como intermediarios metabólicos entre la sangre y las neuronas. En su conjunto los pies perivasculares astrocíticos y el endotelio vascular conforman la barrera hematoencefálica.

Los oligodendrocitos producen y mantienen la vaina de mielina en el SNC. Esta vaina está formada por capas concéntricas de membrana plasmática oligodendrocítica. Son células pequeñas con prolongaciones relativamente escasas en comparación con los astrocitos.

La microglía son células pequeñas presentes en todo el SNC. Son células móviles, con función macrofágica. Son las únicas células del SNC cuyo origen embrionario es mesodérmico. Mientras que el resto de las células de sostén y las neuronas provienen del ectodermo.

Las células ependimarias son células que revisten a los ventrículos del encéfalo y al canal medular, esto quiere decir que están en contacto directo con el líquido cefalorraquídeo.

CORTEZA CEREBRAL

En cuanto a la histoarquitectura de la corteza cerebral, Brodman ha descrito dos zonas de la misma denominadas isocortex y allocortex. El isocortex corresponde aproximadamente al 90% de la corteza cerebral y se caracteriza por la presencia de seis capas histológicas, compuestas por distintos tipos celulares que cumplen funciones de excitación e inhibición.

En la corteza cerebral podemos encontrar tres grandes grupos de neuronas: Las piramidales, las cuales tienen función efectora, las estrelladas espinosas y las estrelladas lisas.

Las neuronas estrelladas espinosas son interneuronas excitatorias y usan glutamato como neurotransmisor. Las neuronas estrelladas lisas por su parte son interneuronas inhibitorias que utilizan ácido gamma aminobutírico (GABA) como neurotransmisor.

Las células piramidales presentan soma triangular, con una única dendrita apical, y numerosas dendritas basales que se extienden casi horizontalmente, avanzando hacia la sustancia blanca una distancia variable. Por otro lado se encuentran las células estrelladas espinosas que constituyen el segundo tipo celular más abundante del neocórtex, y la mayor parte se encuentra en la capa granulosa interna. Su cuerpo celular es pequeño y son esencialmente multipolares, con varias dendritas que presentan numerosas espinas. Por último, las células estrelladas no espinosas constituyen el grupo más pequeño, y como su nombre lo dice, presentan pocas espinas dendríticas. Encontramos también las células horizontales o células de Cajal las cuales son pequeñas, fusiformes, orientadas horizontalmente, localizadas exclusivamente en la capa molecular, y células de Martinotti son células pequeñas y que se encuentran en casi todos los niveles de la corteza, presentan dendritas cortas y su axón está dirigido en sentido apical y son un ejemplo particular de interneuronas inhibitorias.

El circuito cortical, constituido por los diferentes tipos de neuronas antes mencionadas, determinan la formación de un patrón de organización laminar en 6 capas en el neocortex, cuando se observa con tinciones histoarquitecturales clásicas.

Capa molecular: Esta capa presenta pocas neuronas. Aquí se encuentra el soma de un único tipo de interneurona, las células horizontales de Cajal, que poseen un axón horizontal que hace sinapsis principalmente con las dendritas apicales de las células piramidales.

Capa granulosa externa: En ella se ubica un grupo de células estrelladas (principalmente interneuronas GABAérgicas), también es posible visualizar células piramidales pequeñas, y dendritas apicales de células cuyos somas se ubican en las capas V y VI.

Capa piramidal externa: Se observan dos subcapas de células piramidales medianas y grandes, donde nacen fibras de asociación cortical y neuronas estrelladas (células no piramidales)

Las capas I, II y III conectan regiones corticales adyacentes e integran varias funciones corticales.

Capa granulosa interna: Presenta somas celulares no piramidales pequeños, redondeados y agrupados, sobretodo células estrelladas espinosas y algunas piramidales.

Capa piramidal interna: se aprecian células fusiformes y células piramidales grandes, se originan fibras de proyección especialmente cortico-espinales, cortico-estriales y cortico-tecales. También presenta dendritas basales de células de las capas III y IV.

Capa multiforme: Es una capa heterogénea donde se encuentran las denominadas células de Martinotti y células fusiformes.

DESARROLLO DE LA CORTEZA CEREBRAL

Con respecto al desarrollo embrionario del SNC, los primeros esbozos del sistema nervioso aparecen al cabo de la tercera semana de gestación, apenas se constituye el disco trilaminar (compuesto por ectodermo, mesodermo y endodermo). En el dorso de este disco, se forma un engrosamiento ectodérmico llamado placa neural, a partir del cual se desarrollan las dos estructuras embrionarias precursoras del desarrollo del sistema nervioso definitivo, estas son el tubo neural primitivo y las crestas neurales.

En cuanto al tubo neural, el mismo comienza a sufrir modificaciones a nivel de su cara dorsal y ventral constituyendo una estructura que se divide en tres regiones primitivas. Estas regiones se denominan como prosencefalo, mesencéfalo y romboencefalo. Al continuar el desarrollo del SNC la vesícula primitiva más cefálica conocida como prosencefalo se divide en dos regiones; el diencefalo y el telencefalo. En dirección caudal se encuentra la segunda vesícula conocida como mesencéfalo, el cual permanece constante a pesar de los cambios que ocurren en el desarrollo del tubo neural. Por último entre el mesencéfalo y la medula espinal primitiva hallamos el romboencéfalo el cual se subdivide en dos nuevas regiones conocidas como mielencéfalo y metencéfalo. El mielencefalo dará origen al bulbo raquídeo y la primera porción de la medula oblonga, mientras que el metencéfalo dará origen por su cara anterior a la protuberancia y por su cara posterior al cerebelo.

Más específicamente, en cuanto a la histogénesis de la corteza, la pared del hemisferio cerebral primitivo está formada por un epitelio pseudoestratificado cuyas células desarrollan una migración intercéntrica a medida que proliferan. Las células cilíndricas se alargan y sus prolongaciones periféricas no nucleadas forman la zona marginal, mientras que sus regiones

nucleadas constituyen la zona ventricular. Algunas de las progenies mitóticas abandonan la zona ventricular y migran hasta ocupar una zona del manto. Grupos de células progenitoras forman primero generaciones de neuronas definitivas y después células gliales que migran y maduran en sus posiciones definitivas. Desde la superficie pial hacia la profundidad pueden definirse las siguientes zonas: Marginal, placa cortical, subplaca, manto, subventricular y ventricular. La zona marginal es la más externa. La placa cortical y la subplaca forman las neuronas de las láminas corticales restantes, mientras que la zona del manto se transforma gradualmente en la sustancia blanca del hemisferio.

MATRIZ EXTRACELULAR, REDES PERINEURONALES, Y TÉCNICA DE TINCIÓN

La MEC representa una red tridimensional que engloba todas las células del organismo y supone un 20% de nuestra masa corporal total (1). Recién en 2006 Alfred Pischinger propuso el modelo de unidad mínima de vida en el organismo, a la tríada de capilar-MEC-célula (2). Ello supone la consideración de la MEC no como un material inerte o un tejido pasivo de sostén, sino como un componente vivo, dinámico y con múltiples funciones. Actualmente se acepta su función como filtro biofísico de protección, nutrición e innervación celular y el terreno para la respuesta inmune, angiogénesis, fibrosis y regeneración tisular (1)

La MEC confiere propiedades estructurales de células y tejidos, y está compuesta por una compleja mezcla de proteínas, proteoglicanos (PG) y glucoproteínas (GP). Dichas proteínas ejercen a su vez un papel regulador de una extensa variedad de procesos celulares ya que generan una interfaz de comunicación con el microambiente celular (1). Las células de soporte son esenciales para la síntesis de la estructura de las fibras extracelulares y de los PG y GP.

Las interacciones entre la MEC, otras células y factores solubles definen los nichos o microambientes bioquímicos y mecánicos locales. Los nichos no son estáticos y su regulación influye en el tránsito, la supervivencia, autorrenovación, proliferación y diferenciación de las células madre (3) (4).

Las redes perineuronales constituyen una forma particular de MEC asociada a algunos tipos de neuronas en el SNC. Las mismas están integradas por la agregación de moléculas de la MEC, producidas por las neuronas y células gliales. Son responsables de la estabilización de la sinapsis y de mantener la relación celular. También están relacionadas en diferentes funciones como buffers iónicos, restricción de la movilidad de receptores, neuroprotección y regulación de la plasticidad neuronal (5). La primera vez que fueron descritas fue hace un siglo por Golgi y son reconocidas desde 1970, pero en las últimas décadas se ha logrado una mayor comprensión ya que han sido objeto de estudio. Hay que agregar además que el desarrollo de nuevos métodos para su visualización ha aportado en este proceso (6).

Actualmente se sabe que las PNNs están compuestas por Proteoglicanos de sulfato de condritina (PGSCs), Hialuronato (HA), Proteínas de enlace y Tenacina-R (Tn-R), teniendo la misma composición en el cerebro y en la médula espinal. El PGSCs consiste en un núcleo proteico y un variado número de cadenas glucosaminoglicanos, que pueden ser diferentes por lo cual se genera gran heterogeneidad (7). En la formación de las PNNs el HA se une a miembros de la familia de las lectinas de PGSCs como agregcan, versican, brevican y neurocan. Además la molécula de HA está unida a las proteínas de enlace y Tn-R formando agregados supramoleculares. Dicho complejo interactúa con las neuronas por medio de los receptores de PGSCs como contactin-1, RPTP, LAR y NgR. (5) (Ver figura 1)

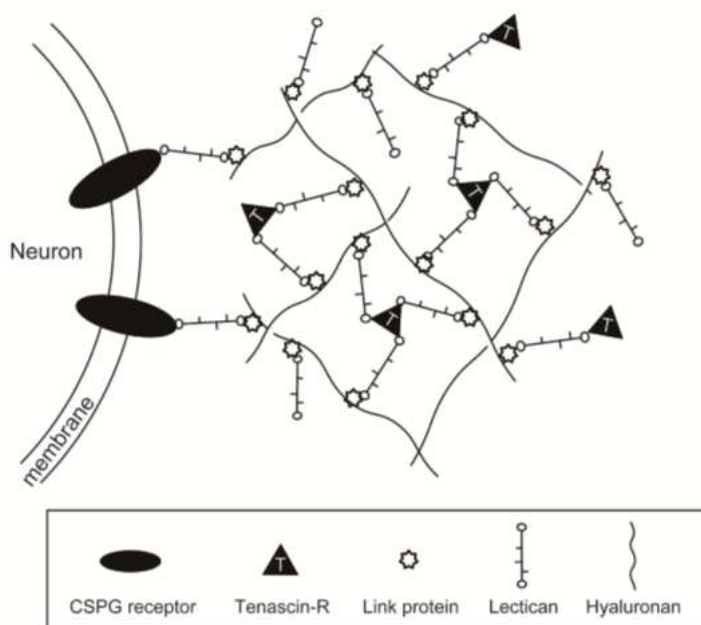


Fig. 1. Extraído de Miao Q et al; 2014. (5)

Para el estudio de la estructura y composición de los elementos de la MEC en el SNC se pueden utilizar diferentes técnicas con anticuerpos y diferentes lectinas. La técnica que realizamos consiste en utilizar Aglutinina Wisteria Floribunda (WFA). Wisteria Floribunda es una liana leñosa, nativa de Japón, de la que se extrae la WFA, esta es una lectina que reconoce selectivamente residuos de glicoproteínas (N-acetylgalactosamina beta 1) dentro de la MEC del SNC y se identificó como marcador específico de distintas áreas corticales en cerebro de roedores. (8). Dicha selectividad, nos permite reconocer las redes perineuronales y los cambios en la expresión de las glicoproteínas de la MEC (8).

El término Lectina fue introducido por Boyd y otros investigadores en el año 1954, aunque en 1888 ya se describía el fenómeno de hemaglutinación utilizando extractos de semillas de plantas

(Aplicaciones de las lectinas) (9). Las lectinas corresponden a un grupo de proteínas (glicoproteínas), las cuales poseen en su estructura por lo menos dos sitios de unión a carbohidratos. Tienen como característica que no son de origen inmune, y no poseen actividad enzimática. Las lectinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se pueden encontrar en: virus, bacterias, hongos, vertebrados, y plantas. Se dividen principalmente en cinco grupos según su afinidad a determinada glicoproteína: manosa (Man), a galactosa/n-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc), a N- acetilglucosamina (GlcNAc), a fucosa (Fuc) o a ácido siálico (Neu5Ac) (10).

DESARROLLO POST NATAL Y PLASTICIDAD

Estudios han revelado que la estructura de las PNNs no es estática, ya que es sensible a cambios de la experiencia sensorial. Un ejemplo de esto es que en ratones criados en total oscuridad desde su nacimiento se demostró la eliminación de dos de sus principales componentes, uno de la familia de CSPGs y Tn-R en la corteza visual. Además implica que juega un rol importante en la regulación de la plasticidad neuronal, entendiendo la misma como la habilidad del SNC para adaptarse en respuesta a cambios en el ambiente (11).

La plasticidad en el cerebro del mamífero es regulada durante su desarrollo alcanzando un nivel elevado en el periodo temprano del mismo disminuyendo drásticamente en el adulto. Se denomina período crítico a ese estado del desarrollo postnatal donde se requiere la experiencia apropiada para la correcta organización de la red neuronal (11). El modelo clásico del periodo crítico de plasticidad es el cambio en la dominancia ocular (DO) inducido por la experiencia en el desarrollo de la corteza visual primaria. Normalmente la corteza visual primaria tiene sus neuronas organizadas en columnas de DO, donde se agrupan las neuronas que responden preferentemente a un ojo pero no al otro. Si se realiza una privación monocular durante el periodo crítico las células cambian su preferencia hacia el ojo no privado, resultando en un cambio general en las columnas de DO de las neuronas de la corteza visual. Pero si la privación ocular se hace fuera del periodo crítico este cambio en la DO no ocurre (12) (13).

En la actualidad los mecanismos de regulación de la plasticidad neuronal no son comprendidos totalmente, se sabe que hay factores como las PNNs, que juegan un importante rol en restringirla mediante la regulación del desarrollo neuronal. Basándose en varios estudios previos se han propuestos tres mecanismos posibles por los cuales las PNN podrían regular la plasticidad del sistema nervioso; el primero es que las PNNs actúan como una barrera física para la formación de nuevas uniones sinápticas; segundo, se plantea que las PNNs funcionan como andamios para la construcción de otras moléculas que limitan las modificaciones sinápticas; y tercero, las PNNs participan activamente en la regulación del balance de excitación-inhibición que es determinante en la inducción del período crítico de plasticidad (5).

REDES PERINEURONALES Y PATOLOGÍA

De acuerdo a la revisión bibliográfica “In sickness and in health: Perineuronal nets and synaptic plasticity in psychiatric disorders” realizada por H. Pantazopoulos y Sabina Berretta, se afirma que anomalías en la MEC pueden contribuir a un componente patológico compartido por un gran subgrupo de desórdenes psiquiátricos (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20).

Las causas específicas de dichas anomalías en cada uno de los desórdenes psiquiátricos todavía no están bien establecidas y pueden ser específicas de cada enfermedad (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29)

· A continuación describiremos algunos de los trastornos psiquiátricos más estudiados.

La **Ezquizofrenia** es un trastorno neurológico crónico, severo, y discapacitante, caracterizado por síntomas psicóticos y alteraciones en las emociones y comportamientos normales.

Estudios genéticos muestran vulnerabilidad genética para genes que codifican moléculas de la MEC, así como un defecto en la regulación de la expresión de estas moléculas en las células gliales y disrupción de estructuras organizadas de la MEC, como las PNN. (30)(31)(32). Específicamente, se ha reportado un descenso del condroitín sulfato en la amígdala y la corteza entorrinal (33), regiones cerebrales interconectadas, involucradas en el aprendizaje vinculado a las emociones y en el procesamiento de información sensorial asociativa (34). El hecho de que haya un descenso de las PNN en el núcleo medial de la amígdala sugiere que las neuronas de proyección GABAérgica también están afectadas por anomalías de las PNN.

Por otro lado, se observa un descenso de la Relina en áreas corticales, y junto con esta se observa un descenso de una de las enzimas principales en la síntesis del GABA en las interneuronas corticales GABAérgicas (35) (36) (37) (38) (39).

· El **autismo** es un grupo heterogéneo de desórdenes caracterizados por déficit persistente en la comunicación social y en la interacción social, y la presencia de patrones de comportamiento e intereses o actividades repetitivos.

Estudios genéticos han identificado a las moléculas de la MEC como contribuyentes potenciales en la etiología del autismo. Se han observado alteración en la expresión de la Relina, la cual se encuentra disminuida en ciertas regiones como la corteza frontal, parietal y cerebelosa (40) (41). También hay evidencia que apunta a los proteoglicanos del heparán sulfato como responsables de la patología del autismo (42).

· Dentro de los síndromes relacionados con el autismo encontramos al **Síndrome de X frágil**, el cual se describe como una discapacidad intelectual de herencia autosómica dominante con síntomas autísticos predominantes (43) (44) (45). Se observó un descenso en la “proteína del retraso mental del X frágil” lo cual hace que haya un aumento en los niveles de metaloproteinasa de matriz MMP-9 (46).

- El **Síndrome de Rett** es un desorden caracterizado por movimientos estereotipados de la mano, regresión del lenguaje, una disminución en el crecimiento cerebral, disfunción autonómica y convulsiones (47). Se han observado déficits en las espinas dendríticas y en la plasticidad sináptica (48) (49) (50) (51) (52). También se observó un aumento de las PNN marcadas con Wisteria Floribunda en la corteza motora de sujetos con síndrome de Rett. (53). Esta alteración es la opuesta a la observada en el autismo y la esquizofrenia, lo que sugiere que diferentes alteraciones en la composición de la MEC pueden resultar en anomalías sinápticas como las detectadas en estas patologías.
- El **Alzheimer** es un Desorden irreversible que afecta progresivamente la memoria y la vida independiente. Está relacionado con pérdida de espinas dendríticas (54) (55) (56) También se ha evidenciado un descenso en la densidad de las PNN, especialmente en la corteza frontal (57)
- La **Epilepsia** es un espectro trastornos cerebrales, de severos a benignos, caracterizados por una alteración del patrón de actividad neuronal normal, causando emociones, comportamientos y sensaciones anormales, o en algunos casos pérdida de conciencia, convulsiones y espasmos musculares. En respuesta a las convulsiones la MEC sufre remodelaciones, que incluyen aumento en la producción de proteoglicanos del condroitín sulfato por las células gliales y la escisión de los mismos por las MMPs (58)(59)(60)(61)(62) Como parte de este remodelado hay un descenso en las PNN (58)(59). Esto lleva a una susceptibilidad para las convulsiones aumentada (59).

OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar el patrón de expresión de los glucosaminoglicanos de la matriz extracelular en la corteza cerebral de ratones adultos, utilizando la técnica de tinción WFA.

Objetivos específicos:

1. Puesta a punto de la técnica de marcaje con la lectina Aglutinina de *Westeria Floribunda*.
2. Análisis de los resultados obtenidos mediante microscopía óptica de luz, y muestreo fotográfico de las áreas de interés.
3. Análisis cualitativo de los patrones de marcación a nivel histológico y citoarquitectural.
4. Discusión del significado de los resultados obtenidos y propuestas de desarrollo futuro para esta línea de trabajo

METODOLOGÍA

Diseño: se realizó un estudio de tipo descriptivo entre el período de Abril a Octubre de 2016 en Universidad de la República del Uruguay, en el laboratorio del Dr. Nogueira “Desarrollo y Plasticidad del Sistema Nervioso” perteneciente al departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay

Animales: aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA)

Se utilizaron 5 ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57/Bl6, hembras adultas.

Colecta y procesamiento de la muestra: Los animales se anestesiaron con Pentobarbital sódico a razón de 60mg/kg, ip y se perfundieron de forma transcardíaca con una solución de buffer fosfato (PBS) heparinizada, seguida de solución de paraformaldehído al 4% en PBS. Luego de extraído el cerebro y cerebelo, estos se posfijaron por 24hs en solución de fijación. Seguidamente los cerebros fueron incubados en PBS conteniendo sacarosa al 30% durante 48 hs. Una vez embebidos en sacarosa los cerebros se congelaron a -20 grados para su procesamiento en criostato. Utilizando un criostato Leica CM1850UV se realizaron cortes a congelación de los cerebros a 30 micrómetros de espesor, que posteriormente se recolectaron en placas de cultivo de 24 pocillos conteniendo PBS, y que finalmente fueron sometidos a protocolo de Wisteria Floribunda, y revelados con técnica de diaminobencidina (DAB).

A continuación se describe el protocolo de WFA:

- 1) Bloqueo de la peroxidasa endógena: 45% etanol + 0.3% H₂O₂ por 20 min.
- 2) Bloqueo de los sitios inespecíficos: PBS + Triton-X100 0.2% + 3% albúmina bovina por 30 min.
- 3) Incubación con WFA: Solución de bloqueo + 10 µg/ml (1/500) de WFA-Sigma, por 2h a temperatura ambiente.
- 4) Lavado: PBS 3x15 min.
- 5) Revelado: Kit Vector - DAB

Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y se secaron en estufa a 37°C. Luego se procedió a la deshidratación y montaje, y a la posterior contratinción con azul de toluidina.

Observación de los preparados: Se utilizó un microscopio marca NikonOptiphot, una cámara fotográfica marca Nikon DA-FI1C, una lupa marca Nikon SMZ1000 con oculares Nikon C-W 10 X B/22 para la observación y documentación de los preparados. Se realizó un análisis cualitativo de los mismos.

RESULTADOS

La técnica utilizada tuvo resultados exitosos, mostrando marcación principalmente en las regiones donde se ha reportado la presencia de glucosaminoglicanos (63).

En este proyecto se analizó de forma más detallada la marcación en cerebelo-tronco y corteza cerebral, observándose diferentes resultados de la distribución de los glucosaminoglicanos en los órganos anteriormente mencionados.

A continuación se presentan las imágenes de los preparados obtenidos.

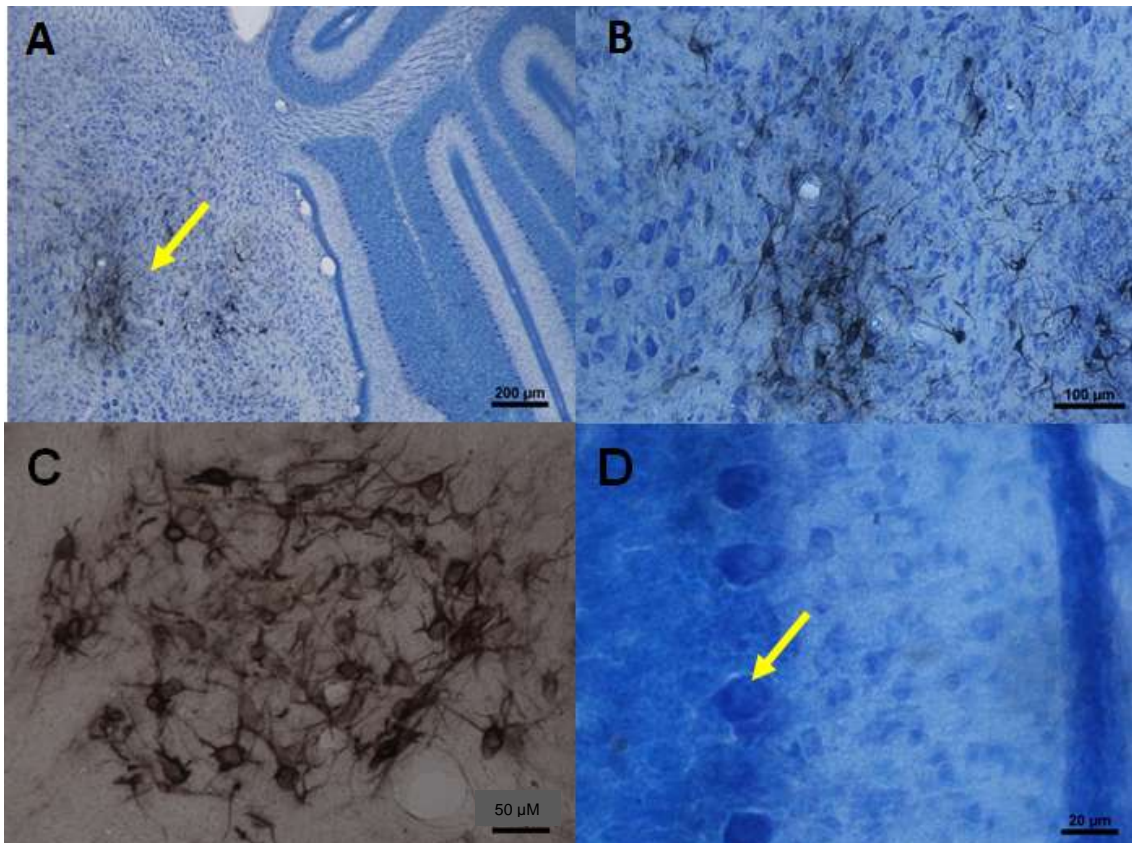


Fig. 2: A. Cerebelo-Núcleo de tronco encefálico, WFA contrateñido con azul de toluidina, 4X; B y C. Núcleo del tronco encefálico, WFA contrateñido con azul de toluidina, 10X y 20X respectivamente; D. Corteza cerebelosa- somas de neuronas de Purkinje (flecha) 40X.

En la imagen A se observa una marcación discreta, destacándose la presencia de grandes sectores con ausencia de marcación para la técnica por WFA, y grupos aislados de neuronas que se marcaron positivamente. Este resultado es consistente con lo reportado en la bibliografía (64) (65). Los somas neuronales marcados aparecen de un color negro amarronado, y corresponden a núcleos del tronco encefálico (señalados con la flecha).

El patrón de marcación obtenido en el tronco encefálico y la corteza cerebelosa constituye una evidencia de la especificidad de la marcación ya que la corteza cerebelosa expresa muy bajos niveles de GAG (64). Esto nos permite asumir que la tinción de fondo, difusa, observada en otras regiones del SNC corresponde a la presencia de GAG, no asociada a PNN, y no al reconocimiento de sitios inespecíficos por parte la lectina.

En la imagen B y C observamos a mayor aumento esta agrupación neuronal, donde se caracteriza la marcación de los somas y los troncos dendríticos proximales. En D vemos a mayor aumento un sector de corteza cerebelosa, donde apreciamos células de Purkinje (señaladas con la flecha) y destacamos que en la misma no encontramos marcación como mencionamos anteriormente.

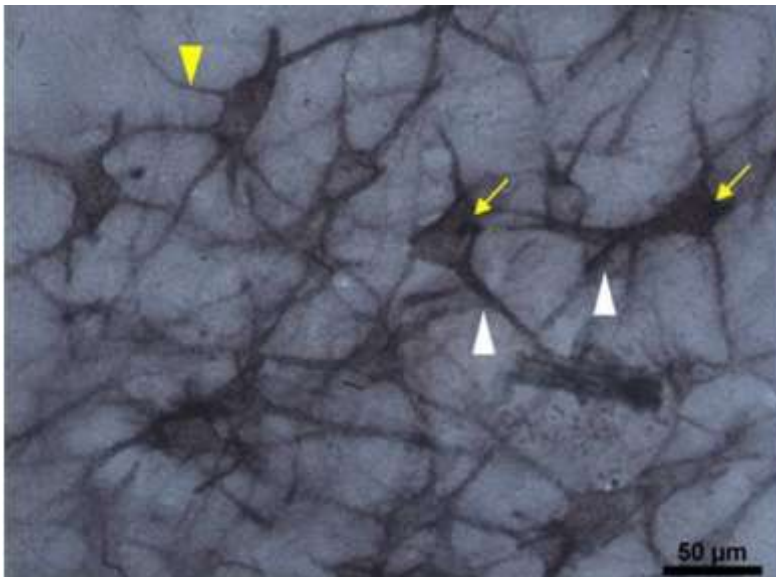


Fig. 3: WFA, Núcleo de tronco encefálico (20X).

En esta imagen a mayor aumento de los núcleos del tronco encefálico (Fig. 3) se observa en detalle la distribución de la marca para WFA sobre la citoarquitectura de este grupo de neuronas. Se aprecian los somas neuronales (flechas), troncos dendríticos proximales (puntas de flecha blancas) y sus axones (punta de flecha amarilla).

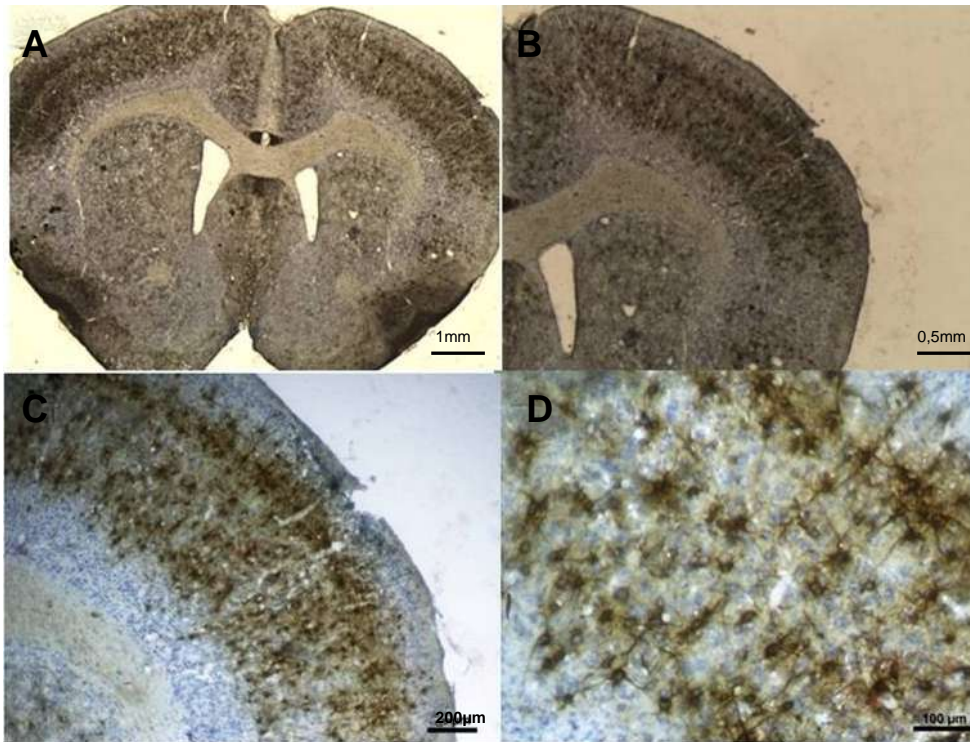


Fig. 4: A y B. Cerebro-corte frontal, WFA contrateñido con azul de toluidina, (1X, 3X). C y D. Cerebro-corte frontal, WFA contrateñido con azul de toluidina (10X y 20X respectivamente).

En la imagen **A** podemos observar el Neocortex, el cual se distribuye en la mayoría de la convexidad cerebral, siendo el mismo el sector principalmente marcado. Podemos deducir que en esta región hay mayor expresión de glucosaminoglicanos, los cuales se disponen en las diferentes capas corticales sin apreciarse una clara diferencia entre ellas.

A mayor aumento (**B**) se aprecia en detalle una discreta diferencia en la marcación de las diferentes capas, presentando una disposición inhomogénea, con un patrón laminar, por lo que se puede asumir que estas regiones podrían corresponder a las diferentes capas del Neocortex.

En la imagen **C** podemos visualizar las capas del Neocórtex con mayor aumento. Podemos observar una discreta diferencia en la intensidad de marcación de las mismas, ya que a este aumento se pueden apreciar núcleos celulares distribuidos a diferentes alturas desde la superficie cortical.

En **D** a mayor aumento apreciamos que la marca aparenta localizarse en la superficie neuronal, más específicamente en su soma y dendritas, no visualizándose sus organelos ni otros elementos citoplasmáticos.

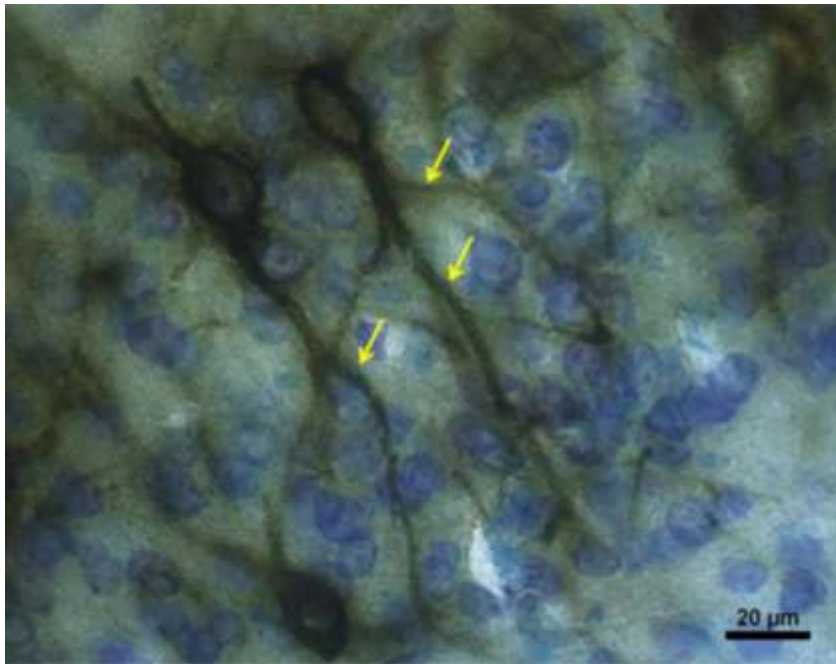


Fig. 5: Cerebro-corte frontal, WFA contrateñido con azul de toluidina (40X).

En la figura 5 se aprecia a mayor aumento neuronas de la corteza en un corte frontal. Nuevamente observamos como la marca aparenta distribuirse en la superficie neuronal, las flechas señalan los troncos dendríticos.

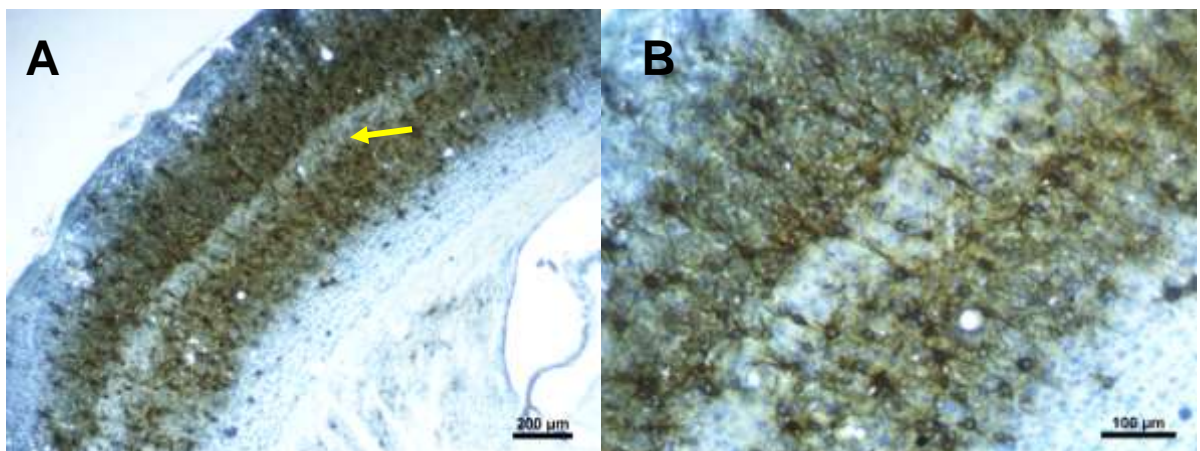


Fig. 6: A y B Cerebro-corte frontal, WFA contrateñido con azul de toluidina (10X y 20X respectivamente).

La imagen A corresponde a un corte de corteza cerebral en un sector más caudal, que podría corresponderse a las áreas somatosensoriales primarias. En una de las capas (señalado con flecha) se observa una menor intensidad de la marcación comparado con la Fig 4 C (corte más frontal); ésta podría corresponder a la capa IV donde se encuentran interneuronas estrelladas

espinosas, que utilizan glutamato como neurotransmisor y no se asocian a estructuras como PNNs. A mayor aumento (**B**), se observa con detalle el marcado desarrollo de la capa IV de la corteza, mencionado anteriormente.

En cuanto al análisis de las imágenes, podemos decir que la técnica de tinción de AWF fue exitosa para la marcación de GAG.

La marca se apreció de un color amarronado, y mediante la contratinción con azul de toluidina se pudo apreciar toda la histoarquitectura de las muestras, diferenciando los sitios marcados con AWF del resto del tejido que no presentó marca. Podemos evidenciar una amplia marcación de la corteza cerebral que presenta una distribución inhomogénea, apreciándose discretas poblaciones de células marcadas.

En los preparados a mayor aumento se vio que la marca aparenta distribuirse en la superficie neuronal permitiendo apreciar su estructura ya que se hicieron evidentes su soma, dendritas y axones, no así su núcleo u organelos. El sector perineuronal presentó una discreta marcación.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Analizando los resultados antes descritos, observamos que los elementos marcados señalan aquellas estructuras en las que está comprobado que existen GAG (64) En aquellos sectores donde existe una baja expresión de GAG no se observa una marcación de la técnica (64) Esto es consistente con las evidencias existentes en la bibliografía y nos permite asumir que la marcación obtenida es una herramienta útil y específica para la detección de glucosaminoglicanos, mostrando su distribución en el SNC.

En las muestras obtenidas del tejido nervioso, podemos evidenciar una amplia marcación de la corteza cerebral, que evidencia una distribución inhomogénea de los GAG, apreciándose que hay poblaciones discretas de células que se marcan. La contratinción con azul de toluidina permite diferenciar las capas del neocórtex que no se marcaron con AWF.

Comparando la distribución de la marca en corteza de preparados de sectores frontales (Fig 4 C) con sectores más caudales (Fig 6 A) se aprecia que en este último, una de las capas no presentó marca, ésta podría corresponder a la capa IV de neocortex, ya que la ausencia de marcación puede deberse principalmente a la presencia de interneuronas excitatorias a este nivel (no relacionadas con PNNs) (64), por lo que es razonable no encontrar marca en este sector. Es así que las diferencias de marcación observadas en las regiones de la corteza podrían reflejar las variaciones estructurales observadas en el neocortex con otras técnicas histológicas, y corresponderse con las adaptaciones estructurales que subyacen a las diferencias funcionales de dichas áreas.

En cuanto a las células, pudimos observar que la marca aparenta estar localizada en la superficie de las neuronas, distribuyéndose sobre los somas, dendritas proximales y posiblemente sobre los axones. Podemos sospechar que estas neuronas son de tipo GABAérgico, aunque no poseemos evidencia de esto, es un campo en el que se debe profundizar con la utilización de otros marcadores.

Esto es interesante porque se enmarca en un proyecto de laboratorio que pretende analizar las funciones de las PNNs en la neuropatología del desarrollo, en particular en la patología autista, por lo que podría compararse el patrón de expresión de GAG en un modelo murino de autismo, inducido con ácido valproico, versus animales control.

Planificamos utilizar otros marcadores para definir cuál es la identidad de esa población celular que marca para GAG. En la bibliografía se evidencia que los GAG están presentes en interneuronas inhibitorias, sería interesante estudiar si la marcación también está presente en las células que expresan decarboxilasa del ácido glutámico, que son las que participan en la síntesis del GABA como neurotransmisor. Sabiendo esto, en un futuro podría estudiarse como se relacionan las alteraciones en la expresión y distribución de los GAG, con diversas patologías del SNC, como por ejemplo los Trastornos del Espectro Autista.

BIBLIOGRAFÍA

LIBROS

- Peter W, Anatomía de Gray, 38^{va} Ed, Madrid, Harcourt.
- Michael R, ed. Jorge N, Histología texto y atlas color con Biología Celular y Molecular, 6^{ta} Ed, EEUU, Médica Panamericana, 2012.

REFERENCIAS

1. Naranjo T, Noguera-Salvá R, Fariñas F. La MEC: morfología, función y biotensegridad (parte I). *Rev. Esp patología* 2009; 42(4): 249-261
2. Pischinger A. The extracellular matrix and ground regulation. 1^oedición, Berkeley (CA): North Atlantic books 2007.
3. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growthfactors, matrices, and forces combine and control stemcells. *Science* 2009; 324(5935): 1673-7.
4. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006; 441: 1075-9.
5. Qing-long M, Qian YE, Xiao-hui Z. Perineuronal net , CSPG receptor and their regulation of neural plasticity. *Acta Physiologica Sinica*. 2014; 66(2011):387–97
6. Celio MR, Spreafico R, DeBiasi S, Vitellaro- Zucarello L. Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* 1998; 21(12):510-515.
7. Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, Sugahara K, Fawcett JW Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J BiolChem* 2006; 281(26): 17789-17800.
8. Hilbig H et al Wisteria floribunda agglutinin labeling patterns in the human cortex: a tool for revealing areal borders and subdivisions in parallel with immunocytochemistry; *Anat Embryol (Berl)* 2001; 203(1):45-52, Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11195088>; Fecha de consulta: 22/7/2016
9. Elola M. Lectinas. *Plantas Vasculares y Celulares*; Acta Farm. Bonaerense 14; 1994; http://www.latamjpharm.org/trabajos/14/1/LAJOP_14_1_3_1_5Y10FJ3071.pdf Fecha de consulta 22/7/16
10. Mejías M; Atlas de histología vegetal y animal, técnicas histológicas. Available from: <http://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/tecnicas-tincion.pdf> Fecha de consulta: 25/9/2016
11. Wang D, Fawcett J. The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res* 2012; 349(1): 147-160.

12. Wiesel TN, Hubel DH. Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J Neurophysiol* 1963; 26: 1003-1017
13. Gordon JA, Stryker MP. Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci* 1996; 16(10): 3274-3286.
14. Williams AJ, Umemori H. The best-laid plans go of tawry: synaptogenic growth factor signaling in neuropsychiatric disease. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2014; 6, artículo 4.
15. Penzes P, Buonanno A, Passafaro M, Sala C, Sweet RA. Developmental vulnerability of synapses and circuits associated with neuropsychiatric disorders. *Journal of Neurochemistry* 2013; 126(2): 165-182
16. Bernardelli Y, Nikonenko I, Muller D. Structural plasticity: mechanisms and contribution to the developmental psychiatric disorders. *Frontiers in Neuroanatomy* 2014; 8(123).
17. Rotaru DC, Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. The role of glutamatergic inputs onto parvalbumin-positive interneurons: relevance for schizophrenia. *Reviews in the Neurosciences* 2012; 23(1): 97-109
18. Duman RS. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodelling glutamatergic synaptic connections. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2014;16(1): 11-27
19. Xu X, Miller EC, Pozzo-Miller L. Dendritic spine dysgenesis in Rett syndrome. *Frontiers in Neuroanatomy* 2014; 8, article 97.
20. Scheff SW, Neltner JH, Nelson PT. Is synaptic loss a unique hallmark of Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology* 2014; 88(4): 517-528.
21. Tissir F, Goffinet AM. Reelin and brain development. *Nature Reviews Neuroscience* 2003; 4(6): 496-505.
22. Zimmeemann DR, Dours-Zimmermann MT. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochemistry and Cell Biology* 2008; 130(4): 635-653.
23. Giger RJ, Hollis II ER, Tuszynski MH. Guidance molecules in axon regeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010; 2(7), article ID a001867.
24. Maeda N, Fukazawa N, Ishii M. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and plasticity. *Frontiers in Bioscience* 2010; 15: 626-644.
25. Barros CS, Franco SJ, Müller U. Extracellular matrix: functions in the nervous system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2011; 3(1), article ID a005108.
26. Franco SJ, Müller U. Extracellular matrix functions during neuronal migration and lamination in the mammalian central nervous system. *Developmental Neurobiology* 2011; 71(11): 889-900

27. Kwok JCF, Dick G, Wang D, Fawcett JW. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Developmental Neurobiology* 2011; 71(11): 1073-1089.
28. Sirko S, von Holst A, Wizenmann A, Götz M, Faissner A. Chondroitin sulphate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells. *Development* 2007; 134(15): 2727-2738.
29. Bandtlow CR, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiological Review* 2000; 80(4): 1267-1290.
30. Takahashi N, Sakurai T, Bozdagi-Gunal O et al. Increased expression of receptor phosphotyrosine phosphatase- β/ζ is associated with molecular, cellular, behavioral and cognitive schizophrenia phenotypes. *Translational Psychiatry* 2011; 1, artículo 8.
31. Shah A, Lodge DJ. A loss of hippocampal perineuronal nets produces deficits in dopamine system function: relevance to the positive symptoms of schizophrenia. *Translational Psychiatry* 2013; 3, artículo 215.
32. Cabungcal JH, Steullet P, Morishita H et al. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110(22): 9130-9135.
33. Pantazopoulos H, Woo TUW, Lim MP, Lange N, Berretta S. Extracellular matrix-glia abnormalities in the amygdala and entorhinal cortex of subjects diagnosed with schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 2010; 67(2): 155-166.
34. Berretta S et al. Astrocytes in the pathophysiology of schizophrenia: abnormal expression of extracellular matrix molecules. *Schizophrenia Research* 2008; 102, supplement 2, (1-3): 11.
35. Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C et al. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(26): 15718-15723.
36. Dong E, Agis Balboa RC, Simonini MV, Grayson DR, Costa E, Guidotti A. Reelin and glutamic acid decarboxylase 67 promoter remodeling in an epigenetic methionine-induced mouse model of schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(35): 12578-12583.
37. Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A et al. Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *American Journal of Medical Genetics B: Neuropsychiatric Genetic* 2005; 134(1): 60-66.
38. Guidotti A, Auta J, Chen Y et al. Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology* 2011; 60(7-8): 1007-1016.
39. Guidotti A, Ruzicka W, Grayson DR et al. S-adenosyl methionine and DNA methyltransferase-1 mRNA over expression in psychosis. *Neuroreport* 2007; 18(1): 57-60.

40. Fatemi SH, Stary JM, Halt AR, Realmuto R. Dysregulation of Reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 2001; 31(6): 529-535.
41. Fatemi SH, Snow AV, Stary JM et al. Reelin signaling is impaired in autism. *Biological Psychiatry* 2005; 57(7):777-787.
42. Irie F, Badie-Mahdavi H, Yamaguchi Y. Autism-like socio-communicative deficits and stereotypies in mice lacking heparin sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109(13): 5052-5056.
43. Gillberg C, Billstedt E. Autism and Asperger syndrome: coexistence with other clinical disorders. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2000; 102(5).
44. Wahlstrom J, Gillberg C, Gustavson KH, Holmgren G. Infantile autism and the fragile X. A Swedish multicenter study. *American Journal of Medical Genetics* 1986; 23(1-2): 403-408.
45. Gillberg C. Identical triplets with infantile autism and the fragile-X syndrome. *British Journal of Psychiatry* 1983; 143(3): 256-260.
46. Janusz A, Milek J, Perycz M et al. The Fragile X mental retardation protein regulates matrix metalloproteinase 9 mRNA at synapses. *Journal of Neuroscience* 2013; 33(46): 18234-18241.
47. Chahrour M, Zoghbi HY. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 2007; 56(3): 422-437.
48. Moretti P, Levenson JM, Battaglia F et al. Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *Journal of Neuroscience* 2006; 26(1): 319-327.
49. Chapleau CA, Calfa GD, Lane MC et al. Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiology of Disease* 2009; 35(2): 219-233.
50. Weng SM, Bailey MES, Cobb SR. Rett syndrome: from bed to bench. *Pediatrics and Neonatology* 2011; 52(6): 309-316.
51. Nguyen MVC, Du F, Felice CA et al. MeCP2 is critical for maintaining mature neuronal networks and global brain anatomy during late stages of postnatal brain development and in the mature adult brain. *The Journal of Neuroscience* 2012; 32(29): 10021-10034
52. Della Sala G, Pizzorusso T. Synaptic plasticity and signaling in Rett syndrome. *Developmental Neurobiology* 2014; 74(2): 178-196.
53. Belichenko PV, Hagberg B, Dahlstrom A. Morphological study of neocortical areas in Rett syndrome. *Acta Neuropathologica* 1997; 93(1): 50-61.
54. Knobloch M, Mansuy IM. Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology* 2008; 37(1): 73-82.

55. Gonatas NK. Neocortical synapses in a presenile dementia. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1967; 26(1): 150-151.
56. Terry RD, Masliah E, Salmon DP et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology* 1991; 30(4): 572-580.
57. Baig S, Wilcock GK, Love S. Loss of perineuronal net N acetyl galactosamine in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* 2005; 110 (4): 393-401.
58. Okamoto M, Sakiyama J, Mori S et al. Kainic acid-induced convulsions cause prolonged changes in the chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan in the limbic structures. *Experimental Neurology* 2003. Vol. 184, no. 1: 179-195.
59. Rankin-Gee EK, McRae PA, Baranov E, Rogers S, Wandrey L, Porter BE. Perineuronal net degradation in epilepsy. *Epilepsia* 2015; 56(7): 1124-1133.
60. Wennstrom M, Hellsten J, Tingstrom A. Electroconvulsive seizures induce proliferation of NG2-expressing glial cells in adult rat amygdala. *Biological Psychiatry* 2004; 55(5): 464-471.
61. Matsui F, Kawashima S, Shuo et al. Transient expression of juvenile-type neurocan by reactive astrocytes in adult rat brains injured by kainate-induced seizures as well as surgical incision. *Neuroscience* 2002; 112(4): 773-781.
62. Naffah-Mazzacoratti MG, Porcionatto GAA, Scorza FA et al. Selective alterations of glycosaminoglycans synthesis and proteoglycan expression in rat cortex and hippocampus in pilocarpine-induced epilepsy. *Brain Research Bulletin* 1999; 50(4): 229-239.
63. Horii-hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W, Nishi M. Development and Structural Variety of the Chondroitin Sulfate Proteoglycans-Contained Extracellular Matrix in the Mouse Brain. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015: 256389
64. Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ et al. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol* 2006; 494(4): 559- 77
65. Foster NL, Mellott JG, Schofield BR. Perineuronal nets and GABAergic cells in the inferior colliculus of guinea pigs. *Front Neuroanat* 2014; Jan 8; 7:53.