



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA HISTOLOGÍA Y  
NEUROCIENCIA



**EFFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO PARECIDO  
A LA INSULINA DE TIPO I (IGF-I) SÉRICO SOBRE EL  
SISTEMA NERVIOSO.**

**TESIS DOCTORAL DE  
JOAQUIN PIRIZ**

**MADRID, MAYO 2007**

## **Resumen:**

La interacción entre el eje somatotrópico de la hormona de crecimiento e IGF-I con el sistema nervioso, es un tema de constante investigación en la neurociencia actual. El IGF-1 circula en gran concentración en la sangre y actúa como un potente factor neurotrófico en el sistema nervioso central. En el presente trabajo estudiamos los efectos del IGF-1 sérico sobre el sistema nervioso; demostramos que los ratones carentes de IGF-1 sérico poseen alteraciones en la plasticidad sináptica en el giro dentado del hipocampo y en el aprendizaje; descubrimos un nuevo mecanismo de entrada de hormonas al cerebro en respuesta a incrementos en la actividad neuronal que podrían explicar las alteraciones de esos ratones y estudiamos los efectos del IGF-1 sérico sobre la neuropatía diabética central y periférica demostrando que la diabetes temprana produce alteraciones en la corteza somatosensorial y que el IGF-1 mejora las alteraciones del sistema nervioso periférico.

## **Palabras relacionadas:**

IGF-1, potenciación a largo plazo, LTP, giro dentado, plasticidad sináptica, neurogenesis, hipocampo, insulina, cerebro, captación de hormonas, diabetes, neuropatía diabética, potenciales evocados, receptor de AMPA, GluR2,

## **ABSTRACT:**

The Interaction between somatotrophic axis of growth hormone and IGF-1 with the central nervous system is a growing field of scientific research. Blood-borne IGF-1 is a potent neurotrophic factor of the central nervous system; it is related with aging, memory and neurodegeneratives diseases. We studied the effect of blood-borne IGF-1 in the adult brain using transgenic mice lacking blood-borne IGF-1 and streptozotocin induced diabetic rats. We found that mice lacking blood-borne IGF-1 have deficiencies of synaptic plasticity in the dentate gyrus of the hippocampus as a consequence of a decreased excitation/inhibition ratio. Additionally, we found that blood-borne IGF-1 enters the brain in response to neuronal activity explaining the mechanism of blood-borne IGF-1 action in the brain. In a second set of experiments we studied central and peripheral diabetic neuropathy and found that somatosensory cortex is severely disturbed during early diabetes and IGF-1 treatment ameliorates peripheral alterations.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA HISTOLOGÍA Y  
NEUROCIENCIA



# **EFFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO PARECIDO A LA INSULINA DE TIPO I (IGF-I) SÉRICO SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO.**

Memoria para optar al grado de Doctor en Neurociencia que presenta

**JOAQUIN PIRIZ**

Realizada en el Instituto Cajal (C.S.I.C) y en el departamento de Anatomía  
Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la UAM  
bajo la dirección de los Doctores Ángel Núñez-Molina e Ignacio Torres-Alemán

**MADRID, MAYO 2007**



Angel Núñez Molina Profesor Titular del Departamento de Anatomía Histología y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid e Ignacio Torres-Alemán Profesor de Investigación del Instituto de Neurociencias “Ramon y Cajal” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

HACEN CONSTAR:

Que Joaquin Piriz ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de su Tesis Doctoral “Efectos del factor de crecimiento parecido a la insulina de tipo I (IGF-I) sérico sobre el sistema nervioso” que ha terminado satisfactoriamente.

Revisado el presente trabajo, quedamos conformes con su presentación para ser juzgado.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmamos en Madrid a 11 de mayo de 2007.

Fdo: Ignacio Torres-Aleman

Fdo Angel Nuñez-Molina

Este trabajo ha sido realizado con cargo a proyectos de investigación de Ministerio de Ciencia (SAF2001-1722 y 2004-00446).

Joaquin Piriz ha recibido financiación del Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grant 01/1188 a ITA) y del Ministerio de Educación y Cultura en el marco del programa de becas de Formación de Personal Universitario, (FPU/2003).

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

A. Sistema IGFs	1
B. Señalización intracelular	4
C. Hipótesis de las somatomedinas	5
D. Ratones LID	6
E. IGF-1 en el sistema nervioso	7
F. IGF-1 circulante y sistema nervioso	11
G. Neuropatía diabética	12

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A. Hipótesis	19
B. Objetivos	19

## MATERIALES Y MÉTODOS

A. Animales	23
B. Métodos Electrofisiológicos	23
B.1. Registros electrofisiológicos en rodajas	23
B.2. Procedimientos electrofisiológicos en animales anestesiados	24
B.2.1. Medición de la velocidad de conducción de nervios motore	25
B.2.2. Potenciales evocados somestésicos por la estimulación del nervio ciático	25
B.2.3. Estimulación eléctrica de las vibrisas	26
B.2.4. Estimulación eléctrica del pedúnculo cerebeloso inferior	27
B.2.5. Potenciales evocados hipocampales y neocorticales	27
C. Estudios comportamentales. Prueba “Plantar Test”	28
C.1. Métodos Quirúrgicos	28
C.1.1. Inyección intracerebroventricular de IGF-1	28
C.1.2. Canulación de la arteria carótida	28
C.1.3. Administración crónica de IGF-1	29
D. Obtención de las muestras	29
D.1. Tejido Nervioso	29
D.2. Extracción de Suero	30

D.3. Extracción de líquido cefalorraquídeo (LCR)	30
E. Procedimientos bioquímicos	31
E.1. Western Blot	31
E.2. Ensayo de ELISA (del inglés “Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay”)	32
E.2.1. Procesamiento de muestras	32
E.2.2. ELISA de IGF-I humano	32
E.2.3. ELISA de IGF-I rata/ratón	33
E.3. Marcaje de IGF-I con digoxigenina	34
F. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	34
F.1. Inmunofluorescencia	35
F.2. Inmunohistoquímica	35
F.3. Recuento de botones glutamatergicos y gabaergicos	36
G. Inducción de diabetes	36
H. Análisis estadístico	37

## **RESULTADOS**

### **PARTE I**

A. Plasticidad sináptica en ratones LID	41
A.1. Plasticidad sináptica en rodajas	41
A.2. Plasticidad sináptica de los ratones LID in vivo	43
A.3. Reversión de la carencia de LTP por bloqueo de la transmisión Inhibitoria	46
B. Análisis de la distribución de IGF-1 en ratones LID y controles	49
C. Modulación de la captación de IGF-1 por actividad neuronal	53
C.1. Captación de IGF-1 en cerebelo	53
C.2. Captación de IGF-1 en corteza de barriles	55
C.3. Análisis inmunohistoquímico de la captación de IGF-1	57

### **PARTE II**

A. Caracterización de la neuropatía diabética central y periférica	65
A.1. Desarrollo de las alteraciones en la percepción térmica	66
A.2. Análisis de la neuropatía diabética periférica	66
A.3. Análisis de la neuropatía diabética central	68



A.4. Análisis de la corteza somatosensorial	71
A.4.1. Amplitud de potenciales evocados	71
A.4.2. Análisis por Western Blot	71
A.4.3. Análisis de sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas en SI	74
B. Efecto del tratamiento de la neuropatía diabética con IGF-1	75

## **DISCUSIÓN**

### **PARTE I**

A. Plasticidad sináptica en ratones carentes de IGF-1 hepático	82
B. Captación de IGF-1 acoplada a la actividad eléctrica	86

### **PARTE II**

A. Análisis de la neuropatía diabética central y periférica	95
B. Efecto del tratamiento de la neuropatía diabética con IGF-1	99

<b>CONCLUSIONES</b>	105
---------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	109
---------------------	-----



## INTRODUCCIÓN



## **A. Sistema IGFs**

El descubrimiento del factor de crecimiento parecido a la Insulina de tipo 1 (IGF-1) se remonta a los experimentos de Salmon y Daughaday (1957). Estos autores, intentando comprender el mecanismo por el cual la hormona de crecimiento (GH) inducía el crecimiento corporal, demostraron que un factor secretado al torrente sanguíneo en respuesta a GH y no la GH en si misma inducía la captación de sulfato en cartílago (Denko y Bergental, 1955; Murphy et al., 1956; Salmon y Daughaday, 1957) denominándolo “factor de sulfatación”; término que posteriormente fue cambiado por somatomedina para reflejar su capacidad de mediar los efectos de la GH (Daughaday et al., 1972). Originalmente se identificaron 3 somatomedinas A, B y C, siendo la somatomedina C la que se inducía por GH. Dos décadas después de su descubrimiento, la somatomedina C fue aislada e identificada como una molécula con homología estructural a la insulina (Rinderknecht y Humbel, 1978a) acuñándose el término de factor de crecimiento parecido a la insulina de tipo I para diferenciarlo del factor de crecimiento parecido a la insulina de tipo II, correspondiente a la somatomedina A.

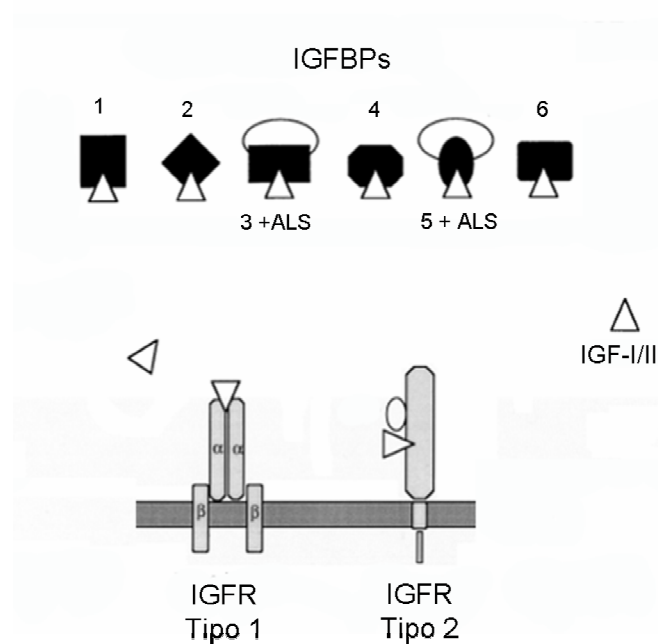
La insulina y los IGFs surgieron evolutivamente a partir de un péptido común en las formas básicas de cordados (Chan et al., 1990) El IGF-1 es un péptido de 50 aminoácidos con un 50 % de homología de secuencia con la pro-insulina y un 70% con el IGF-II (Rinderknecht y Humbel, 1978b). Los IGFs y la insulina poseen una estructura molecular similar compuesta por una cadena A y otra cadena B unida por puentes disulfuro. La mayor diferencia estructural que poseen es que los IGFs retienen la cadena C que se corta en el proceso de maduración de la proinsulina a la insulina y también poseen una pequeña extensión de la cadena A denominada cadena D (Blundell et al., 1983).

En mamíferos existen dos receptores de IGFs denominados IGFR tipo 1 e IGFR tipo 2. El IGFR tipo I es un receptor con actividad tirosín quinasa que, al igual que sus ligandos, comparte un origen evolutivo común con el receptor de insulina (Drakenberg et al., 1993; Pashmforoush et al., 1996). El IGFR tipo 1 está compuesto por dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ ; cada receptor es un heterotetrámero conformado por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  unidas entre si por puentes disulfuro. La subunidad  $\alpha$  posee el sitio de unión a ligando, en tanto que la subunidad  $\beta$  posee la actividad tirosín quinasa (LeRoith

et al., 1995). El IGFR tipo 2 no pertenece a la rama evolutiva a la que pertenecen el IGFR tipo 1 y el receptor de insulina; no posee actividad quinasa, une IGF-II con gran afinidad e IGF-1 con una afinidad mucho menor y también actúa como receptor de ligandos con manosa 6-fosfato (Kornfeld, 1992). La mayoría de las funciones biológicas de los IGFs se producen a través del receptor de tipo 1. El papel del receptor de tipo 2 no ha sido totalmente descifrado, pero probablemente se relacione con la degradación del IGF-II durante el desarrollo embrionario (Braulke et al., 1999).

El sistema de los IGFs se completa por las proteínas que unen IGFs denominadas IGFbps (“insulin growth factor binding proteins”). En mamíferos existen seis IGFbps (1-6). Evolutivamente aparecieron en los vertebrados y se han expandido por duplicación génica (Kelley et al., 2002). Su reciente divergencia se ve reflejada en una estructura molecular parecida que incluye dos dominios ricos en cisteínas en el extremo C y N terminal relacionados con la unión al ligando, y en el extremo una región intermedia que no se encuentra tan conservada (Kelley et al., 2002). Las IGFbps poseen una afinidad por los IGFs similar a la del IGFR tipo I (de aquí en adelante denominado IGFR-1) (Hwa et al., 1999) y actúan como moduladoras de su acción, controlando su disponibilidad y vida media en sangre y tejidos (D'Ercole et al., 2002). En mamíferos, la IGFbp3 es la más abundante en sangre, donde forma un complejo de alto peso molecular con una proteína denominada subunidad ácido-lábil (ALS: “acid-labile subunit”) e IGF-1 (Baxter et al., 1989). La mayoría del IGF-1 circulante en plasma se encuentra dentro de este complejo, hecho que extiende su vida media de minutos a horas (Guler et al., 1989). El complejo IGF-IGFbp3-ALS no atraviesa la pared endotelial, limitando el paso de IGF-1 de la sangre a los tejidos (Baxter et al., 1989). Por lo tanto, el IGF-1 circulante se encuentra formando un complejo molecular de gran estabilidad que permite que exista un reservorio constante de IGF-1 en plasma. Las otras IGFbps se encuentran en diferentes tejidos, donde pueden inhibir o potenciar la señalización por IGF-1 (Kelley et al., 2002). Es llamativo el hecho de que las IGFbps no se unen a la insulina, subrayando el carácter individual del sistema de los IGFs (Kelley et al., 1996). El significado funcional de la gran variedad de IGFbps existentes no es del todo comprendido; esto puede ser consecuencia de la falta de fenotipos observables en los ratones carentes de cada IGFbp, lo que sugiere que existe una gran capacidad de compensación de sus funciones entre ellas (Murphy, 1998; Schneider et al., 2000).

La identidad molecular y estructural de los IGFs y la insulina indican un origen evolutivo común. Esta familia de moléculas surgieron hace 600 millones de años en la rama evolutiva del reino animal y su variedad se extendió por duplicación génica (Tatar et al., 2003). La familia de péptidos parecidos a la insulina comprende 37 moléculas diferentes en invertebrados primitivos (*Caenorhabditis elegans*) (Finch y Ruvkun, 2001) y aproximadamente 10 en mamíferos (*Mus musculus*) (Tatar et al., 2003). Evolutivamente la familia de los IGFs ha mantenido un papel preponderante en la homeostasis de los organismos, relacionándose con la reproducción, maduración, crecimiento, manejo energético y longevidad (Tatar et al., 2003). En mamíferos estas funciones se han distribuido entre la insulina, mayormente vinculada con el manejo energético, y los IGFs relacionados con el crecimiento y la maduración. Notablemente, al igual que en organismos menos complejos, la familia de las IGFs se relaciona con longevidad también en mamíferos subrayando la importancia de la conservación de las acciones de estas moléculas a lo largo de la filogenia (Rincon et al., 2005).



**Figura 1:** Esquema de los componentes del sistema de IGFs en mamíferos (Hwa et al., 1999).

## **B. Señalización intracelular**

La unión del IGF-1 al IGFR1 desencadena una cascada de señalización intracelular que al igual que el resto del sistema de IGFs se encuentra altamente conservada a lo largo de la filogenia y es muy similar entre IGFs e insulina (Barbieri et al., 2003). La activación del IGF-1R desencadena su autofosforilación en residuos de tirosina de la parte citoplasmática de la cadena  $\beta$ . Posteriormente se fosforilan también en tirosinas las proteínas sustrato de los receptores de insulina e IGF, los insulín-receptor substrate (Pennisi et al.) (1-4) y la proteína SHC. La fosforilación en tirosina de los IRS hace que interactúen con gran cantidad de proteínas que contienen el dominio de homología 2 a src (SH2) incluyendo la p85, subunidad reguladora de la PI3 quinasa, la tirosin fosfatasa PTP1D, la “guanin nucleotide exchange protein” GRB2 o la “Ras binding protein” GAP (LeRoith et al., 1995). Una vez fosforilada SHC se une al complejo GRB2/Sos. Tanto los IRS como la proteína SHC desencadenan múltiples cascadas de señalización intracelular que pueden ser agrupadas en dos categorías.

Vía PI3 quinasa:

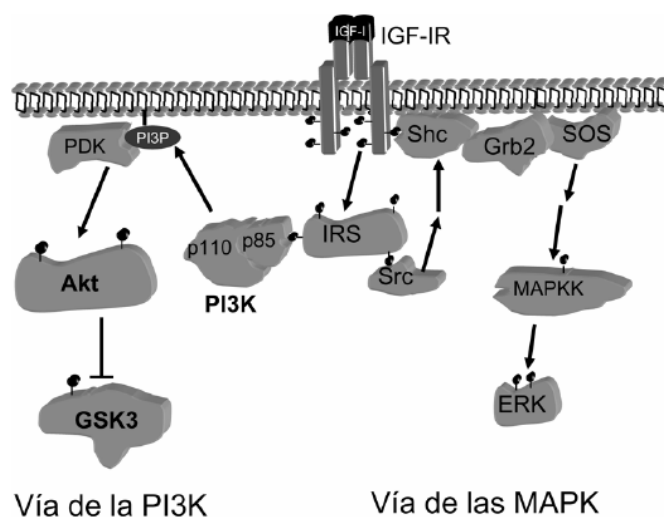
Esta ruta está implicada en procesos celulares de crecimiento y antiapoptóticos (Yuan y Yankner, 2000). La fosforilación del IRS-1 en tirosina recluta un complejo molecular formado por múltiples proteínas incluyendo la subunidad reguladora de la PI3K, p85, la interacción entre los IRS y la p85 induce la activación de la subunidad catalítica de la PI3K la p110. Esta quinasa fosforila fosfoinosítidos produciendo PI-3-fosfato, PI-3,4-bifosfato y PI-3,4,5-trifosfato (Kapeller y Cantley, 1994). Los fosfoinosítidos se unen a dominios específicos de al menos 2 proteínas, la serin-treonin quinasa Akt/PKB y la quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1 (PDK-1). La activación de Akt es una señal ubicua en la activación de la vía del IGF-1 y juega un papel fundamental en la prevención de muerte celular por apoptosis (Dudek et al., 1997) ya que inactiva factores apoptóticos e induce factores anti-apoptóticos (Vincent y Feldman, 2002).

Vía MAP quinasa:

Las proteínas activadas por mitógeno (MAP) pertenecen a la familia de la serin/treonin quinazas que son activadas por multitud de estímulos, incluido el IGF-1.



La autofosforilación del IGFR-1 provoca la fosforilación en un residuo de tirosina de la proteína Shc (Kim et al., 1998). La Shc activada se une al adaptador GRB2 de manera dependiente de IRS, e induce la activación de la vía Ras-ERK (Kim et al., 1998). La activación de esta vía por IGF-1 ha sido relacionada con diferenciación celular y migración (Avruch, 1998; Cobb y Goldsmith, 1995) pero también puede estar relacionada con la regulación de la maquinaria de apoptosis (Hwang et al., 2007; Valentinis et al., 1999).



**Figura 2:** Esquema de las dos vías principales de señalización activadas por la unión de los IGFs al IGFR-1 (sacado de (Kadowaki et al., 1996).

### C. Hipótesis de las somatomedinas

La identificación del IGF-1 como la somatomedina responsable de los efectos de la GH formalizó lo que se conoció como la hipótesis de las somatomedinas (Daughaday et al., 1972). Esta hipótesis decía que la GH liberada por la adenohipófisis actuaba sobre el hígado induciendo la liberación de IGF-1 y este era el responsable de inducir el crecimiento corporal cerrando al mismo tiempo el eje endocrino ya que inhibía la síntesis de GH (Berelowitz et al., 1981). Experimentos posteriores demostraron que el IGF-1 se sintetizaba en prácticamente todos los órganos (Casella et al., 1987; Kajimoto y Rotwein, 1989; Lowe et al., 1988; Lowe et al., 1987) y que su síntesis en otros órganos también era modulada por GH (Roberts et al., 1987). Esto condujo a la modificación de la hipótesis original incluyendo la posibilidad de que los efectos de la

GH fuesen mediados tanto por la acción del IGF-1 circulante como por el IGF-1 producido en los diferentes órganos que actuaría de manera autócrina o parácrina. La importancia relativa de las dos “fuentes” de IGF-1 fue motivo de gran debate. Un momento importante en este debate fue la creación de los ratones LID. Las características de estos animales serán explicadas en detalle ya que son un modelo utilizado en esta tesis.

#### **D. Ratones LID**

La creación de los ratones LID (siglas del inglés “liver IGF-1 deficient”) se reportó en 1999 por el laboratorio de Le Roith (Yakar et al., 1999). En estos animales el gen de *igf-1* fue eliminado exclusivamente en el hígado, la fuente principal de IGF-1 endocrino. La eliminación del gen de *igf-1* se encuentra acoplada a la transcripción del gen de la albúmina, dado que este gen se comienza a transcribir hacia el final de gestación (Tilghman y Belayew, 1982), estos animales poseen una producción normal de IGF-1 hepático durante el desarrollo (Yakar et al., 1999) que comienza a descender a los 10 días de edad. Posteriormente los niveles de IGF-1 en sangre caen hasta un 75% con respecto a los niveles normales como consecuencia directa de la desaparición del IGF-1 hepático puesto que la síntesis en otros órganos como músculo o riñón continúa siendo normal (Yakar et al., 1999). Por lo tanto estos animales poseen una carencia específica del IGF-1 circulante en tanto que el IGF-1 autócrino-parácrino no se ve modificado, transformándolos en un excelente modelo para la comparación de ambas fuentes de IGF-1 (LeRoith et al., 2001).

Los ratones LID poseen un crecimiento normal de todos los órganos y alcanzan tamaños similares a sus controles en ambos sexos (Yakar et al., 1999), en su momento este resultado apoyó al IGF-1 autócrino-parácrino como efector principal de la GH, sin embargo en experimentos posteriores el equipo de Le Roith profundizó en el papel del IGF-1 endocrino como efector de la GH generando un doble transgénico obtenido por la cruce de los ratones LID con, el ratón carente de la ALS generando el ratón LID-ALSKO (Yakar et al., 2002). El ratón carente de ALS poseía una reducción del 60 % de los niveles de IGF-1 en sangre como consecuencia de la disminución de su vida media en sangre y al igual que los ratones LID su crecimiento corporal era normal aunque su el

tamaño final era levemente menor (Ueki et al., 2000). El doble transgénico LID-ALSKO presentaba una reducción aun mayor (85-90 %) de los niveles de IGF-1 circulante y a diferencia de los otros dos modelos presentaba una marcada reducción en el tamaño corporal (Yakar et al., 2002). Estos resultados indicaron que el IGF-1 circulante se encontraba relacionado con el crecimiento corporal inducido por GH y que niveles muy bajos en plasma eran suficiente para que cumpla esta función, no obstante dado que el doble transgénico aun crecía en respuesta a GH estos resultados sugieren que el IGF-1 sintetizado localmente también está involucrado, indicando que tanto el IGF-1 endocrino como el autócrino-parácrino son importantes como efectores de la GH (Russo et al., 2005).

Experimentos posteriores demostraron que a pesar de tener un crecimiento normal los ratones LID presentan múltiples alteraciones como hiperinsulinemia, insensibilidad a insulina en músculo (Yakar et al., 2001), y alteraciones en la hematopoiesis (Welniak et al., 2004). Sumado a esto, los trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que los ratones LID poseen alteraciones en la fisiología cerebral como amiloidosis prematura (Carro et al., 2002) y disminución en la angiogenesis en respuesta a ejercicio (Lopez-Lopez et al., 2004). Indicando que la deficiencia de IGF-1 circulante produce alteraciones que no se encuentran asociadas al crecimiento.

### **E. IGF-1 en el sistema nervioso**

Actualmente se encuentra firmemente establecido que el IGF-1 actúa como un potente factor neurotrófico en el sistema nervioso. Durante el desarrollo del sistema nervioso el IGF-1 juega papel preponderante regulando la diferenciación neuronal (Richard-Parpaillon et al., 2002) y la supervivencia (Cheng et al., 2001; Ozdinler y Macklis, 2006; Sun et al., 2005). Durante la embriogenesis el IGF-1 se expresa en múltiples regiones del cerebro (Bondy, 1991; Garcia-Segura et al., 1991; Han et al., 1987; Rotwein et al., 1987) destacándose la expresión en zonas con gran cantidad de neuronas como la medula espinal la corteza cerebral el hipocampo y el bulbo olfativo (Edmondson et al., 1995; Garcia-Segura et al., 1991). Después del nacimiento la expresión de IGF-1 en el cerebro desciende marcadamente y sus niveles en el cerebro

adulto son muy bajos (Andersson et al., 1988; Rotwein et al., 1987), con la excepción del bulbo olfativo (Werther et al., 1990). De la misma forma la expresión de IGF-II es alta durante el desarrollo prenatal para decaer después del nacimiento. En el cerebro adulto la expresión de IGF-II es mayor que la de IGF-1 pero se encuentra limitada a tejidos no neuronales como el plexo coroideo o las meninges (Stylianopoulou et al., 1988).

La importancia del IGF-1 durante el desarrollo del sistema nervioso queda demostrada por el fenotipo de los ratones carentes de IGF-1 (Liu et al., 1993). Estos animales poseen una disminución en el tamaño del cerebro producto de la reducción en el tamaño de la sustancia blanca como consecuencia de tener menos oligodendrocitos y axones. Además estos animales tienen un menor número de neuronas granulares en el giro dentado, en el bulbo olfativo (Vicario-Abejon et al., 2003) y de interneuronas en el estriado (Beck et al., 1995).

El IGF-1 es un potente factor neurotrófico en el sistema nervioso adulto (Carro y Torres-Aleman, 2006; Russo et al., 2005). *In vitro* previene la apoptosis inducida por  $\beta$ -amiloide (Dore et al., 1999; Dore et al., 1997; Niikura et al., 2001), glutamato (Garcia-Galloway et al., 2003; Vincent et al., 2004), privación de suero (D'Mello et al., 1997; Galli et al., 1995), privación de potasio (Yamagishi et al., 2003; Zhong et al., 2004) y tratamiento con ácido okadaico (Fernandez-Sanchez et al., 1996). Sumado a sus efectos neuroprotectores *in vitro*, indican la alteración en los niveles de IGF-1 puede ser un factor desencadenante de patologías del sistema nervioso (Torres-Aleman, 2000; Trejo et al., 2002). La administración de IGF-1 tras protocolos de isquemia-hipoxia reduce el área de infarto (Brywe et al., 2005; Garcia-Galloway et al., 2003; Liu et al., 2001; Wang et al., 2000) y esto correlaciona con la inducción de IGF-1 y de IGF-BPs en la zona de lesión tras la isquemia (Breese et al., 1996; O'Donnell et al., 2002; Sandberg Nordqvist et al., 1996) sugiriendo que la expresión de IGF-1 es neuroprotectora. Experimentos realizados en nuestro laboratorio reforzaron esta correlación sugiriendo que la muerte en la zona cercana a la lesión se produce por una inhibición específica de la vía de la PI3K activada por IGF-1 (Garcia-Galloway et al., 2003). Asimismo, los niveles de IGF-1 en suero de pacientes con esclerosis-lateral-amiotrófica se encuentran anormalmente disminuidos y esto puede contribuir al desarrollo de la patología (Torres-Aleman et al., 1998; Wilczak et al., 2003). Además el IGF-1 previene el avance de la enfermedad en

modelos animales y en humanos (Dobrowolny et al., 2005; Nagano et al., 2005; Ozdinler y Macklis, 2006).

Probablemente la mejor demostración de la relación existente entre la alteración en los niveles de IGF-1 y una enfermedad neurodegenerativa sea la enfermedad de Alzheimer (Carro y Torres-Aleman, 2004). El desarrollo de la enfermedad se correlaciona con niveles bajos de IGF-1 circulante en humanos (Mustafa et al., 1999; Tham et al., 1993) y los experimentos realizados en nuestro, y otros laboratorios, han demostrado que el IGF-1 previene la aparición de los síntomas relacionados con el desarrollo del síndrome, incluyendo la formación de placas de amiloide (Carro et al., 2006a; Carro et al., 2002), y de formas hiperfosforiladas de la proteína tau (Carro et al., 2006a; Hong y Lee, 1997). Sumado a esto el tratamiento con IGF-1 previene la aparición de las deficiencias cognitivas asociados al síndrome en modelos animales (Carro et al., 2006a; Carro et al., 2002; Carro et al., 2006b). Finalmente se ha demostrado que el bloqueo de la entrada del IGF-1 al cerebro es suficiente para generar una patología similar (Carro et al., 2005; Carro et al., 2006b).

El tratamiento con IGF-1 también ha resultado beneficioso para la reversión o prevención de la aparición de ataxias cerebelosas (Fernandez et al., 1998; Fernandez et al., 1999; Zhong et al., 2005) o para modelos de neurodegeneración por agentes neurotóxicos (Carro et al., 2001). Finalmente el desarrollo de alteraciones neurológicas asociadas a la diabetes ha sido relacionado de manera asidua con alteraciones en el sistema del IGF-1 (Ishii, 1995) pero esto será discutido en otra sección.

La relación potencial entre el eje somatotrópico y las disfunciones asociadas al envejecimiento han sido estudiadas en profundidad. La vejez se relaciona con los descensos en el funcionamiento del eje somatotrópico (IGF-1, GH) durante la senescencia (Ceda et al., 2005; Corpas et al., 1993). Los niveles de IGF-1 descienden durante la senescencia y se correlacionan con el desempeño cognitivo en ancianos (Aleman et al., 1999). La administración de IGF-1 revierte muchas las alteraciones asociadas a la vejez, como la angiogénesis (Lopez-Lopez et al., 2004) la neurogénesis (Trejo et al., 2001) la plasticidad sináptica (Ramsey et al., 2004) y el aprendizaje (Svensson et al., 2006). Sugiriendo que la alteración del eje somatotrópico se relaciona con el proceso de envejecimiento cerebral (Trejo et al., 2004).

El IGF-1 es un modulador potente de la excitabilidad neuronal y la plasticidad sináptica. El IGF-1 incrementa las corrientes de calcio de tipo “L” en neuronas granulares de cerebelo (Bence-Hanulec et al., 2000; Blair et al., 1999; Blair y Marshall, 1997; Marshall et al., 2003), y las corrientes de calcio de tipo “N” en corteza motora (Shan et al., 2003) y en neuronas granulares de cerebelo (Bence-Hanulec et al., 2000). Por otra parte los trabajos realizados en nuestro laboratorio indican que el IGF-1 circulante incrementa la excitabilidad de las neuronas de purkinje en el cerebelo (Carro et al., 2000) y de las neuronas de los núcleos de cordón posterior (Nuñez et al., 2003) por medio de bloqueo de las corrientes de potasio de tipo “A” efecto que también ha sido observado en neuronas hipocampales (Xing et al., 2006). De la misma forma los trabajos realizados en el laboratorio han demostrado que el IGF-1 actúa sobre receptores de glutamato incrementando específicamente las respuestas de los receptores de kainato e inhibiendo las respuestas de los receptores de AMPA (Gonzalez de la Vega et al., 2001). Otros autores demostraron que el efecto inhibitorio sobre las respuestas de los receptores de tipo AMPA se relacionaba con la reducción de la cantidad de receptores en membrana, demostrando además que la aplicación de IGF-1 era suficiente para inducir depresión sináptica a largo plazo en cerebelo (1993; Wang y Linden, 2000), ver también (Castro-Alamancos y Torres-Aleman, 1993).

Los efectos del IGF-1 en la actividad neuronal varían entre regiones del sistema nervioso y tipos neuronales; a diferencia de lo observado en cerebelo, un trabajo reciente reporta que en CA1 del hipocampo el IGF-1 incrementa la transmisión sináptica por un mecanismo post sináptico dependiente de receptores AMPA (Ramsey et al., 2005) y a diferencia de lo observado en hipocampo en los núcleos del cordón posterior y en el cerebelo (Carro et al., 2000; Nuñez et al., 2003; Xing et al., 2006), inhibe las neuronas del núcleo supraóptico (Ster et al., 2005) e inhibe la activación de terminales colinérgicas en el giro dentado (Hawkes et al., 2006). Por lo tanto el IGF-1 actúa como un modulador de la actividad neuronal en múltiples zonas del cerebro ejerciendo efectos diferenciales de acuerdo a la zona estudiada.

## **F. IGF-1 circulante y sistema nervioso**

Debido a que el IGF-1 se produce dentro del cerebro, el debate sobre la importancia del IGF-1 endocrino vs. el autocrino-paracrino se ha trasladado también al sistema nervioso (Carro y Torres-Aleman, 2006; Russo et al., 2005). Los trabajos realizados en nuestro laboratorio apuntan a que el IGF-1 circulante desempeña un papel central. Los niveles de IGF-1 en suero se encuentran alterados en múltiples patologías tanto en humanos como en modelos animales (Busiguina et al., 2000). El IGF-1 entra al cerebro a través del plexo coroideo en respuesta al ejercicio físico (Carro et al., 2000) y es responsable de sus efectos neuroprotectores (Carro et al., 2001). El IGF-1 circulante modula la excitabilidad neuronal (Carro et al., 2000; Nuñez et al., 2003), la angiogénesis en el cerebro adulto (Lopez-Lopez et al., 2004) y media del aumento en la neurogénesis en el giro dentado inducida por ejercicio físico (Trejo et al., 2001). El IGF-1 circulante revierte la ataxia cerebelosa en modelos animales (Fernandez et al., 1998) y previene la degeneración de la vía olivo-cerebelar (Fernandez et al., 1999); interviene en el limpieza del péptido  $\beta$ -amiloide previniendo el desarrollo de la enfermedad de alzheimer en modelos animales (Carro et al., 2005; Carro et al., 2002). Además el bloqueo de la entrada del IGF-1 circulante a través del plexo coroideo es suficiente para generar una patología similar al alzheimer (Carro et al., 2006a; Carro et al., 2006b). El mecanismo de entrada del IGF-1 circulante a través del plexo coroideo involucra a su receptor y a la proteína multi-cargo megalina (Carro et al., 2005).

Aunque parte de estos trabajos apuntan a que la entrada de IGF-1 se produce a través de la barrera plexo coroideo-líquido cefalorraquídeo, el receptor de IGF-1 también se encuentra en el endotelio de los capilares cerebrales y en los pies astrocitarios que forman la barrera hematoencefálica (Garcia-Segura et al., 1997) y tras la inyección sistémica el IGF-1 es detectable en capilares cerebrales (Reinhardt y Bondy, 1994) sugiriendo que también podría entrar a través de la barrera hematoencefálica de los capilares cerebrales.

El modelo de los ratones LID ha sido utilizado para distinguir los efectos del IGF-1 circulante y local en el sistema nervioso (Carro et al., 2002; Carro et al., 2006b; Lopez-Lopez et al., 2004). Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio

estudiando el aprendizaje en estos ratones indicaron que poseían deficiencias en la memoria espacial y alteraciones morfológicas como la atrofia del giro dentado del hipocampo. Con el objetivo de investigar las causas que originan estas deficiencias en el aprendizaje espacial, nos propusimos investigar la plasticidad sináptica en los ratones LID.

Aunque se encuentra firmemente establecido que el IGF-1 circulante actúa como un modulador de la fisiología del SNC (Carro y Torres-Aleman, 2006), existe sin embargo un vacío en cuanto a las condiciones en las que el IGF-1 ejerce sus acciones. Hasta el momento, el ejercicio físico ha sido el único paradigma en el cual se observa un aumento agudo de la entrada de IGF-1 circulante al cerebro (Carro et al., 2000), pero el ejercicio físico también incrementa los niveles de IGF-1 en sangre así como el flujo sanguíneo cerebral (Ide y Secher, 2000; Kraemer y Ratamess, 2005). ¿Es el ejercicio físico el único paradigma por el cual se incrementa la entrada de IGF-1 circulante al cerebro? En esta tesis investigaremos los mecanismos de entrada del IGF-1 al cerebro en paradigmas que no involucren ejercicio físico.

## **G. Neuropatía diabética**

La diabetes mellitus es un síndrome definido por la presencia de hiperglicemia. En la mayoría de los casos el origen de la hiperglicemia es atribuible a alteraciones en el funcionamiento de la insulina, hormona responsable de disminuir los niveles de glucosa en sangre. Estas alteraciones pueden ser causadas por una disminución en los niveles de insulina o una disminución en la respuesta de los tejidos diana a la hormona. La contribución de estos dos factores es la base para la clasificación de las distintas formas de diabetes.

Las dos formas más comunes de diabetes son conocidas como diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. La diabetes tipo 1 representa el 10% de los casos en humanos. Se caracteriza por deficiencias en la producción de insulina causadas por la destrucción auto-inmune de las células tipo  $\beta$  del páncreas. La diabetes tipo 2 tiene una incidencia diez veces mayor que la diabetes tipo 1 y en el 80% de los casos se encuentra asociada a obesidad. Las causas de la aparición de la diabetes tipo 2 no han sido del todo



comprendidas, sus tres alteraciones metabólicas características son: disminución en la producción de insulina por el páncreas, disminución en la respuesta de los tejidos diana a la acción de la hormona e incremento en la producción de glucosa por el hígado (Stephen, 2003).

La diabetes también se caracteriza por la alteración del eje somatotrópico (GH e IGF-1). Los pacientes diabéticos poseen niveles bajos de IGF-1 y altos de GH (Hansen y Johansen, 1970; Maes et al., 1986). Por otra parte En los modelos animales los niveles de IGF-1 son bajos tanto en suero (Maes et al., 1986) como en el sistema nervioso central y periférico (Busiguina et al., 1996; Wuarin et al., 1994). La interacción entre el eje somatotrópico y la insulina se produce a múltiples niveles; en el plano endocrino la producción de IGF-1 se estimula por la insulina, de esta forma los niveles bajos de insulina en pacientes diabéticos determinan bajos niveles de IGF-1 y, como consecuencia, altos niveles de GH. A su vez la GH disminuye la sensibilidad a insulina de sus tejidos diana, en tanto que el IGF-1 la incrementa (Holt et al., 2003; Ranke, 2005). Esta interacción profunda entre el eje somatotrópico y la insulina queda reflejada en modelos animales de alteraciones del eje somatotrópico, en los cuales se generan estados de pre-diabetes (Ueki et al., 2006; Yakar et al., 2001) o de diabetes abierta (Devedjian et al., 2000; Fernandez et al., 2001). Asimismo la administración de IGF-1 ha demostrado ser una estrategia terapéutica efectiva para incrementar la sensibilidad a insulina en pacientes diabéticos (Acerini et al., 1998; Carroll et al., 2000; Carroll et al., 1997; Cheetham et al., 1993), o para el tratamiento de síndromes de resistencia a insulina severos (Kuzuya et al., 1993; Schoenle et al., 1991; Usala et al., 1992).

Durante el desarrollo de la diabetes, en el paciente aparecen alteraciones que producen un mal funcionamiento de múltiples órganos. Las alteraciones se pueden clasificar en tres tipos, alteraciones microvasculares, macrovasculares y neuropatías (DCCT, 1993; Pickup JC, 1994)). La neuropatía es la complicación mas frecuente asociada a la diabetes y una de las mayores causas de morbilidad por su relación con la aparición de úlceras en “el pie diabético (Pickup JC, 1994). La incidencia de la neuropatía diabética es del 7% de los enfermos diabéticos dentro del primer año de diagnostico de la enfermedad. Este porcentaje se incrementa al 50% de los enfermos tras 25 años de la enfermedad (Pickup JC, 1994). El control estricto de los niveles de glucosa disminuye en un 60 % la incidencia de la neuropatía en los enfermos de

diabetes de tipo 1 (DCCT, 1993), indicando que la hiperglicemia tiene un papel central pero no absoluto en el desarrollo del síndrome.

La neuropatía se presenta de varias formas diferentes siendo la más común la polineuropatía periférica simétrica que, desde este momento denominaremos neuropatía diabética (Greene et al., 1992). La primera alteración indicativa del desarrollo de la neuropatía diabética es una disminución asintomática de la velocidad de conducción en los nervios periféricos. Por este motivo siempre se ha pensado que se trata de un síndrome originado en el sistema nervioso periférico. En las primeras etapas de la neuropatía diabética se desarrolla una hiperalgesia caracterizada por sensación de hormigueo. A lo largo del desarrollo del síndrome se produce una disminución en la sensibilidad a la vibración y a la temperatura y un aumento en el umbral de detección del dolor (Sima y Sugimoto, 1999). Estas alteraciones acompañadas por las complicaciones vasculares producen un gran riesgo de daño en las extremidades inferiores.

Los enfermos diabéticos sufren también complicaciones neurológicas que afectan al sistema nervioso central. Sin embargo estas alteraciones no han sido muy estudiadas y su fisiopatología no ha sido comprendida (Biessels et al., 1999; Biessels et al., 1994). Particularmente se sabe muy poco sobre las alteraciones en la vía somatosensorial central aun cuando la percepción somatosensorial suele encontrarse alterada en los enfermos diabéticos. Los estudios neuropsicológicos indican que los pacientes diabéticos presentan deficiencias en funciones cognitivas en particular memoria, aprendizaje y procesamiento de información compleja (Tun et al., 1990). Los estudios neurofisiológicos realizados a pacientes diabéticos reportan incrementos en las latencias de potenciales evocados de múltiples modalidades sensoriales (Di Mario et al., 1995).

Los modelos animales de diabetes, en particular el modelo de diabetes de tipo 1 generado por el tratamiento de ratas con streptozotocina (ratas-STZ) han sido de gran utilidad para determinar el curso temporal de las alteraciones neurofisiológicas en la neuropatía diabética. Las deficiencias en la velocidad de conducción de los nervios motores y sensitivos aparecen a las pocas semanas de la inducción de diabetes y se incrementan en los siguientes 2-3 meses (Biessels et al., 1999; Moore et al., 1980). Las

ratas-STZ presentan lesiones estructurales en el cerebro y alteraciones en la velocidad de conducción central imitando en estos aspectos a los enfermos diabéticos de tipo 1 humanos.

Se ha postulado que la caída en los niveles de IGF-1 contribuye a la aparición de las alteraciones neurológicas asociadas a la diabetes (Ishii, 1995). Los niveles de IGF-1 plasmáticos se encuentran reducidos en los enfermos diabéticos (Tan y Baxter, 1986) y esta reducción es mayor en los pacientes que presentan neuropatía (Guo et al., 1999). Asimismo, las ratas -STZ presentan niveles reducidos de IGF-1 en plasma (Maes et al., 1983), nervios (Wuarin et al., 1994) y cerebro (Busiguina et al., 1996). Apoyando esta hipótesis la administración de IGF-1 previene la aparición de alteraciones cognitivas (Lupien et al., 2003) y de neuropatías periféricas en ratas diabéticas de tipo I y II, sin modificar los niveles de glucosa (Ishii y Lupien, 1995; Schmidt et al., 1999). Asimismo estudios recientes sugieren que los efectos del IGF-1 en la neuropatía diabética pueden ser producto de su acción en el sistema nervioso central (Brussee et al., 2004).

En la segunda parte de esta tesis investigaremos la relación entre las alteraciones del sistema somatosensorial central y periférico en la neuropatía diabética y como se modifican por el tratamiento con IGF-1.



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



El objetivo general de esta Tesis Doctoral es entender la acción del IGF-1 circulante sobre el sistema nervioso. Como se ha comentado en la introducción numerosos estudios relacionan al IGF-1 circulante en sangre con procesos asociados a protección frente a enfermedades neurodegenerativas o lesiones neuronales. Además el IGF-1 ha sido caracterizado como un modulador de la plasticidad sináptica y el aprendizaje. Por tanto, investigaremos el papel del IGF-1 circulante como modulador de la plasticidad sináptica en el sistema nervioso. Para ello utilizaremos a los ratones LID como modelo de deficiencias de IGF-1 circulante sin consecuencias funcionales severas. Teniendo en cuenta que las deficiencias en IGF-1 provocan cambios importantes en la actividad neuronal utilizaremos la diabetes inducida en la rata como un modelo de patología para estudiar los efectos del descenso del IGF-1 circulante. Para ello utilizaremos el modelo de ratas diabéticas por inyección de STZ y concentraremos nuestro análisis en el estudio de la relación de IGF-1 con el desarrollo de la neuropatía diabética periférica y central.

## **A. Hipótesis**

El IGF-1 circulante en sangre es un factor trófico principal para el sistema nervioso, de manera que su entrada se encuentra regulada espacial y temporalmente y el descenso de sus niveles tiene consecuencias funcionales en la transmisión de la información o la plasticidad en el sistema nervioso.

El IGF-1 puede provocar cambios importantes en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del Sistema Nervioso Central que podrían explicar cambios en la transmisión de los estímulos sensoriales en los enfermos de diabetes así como en otras patologías asociadas a la disminución de IGF-1 circulante.

## **B. Objetivos**

- Estudiar la plasticidad sináptica en los ratones LID:  
Utilizando técnicas electrofisiológicas de registro extracelular en animales anestesiados y en registros en rodajas de hipocampo estudiaremos la plasticidad

sináptica en los ratones LID, concentrándonos en la potenciación sináptica a largo plazo en el giro dentado del hipocampo.

- Investigar los mecanismos que regulan la entrada de IGF-1 circulante al cerebro: Utilizando ensayos de ELISA y de inmunodetección, analizaremos los mecanismos de entrada del IGF-1 circulante en sangre y su relación con la actividad neuronal.

- Estudiar los cambios en la transmisión somatosensorial en ratas diabéticas y el efecto del tratamiento con IGF-1 en el desarrollo de la neuropatía diabética central y periférica:

Realizando ensayos comportamentales, bioquímicos y procedimientos electrofisiológicos de registro de potenciales evocados en animal anestesiado, estudiaremos el desarrollo de la neuropatía diabética en el sistema nervioso central y periférico en etapas tempranas de la diabetes inducida por STZ e investigaremos los efectos terapéuticos del tratamiento con IGF-1.



## MATERIALES Y MÉTODOS



## **A. Animales**

Los experimentos fueron realizados en ratas machos de la cepa Wistar de 250 a 300 gr. de peso al comienzo del experimento. Los animales fueron criados y mantenidos a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  de temperatura en ambientes de iluminación controlada con ciclos alternativos de 12 horas de luz/oscuridad en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid o del Instituto Cajal del CSIC. La comida y el agua fueron administradas “ad libitum”. Se minimizó el número y el sufrimiento de los animales siguiendo la normativa de la Unión Europea 86/609/EEC.

También se utilizaron ratones machos de 8 a 16 semanas de edad de fondo genético C-57/JLB6. Los ratones LID (siglas del inglés liver IGF-1 deficient) fueron generados por eliminación del gen de IGF-I en el hígado mediante el sistema albúmina-Cre/Lox (Yakar et al., 1999). La eliminación del gen se traduce en una marcada disminución del IGF-I circulante (40% de los niveles normales). El genotipo de los ratones LID fue verificado rutinariamente por la reacción en cadena de polimerasa. Se utilizaron como controles los hermanos de camada Lox+/- Cre.

## **B. Métodos Electrofisiológicos**

### **B.1. Registros electrofisiológicos en rodajas**

Los registros extracelulares fueron realizados en rodajas sagitales de hipocampo de ratones controles y LIDs de 8 a 16 semanas de edad. Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (35 mg/kg) y decapitados después de la desaparición del reflejo de retirada de la pata. Se extrajo el cerebro rápidamente y se cortó sagítalmente en rodajas de 350 a 400  $\mu\text{M}$  de espesor inmerso en una solución refrigerada con la siguiente composición (en mM): sacarosa 248, KCl 3,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25,  $\text{NaHCO}_3$  26, dextrosa 10,  $\text{CaCl}_2$  0.5,  $\text{MgCl}_2$  6, 1 ácido ascórbico, 3 ácido pirúvico, burbujeada con 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$ , pH 7,4. Las rodajas que contenían hipocampo fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente en una cámara rellena con líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) con la siguiente composición: (en mM): NaCl 124, KCl 3,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25,  $\text{NaHCO}_3$  26, dextrosa 10,  $\text{CaCl}_2$  2,  $\text{MgSO}_4$  2, ácido ascórbico 1 y ácido pirúvico 3, burbujeada con 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$ , pH 7,4. En el

momento del registro las rodajas fueron transferidas a una cámara de registro montada en un microscopio vertical y perfundidas a una velocidad de 3 a 6 ml/min., con LCR artificial de composición similar a la anterior pero sin ácido ascórbico ni ácido pirúvico.

Los registros extracelulares fueron obtenidos por medio de electrodos de vidrio de 2-3 MΩ rellenos con NaCl 150 mM. El electrodo de registro se colocó en los dos tercios exteriores de la capa molecular del giro dentado. La estimulación eléctrica se realizó por medio de un electrodo bipolar de platino/iridio (World Precision Instruments) colocado a 100 μm del electrodo de registro hacia la entrada al hipocampo de las fibras del tracto perforante. La estimulación eléctrica consistió en pulsos cuadrados de 0.1 ms de duración generados por medio de un generador de pulsos cuadrados conectado a una unidad aisladora de estímulo (Cybertec), con una frecuencia de estimulación de 0.05 Hz. La intensidad de estimulación utilizada fue del doble del umbral para poder distinguir el potencial sináptico poblacional del ruido de fondo. En condiciones control, las respuestas se registraron al menos durante 20 minutos para comprobar que su amplitud y pendiente se mantenían estables. La estimulación tetánica consistió en la aplicación de 3 trenes de estímulos de un segundo de duración a 100 Hz separados por 10 s.

Los registros fueron amplificados y filtrados utilizando un amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments) digitalizados por medio de una interfase Digidata 1200 (Axon Instruments) y posteriormente adquiridos y analizados por el medio del programa Clampex 8.0 (Axon Instruments). En estos experimentos la transmisión GABAérgica fue bloqueada añadiendo a la solución de perfusión bicuculina 10 μM y picrotoxina 100 μM (Sigma).

## **B.2. Procedimientos electrofisiológicos en animales anestesiados**

Para el registro electrofisiológico los animales fueron anestesiadas con pentobarbital (33 mg/Kg) intraperitonealmente. Además se administró el anestésico local lidocaína (1%; Xilonibsa®) en todas las incisiones y se añadieron dosis complementarias de anestésico cuando se juzgó necesario. Los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico (David Kopf) provisto de un adaptador nasal especialmente diseñado para su conexión a un respirador (Harvard) desde el que se controló el CO<sub>2</sub> espirado y se ventiló artificialmente a 20 ciclos/ min. Durante el proceso quirúrgico se mantuvo la temperatura del animal a 37 °C con una manta eléctrica (Gaymar Industries).

Los electrodos para el registro de los potenciales evocados en la corteza SI o en el núcleo gracil fueron colocados estereotáxicamente siguiendo las coordenadas estereotaxicas de los atlas de cerebro de rata y ratón (G Paxinos, 1986; G Paxinos, 2003), y están tomadas desde los siguientes puntos: eje anterior-posterior (A-P) desde bregma; eje medial-lateral (L) desde la línea media; eje dorso-ventral (P) desde la superficie del cráneo si no se indica lo contrario.

### **B.2.1. Medición de la velocidad de conducción de nervios motores**

El nervio ciático fue expuesto a la altura de la fosa poplítea y estimulado en dos puntos separados por 1,5 cm. de distancia por medio de un electrodo bipolar de acero inoxidable (World Precision Instruments). La respuesta muscular se registró en el bíceps femoral por medio de una aguja de acero inoxidable insertada intramuscularmente. El nervio fue estimulado por medio de un generador de pulsos cuadrados (Grass S88) conectado a una unidad aisladora de estímulo (Grass SIU) con pulsos de 100  $\mu$ s de duración aplicados a 0.5 Hz de frecuencia. La intensidad del estímulo fue ajustada al doble del valor necesario para iniciar la contracción muscular (10-50  $\mu$ A). El registro fue filtrado (0.1-3 KHz.), amplificado por medio de un preamplificador P15 (Grass) y monitorizado por medio de un osciloscopio analógico (Tecktronick). La velocidad de conducción de los nervios motores (VCNM) se calculó como el cociente entre la diferencia de la latencia de la respuesta motora evocada por las estimulación en los dos puntos y la distancia entre estos dos puntos (1,5 cm.).

### **B.2.2. Potenciales evocados somestésicos por la estimulación del nervio ciático**

Se registraron los potenciales evocados por la estimulación del nervio ciático, a la altura de la fosa poplítea, en el núcleo gracil y en la corteza SI. Para el registro de la actividad eléctrica del núcleo gracil se realizó una incisión en la piel a nivel de la línea media desde el occipucio hasta los segmentos cervicales inferiores. Tras corta la inserción de la musculatura de la nuca sobre el occipucio y sobre la membrana occipito-atloidea, se extirpó dicha membrana junto con la duramadre para dejar abierta la cisterna magna y el tronco del encéfalo al descubierto. Los NCD se localizaron por visualización directa bajo el microscopio de disección, utilizando como referencia el obex. Las coordenadas estereotáxicas que corresponden al núcleo gracil fueron las siguientes: A-P: -13.6 a -14.6 mm; L: 0.2 a 0.5 mm desde bregma; profundidad: 0.5 mm

desde la superficie del núcleo. Se añadió aceite mineral para evitar la desecación de las estructuras nerviosas.

Para el registro de la actividad cortical se efectuó una incisión cutánea a nivel de la línea media, se separó la musculatura y se retiró el periósteo, dejando expuesto el cráneo, pudiendo así visualizar el lambda y el bregma para situarlos en el mismo plano horizontal. Se realizó un trépano sobre la calota a nivel de la representación cortical de SI de las patas traseras según las coordenadas estereotáxicas (AP: 1-3 mm, L: 2,5-4 mm, P 1 mm desde el bregma).

Para la generación de los potenciales evocados en la corteza SI por estimulación eléctrica de los NCP se utilizó un electrodo de alambre trenzado recubierto con teflón insertado en los NCP; el estímulo consistió en pulsos de 0.1 ms de duración aplicados a 0.5 Hz. de frecuencia. La intensidad del estímulo fue ajustada al doble de la intensidad necesaria para evocar un potencial en la corteza SI (50-150  $\mu$ A). Los potenciales evocados fueron registrados por medio de macroelectrodos de tungsteno (0,5 a 1 M $\Omega$  World Precision Instruments). Los estímulos eléctricos fueron similares a los utilizados para las mediciones de VCNM. La frecuencia de estimulación fue de 0.5 Hz y la intensidad del estímulo fue ajustada al doble de la intensidad necesaria para evocar un potencial en ambos puntos de registro (10-50  $\mu$ A). Los registros fueron filtrados (1 a 1.000 Hz) y amplificados por medio de un preamplificador AC P15 (Grass) y un adecuador de señales (Cybertec). Los registros de la actividad del núcleo gracil y de la corteza cerebral fueron adquiridos mediante un conversor analógico/digital (frecuencia de muestreo 10 KHz; Cambridge Electronics Design) y almacenados en un ordenador para su posterior análisis por medio del programa Spike 2 (Cambridge Electronics Design). Junto a los registros se almacenaron los pulsos de sincronismo de los estímulos.

### **B.2.3. Estimulación eléctrica de las vibrisas**

Los experimentos se realizaron en ratas anestesiadas con uretano (1.8 gr./Kg.). Para la estimulación eléctrica de las vibrisas se insertaron subcutáneamente dos agujas de acero inoxidable de 0.3 mm. de grosor, conectadas a un generador de pulsos (Grass). Las agujas fueron colocadas en los extremos rostral-dorsal y caudal-ventral de la almohadilla de las vibrisas. El estímulo consistió en un pulso cuadrado de 1 ms de duración aplicado a 2 o a 5 Hz de acuerdo al experimento. El estímulo fue ajustado al

doble de la intensidad necesaria para inducir un movimiento observable en las vibrisas de la almohadilla estimulada. Utilizando esta intensidad de estimulación no se observa ningún movimiento en las vibrisas de la almohadilla no estimulada. Los potenciales evocados se registraron en la corteza SI correspondientes a la representación de la vibrisas (coordenadas: A-P: -3 mm; L: 5 mm.; P: 1 mm).

#### **B.2.4. Estimulación eléctrica del pedúnculo cerebeloso inferior**

Los experimentos se realizaron en ratas anestesiadas con uretano (1,8 gr/kg). La estimulación eléctrica se realizó por medio de alambre trenzado recubierto de Teflón insertado en las siguientes coordenadas: A-P: -11mm; L: 3 mm; P: 5 mm. El estímulo consistió en pulsos cuadrados de 0.1 mseg de duración (50-100  $\mu$ A) aplicados a 5Hz. Para comprobar la especificidad de la estimulación se registraron potenciales evocados en la corteza cerebelosa ipsilateral. El registro se realizó por medio de macroelectrodos de tungsteno (0,5 a 1 M $\Omega$ , World Precision Instruments) en las siguientes coordenadas: A-P:-11 mm; L: 2 mm; P: 1mm.

#### **B.2.5. Potenciales evocados hipocampales y neocorticales**

Los experimentos se realizaron en ratones anestesiados con pentobarbital (35 mg/kg). Las respuestas fueron registradas por medio de macroelectrodos de tungsteno (0,5 a 1 M $\Omega$ , World Precision Instruments) colocados en el giro dentado del hipocampo (A-P:-2.3 mm; L: 2 mm; P: 1.5 mm) o en el neocortex (A-P: -2,3 mm; L: 2 mm; P: 0.5 mm). La estimulación eléctrica se realizó en el tracto perforante (A-P: -2,5; L: 0.5; P: 1,5 mm) o en el neocortex contralateral (mismas coordenadas de registro) por medio de alambre trenzado recubierto de Teflón. La estimulación eléctrica consistió en pulsos cuadrados de 100  $\mu$ A de intensidad y 0.3 mseg. de duración aplicados a 0.5 Hz de frecuencia. Los potenciales evocados se registraron al menos durante 20 minutos para comprobar que su amplitud y pendiente se mantenían estables. Sólo se tomaron en cuenta para el análisis los registros que mostraron una variación en la línea de base menor al 10 %. La estimulación tetánica consistió en la aplicación de tres trenes de estímulos de 500 mseg de duración a 100 Hz de con un intervalo entre trenes de 2 seg.

## **C. Estudios comportamentales. Prueba “Plantar Test”**

La evaluación de la sensibilidad térmica se realizó por medio de la prueba de Plantar Test (Hugo Basile). Se colocan los animales en cámaras plásticas con suelo de vidrio translúcido. Se posiciona una fuente de radiación infrarroja móvil debajo de la pata trasera del animal. Se expone la pata trasera a la radiación infrarroja a través del vidrio del suelo y se contabiliza el tiempo que tarda el animal en levantar la pata para retirarla de la fuente de radiación infrarroja. Con el objeto de evitar falsas respuestas debido a movimientos espontáneos, los animales fueron habituados al aparato colocándolos en las cámaras de plástico durante media hora los tres días previos al ensayo. De esta manera se logra que el día del ensayo los animales permanezcan quietos, acostados en la cámara plástica sin acicalarse ni alzarse en sus patas traseras. El ensayo se realiza el mismo día por triplicado, en la misma pata, en cada animal, contabilizándose como tiempo de respuesta el promedio de las tres mediciones.

### **C.1. Métodos Quirúrgicos**

#### **C.1.1. Inyección intracerebroventricular de IGF-1**

Las inyecciones intracerebroventriculares se realizaron en ratas con las siguientes coordenadas estereotaxicas: A-P: -1 mm; L: 1.2 mm; P: 4 mm. Se inyectaron 5 µg de IGF-1 humano (GroPep) disueltos en 10 µl de salino inyectándose un volumen de 5 µl por ventrículo por medio de una jeringa de precisión (Hamilton).

#### **C.1.2. Canulación de la arteria carótida**

La canulación de la arteria carótida izquierda se realizó en ratas, en los experimentos de captación de IGF-I en respuesta a actividad eléctrica. El animal anestesiado (uretano, 1.6 gr/kg) fue colocado boca arriba, se realizó una incisión longitudinal en la piel ventral del cuello para exponer los músculos subyacentes. Los músculos fueron apartados hasta dejar expuesta la carótida izquierda localizada lateralmente a la traquea pegada al nervio vago. Se realizaron dos lazos de sutura quirúrgica separados por 1 cm alrededor de la arteria. El lazo del extremo cardíaco del vaso se cerró eliminando la circulación de sangre, luego se realizó un pequeño corte en la arteria evitando seccionarla. Por el orificio realizado se introdujo 0.5 cm de canula de 0.58 mm de



diámetro interno y 0.965 mm de diámetro externo (Becton Dickinson), acoplada por el otro extremo a una jeringa de 1 ml. El lazo de sutura del extremo cervical se anudó en torno a la cánula sujetándola. Una vez canulada la arteria, se procedió a la inyección de la solución deseada por medio de presión positiva. Al finalizar la inyección se extrajo el extremo de la cánula que se encontraba dentro del vaso, cerrando a continuación el lazo de sutura cervical evitando así el sangrado. Se suturó la piel y se continuó con el experimento.

### **C.1.3 Administración crónica de IGF-1**

Para estudiar el efecto de IGF-1 se administró, en ratas y ratones, IGF-I humano (GroPep) en solución salina por medio de bombas osmóticas implantadas subcutáneamente (Fernandez et al., 1998). Se utilizaron bombas osmóticas (Alzet) del modelo 2004 (0.25  $\mu$ l/hora) para la infusión durante un mes en ratas, del modelo 1002 (0.25  $\mu$ l/hora) para la infusión en ratones durante 10 días y del modelo 1004 (0.11  $\mu$ l/hora) para la infusión en ratones durante 1 mes. Administrándose una dosis de 50  $\mu$ g/kg.día de IGF-I en todos los casos. El grupo de animales control tratados con bombas osmóticas con salino fue omitido basándose en numerosos estudios previos demostrando la falta de efectos observables (Fernandez et al., 1998).

## **D. Obtención de las muestras**

### **D.1. Tejido Nervioso**

Para la obtención de muestras de hipocampo, cerebelo, corteza somestésica y bulbo olfativo, el animal fue sacrificado por decapitación y el cerebro extraído y colocado en un placa de Petri rellena con solución salina refrigerada donde se realizó la disección de la/ las estructuras deseadas. Una vez disecado el tejido se congeló en nieve carbónica y se conservó a -80 ° hasta su procesamiento.

Si el objetivo del experimento era la medición de niveles de IGF-I en el cerebro, los animales fueron perfundidos transcárdialmente con solución salina refrigerada, previamente a la decapitación, para lavar la sangre del organismo.

Para la obtención de muestras de la corteza somestésica primaria en el área correspondiente a la representación de los barriles, el cerebro fue extraído y congelado en su totalidad. Posteriormente el cerebro fue cortado utilizando un vibratomo de congelación para localizar en el eje anteroposterior la zona correspondiente a corteza de barriles.

El cerebro fue cortado sagitalmente en rodajas de 500  $\mu\text{m}$  hasta la fusión medial de las comisuras anteriores-anteriores (correspondiente a -0.3 mm desde Bregma de acuerdo a Paxinos (1986)). Al llegar a este punto se cortó una rodaja sagital de 2.5 mm de espesor, de ella se extrajo la corteza parietal realizando dos cortes perpendiculares a la superficie cortical a 4.5 y 7 mm de la línea media. Siguiendo esta técnica el bloque de tejido obtenido se mantiene congelado durante todo el proceso garantizando la estabilidad de las proteínas. La muestra de tejido obtenida por esta metodología es de menor volumen que el total de la corteza de barriles y, de acuerdo a las coordenadas, se encuentra contenida dentro de la corteza de barriles. De esta forma hemos intentado minimizar la contaminación con tejido cortical o subcortical que no corresponda a este tipo de corteza cerebral.

## **D.2. Extracción de Suero**

Se extrajo el suero por punción cardiaca en el momento previo al sacrificio del animal. La sangre obtenida se dejó reposar a temperatura ambiente 2 horas, posteriormente se centrifugó a 4 °C a 5.000 RPM durante 15 minutos. Al finalizar la centrifugación se recogió el suero del sobrenadante y se congeló a -20 °C hasta su utilización.

## **D.3. Extracción de líquido cefalorraquídeo (LCR)**

Se extrajo LCR de ratas por medio de la punción de la cisterna magna. Los animales fueron colocados en un aparato exterotáxico (David Kopf) donde se realizó una incisión en la piel a nivel de la línea media desde el occipucio hasta los segmentos cervicales inferiores. Tras cortar la inserción de la musculatura de la nuca sobre el occipucio y sobre la membrana occipito-atloidea se realizó una punción en la cisterna magna. En ratas la punción fue realizada por medio de una jeringa con una aguja de 0.3 mm. de grosor pudiéndose extraer sin contaminación de sangre volúmenes de LCR superiores a 100  $\mu\text{l}$ .

## **E. Procedimientos bioquímicos**

### **E.1. Western Blot**

El análisis de proteínas por western blot se realizó a partir de extractos de proteínas totales. El tejido se homogenizó en tampón de lisis (NaCl 150 mM; Tris-HCl 20 mM, PH 7.4; EDTA 5 mM; Glicerol 10%, NP40 1%; aprotinina 1 µg/ml, vanadato 400 µM, PMSF 200 mM) y se separaron las proteínas homogenizadas del tejido no homogenizado por centrifugación. La cantidad de proteínas en el extracto se cuantificó por medio del ensayo de Bradford y se normalizó hasta 1 µg/µl; posteriormente se agregó a los extractos tampón reductor-desnaturalizante concentrado 5 veces (concentraciones finales: Tris PH 6.8: 75 mM; SDS 2%; glicerol 10%; DTT 0.1 M; azul bromofenol 0.05 %).

Las proteínas se separan por peso molecular por medio de una electroforesis en geles desnaturalizante de SDS-archilamida/bis-acrilamida (Bio Rad). Una vez terminada la electroforesis las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Prolan).

Las membranas se incuban durante 3 horas a temperatura ambiente en tampón - Tris salino + Tween 0.5% (TTBS) con 5% de leche en polvo para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana, seguidamente se incuba la membrana durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario deseado a la concentración adecuada, posteriormente se lava la membrana y se incuba con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se lava la membrana con TBS, se incuba con la solución quimioluminiscente ECL (Amersham) 1 minuto y se expone la membrana a una placa autorradiográfica (Amersham) el tiempo necesario para detecta la banda correspondiente a la proteína deseada. El listado de los anticuerpos primarios utilizados se encuentra en la Tabla 1

## **E.2. Ensayo de ELISA (del inglés “Enzyme Linked Inmunoabsorvent Assay”)**

### **E.2.1. Procesamiento de muestras**

Las muestras para la medición de niveles de IGF-I deben ser procesadas previamente para separar al IGF-I de las IGFBPs. El proceso de separación varía de acuerdo a si se trata de muestras de tejido, de suero o de LCR.

- **Tejido**

Se homogeniza el tejido en 300-500  $\mu$ l de solución de ácido acético 1N, se hierve el homogenato durante 20 minutos, se atempera a 4 °C durante 10 minutos y se centrifuga a 14.000 RPM 5 minutos. Se recoge el sobrenadante y se congela a -80 °C durante 1 hora. Finalmente se liofiliza el sobrenadante durante toda la noche. El liofilizado se resuspende en el volumen mínimo necesario para poder realizar el ensayo de ELISA y la determinación de proteínas totales por el método de Bradford (50  $\mu$ l para ELISA de IGF-I humano, 250  $\mu$ l para ELISA de IGF-I rata/ratón).

- **Suero y LCR**

Para LCR y suero la separación del IGF-I de las IGFBPs se realiza por medio de la cromatografía a través de columnas de Sep-Pak (Waters). En el caso de suero se utiliza 50  $\mu$ l, en el caso de LCR se utilizan 100  $\mu$ l. Las muestras se diluyen en una proporción 1/20 en HCl 0.5 N. Las columnas se pre-tratan pasando consecutivamente 5 ml de isopropanol, 5 ml de metanol y 10 ml de ácido acético al 7%. Las muestras diluidas se pasan dos veces por la columna, seguidamente se lava la columna con 10 ml de ácido acético 7% y finalmente se extraen las proteínas enjuagando la columna con 2 ml de metanol. El eluido obtenido se evapora durante toda la noche utilizando una centrífuga acoplada a una bomba de vacío (tipo Speed-Vac, Savant). De la misma manera que en el caso de los tejidos, el residuo obtenido se resuspende en el volumen mínimo necesario para el procedimiento del ELISA.

### **E.2.2. ELISA de IGF-I humano**

Para la detección de IGF-I humano se utilizó un kit de ELISA comercial (DSL), el procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El rango de detección del ensayo es 10-600 ng/ml. Los valores de concentración de IGF-I obtenidos

se normalizaron por el contenido total de proteína en el tejido procesado o por el volumen de suero o LCR utilizado.

### **E.2.3. ELISA de IGF-I rata/ratón**

Para la detección de IGF-I de rata y de ratón se utilizó un ELISA desarrollado en nuestro laboratorio. El ensayo se desarrolla a lo largo de 5 días. Brevemente el protocolo es el siguiente

- Día 1: Recubrimiento.

Se incuba una placa de ELISA de 96 pocillos (Falcon) con un anticuerpo monoclonal anti-IGF-I de ratón (1/1000 en PBS, R&D) a 4 °C durante toda la noche.

- Día 2: Bloqueo.

Luego se sucesivos lavados con solución de lavado (PBS, Tween 0.05%) se incuba la placa durante 2 hora a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4 °C en solución de bloqueo (PBS, 0.05 % Tween, 5% sacarosa, 0.05% azida).

- Día 3 Cargado de muestras.

Se agregan la curva patrón con concentraciones conocidas de IGF-I de ratón (IBT) y las muestras incógnita. El rango de la curva patrón es 0.5-16 ng/ml. Se incuban las muestras en la placa durante toda la noche a 4 °C.

- Día 4. Segundo anticuerpo.

Luego de lavar se agrega a cada pocillo un anticuerpo generado en cabra contra IGF-I de ratón y biotinilado por el fabricante (R&D, 1/1000) y se incuba la placa durante toda la noche a 4 °C.

- Día 5 Revelado.

Se incuba la placa con solución de estreptavidina-peroxidasa (Amersham, 1/20000) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Luego de lavar se incuba la placa con solución de revelado (OPD-Sigma fase, Sigma, dos pastillas en 20 ml de agua) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lee la absorbancia a 450 nm y se calcula la concentración de IGF-I en las muestras incógnitas a partir de los

parámetros obtenidos por el ajuste de la recta patrón. De la misma forma que en el ELISA de IGF-I humano los valores de IGF-I se relativizan al contenido total de proteínas si se analiza tejido o al volumen analizado si se analiza suero o LCR.

### **E.3. Marcaje de IGF-I con digoxigenina**

Se pesó la digoxigenina (Roche) y la proteína a marcar en relación equimolar 1:70, normalmente se realizó la reacción con 1 mg de la proteína que se deseaba marcar. Se disolvió la proteína en 1 ml de PBS, PH 8.5 y la digoxigenina en 8.2  $\mu$ l de DMSO. Se mezclaron ambas soluciones y se dejó que la reacción de marcaje ocurriese durante 3 horas a temperatura ambiente. Se cargó la mezcla de reacción en columnas de Sephadex G-25 (Sigma) previamente saturada con PBS, PH 8.5, BSA 1%. Se enjuago la columna con PBS, PH 8.5 y se recogieron fracciones de 500  $\mu$ l. Se cargó 1  $\mu$ l de cada fracción obtenida en una membrana de nitrocelulosa y se procedió a realizar la inmunodetección de la digoxigenina y el péptido deseado de manera similar a un western blot (tecnica de “dot-blot”). Las fracciones en las que se detectó la presencia de digoxigenina y del péptido de interés se agruparon. La concentración del péptido marcado se calculó como el cociente entre el volumen total de las fracciones agrupadas y la masa de péptido utilizada en la reacción.

## **F. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

Para los ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia los animales fueron perfundidos transcárdialmente con solución salina y solución fijadora de la siguiente composición: tampón fosfato 0.1M (PB), paraformaldehído 4%. Una vez terminada la perfusión se extrajo el cerebro y se incubó a 4 °C en solución fijadora durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el cerebro de la solución fijadora y se lo colocó en PB. Dentro de los 15 días siguientes se cortó el cerebro en rodajas de 50  $\mu$ m de grosor en un vibrátomo estándar. Los cortes de interés fueron seleccionados y separados en 8 series intercaladas, de esta forma dos cortes consecutivos en el inmunoensayo se encuentran separados por una distancia teórica de 400  $\mu$ m. Los listados de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunofluorescencia e inmunohistoquímica se encuentran en la Tablas 2 y 3.

### **F.1. Inmunofluorescencia**

El ensayo de inmunodetección consiste en dos incubaciones una primera con el anticuerpo primario que reconoce la molécula que se quiera detectar y una segunda con un anticuerpo secundario unido a una sonda fluorescente que reconoce las inmunoglobulinas de la especie del anticuerpo primario. Ambas incubaciones se realizan en un tampón de la siguiente composición: PB 0.1 M, Triton X-100, 0.1%, BSA 0.3%. La incubación con el anticuerpo primario dura 48 horas y la incubación con el anticuerpo secundario 24 horas. Las concentraciones utilizadas para cada anticuerpo se encuentran detalladas en la Tabla 3. Opcionalmente, al finalizar la incubación con el anticuerpo secundario se incubaron los cortes con el colorante nuclear DAPI (200 ng/ml, Calbiochem) para obtener una contratinción nuclear. Posteriormente los cortes fueron visualizados en un microscopio de epifluorescencia o en un microscopio confocal (Leica).

### **F.2. Inmunohistoquímica**

El principio del ensayo es similar para la inmunofluorescencia, pero el protocolo difiere en los siguientes puntos:

- Previamente a la incubación con el anticuerpo primario los cortes son incubados durante 10 minutos en una solución de la siguiente composición PB 70%, metanol 30%, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.9 %; para inhibir el enzima peroxidasa endógena.
- El anticuerpo secundario utilizado se haya conjugado con biotina en vez de una sonda fluorescente.
- Después de la incubación con el anticuerpo secundario los cortes se incuban con el complejo avidina-biotina-peroxidasa 1:250 (Pierce) durante 90 minutos.
- La presencia del anticuerpo secundario se revela mediante una solución de diaminobenzidina (DAB, Sigma) al 0.03% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.01 % en PBE. La reacción de revelado produce un precipitado marrón en las zonas donde se haya el anticuerpo secundario.

Los cortes fueron visualizados y fotografiados en un microscopio de luz transmitida (Leica).

### **F.3. Recuento de botones glutamatergicos y gabaergicos**

Las sinapsis glutamatergicas y gabaergicas de la SI fueron identificadas por medio de dobles tinciones con anticuerpos especificos anti-transportador vesicular de glutamato (V-Glut1) y anti-ácido glutámico decarboxilasa (GAD6). El anticuerpo anti-V-Glut1 fue detectado con un anticuerpo secundario biotinilado y este a su vez fue detectado con estreptavidina conjugada con alexa-468. La determinación del área ocupada por botones sinápticos glutamatergicos y gabaergicos se realizó en series de 1 de cada 8 cortes de 50  $\mu\text{m}$  de espesor en zona de corteza somestésica. Se realizaron fotos en la capa IV cortical, identificada por medio de una contratinción con DAPI, utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 63X y un zoom digital de 9X. Se realizaron 3 fotos por corte en 3 cortes diferentes de cada animal. El análisis de las imágenes fue realizado en “doble ciego” utilizando el programa AIS (Imaging Research). Las imágenes fueron convertidas a escala de grises para aumentar el contraste entre señal y fondo. Se definió un umbral de intensidad, constante para todas las imágenes, a partir del cual la señal era considerada positiva. Se midió el área ocupada por señal positiva en tres zonas circulares del 325  $\mu\text{m}$  de diámetro elegidas al azar dentro de cada fotografía obteniéndose un porcentaje de área ocupada por botones sinápticos. Se calculó el promedio para cada imagen, a su vez se calculó el promedio para cada corte y finalmente el promedio para cada animal, ese valor fue tomado como una observación. Los botones glutamatergicos y gabaergicos fueron analizados por separado ya que nunca colocalizaron.

### **G. Inducción de diabetes**

La diabetes fue inducida por la administración intraperitoneal de 65 mg/kg de STZ (Sigma), disuelta en 200  $\mu\text{l}$  de tampón citrato (PH 4,5). Tres días después de la inyección se obtuvieron muestras de sangre por punción de la cola y se midió la concentración de glucosa por medio de un glucómetro (Menarini). Los animales fueron considerados diabéticos si los niveles de glucosa en sangre eran superiores a 350 mg/dl. Como controles se utilizaron animales del mismo rango de peso inyectados el mismo día con 200  $\mu\text{l}$  de tampón citrato.



## **H. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico y la creación de gráficos se utilizó el programa Graph Prism (Graph Pad). El nivel de significación estadística se estableció siempre en valores de  $p$  menores a 0.05. En caso de comprobarse la homogeneidad de varianzas se realizaron ensayos estadísticos paramétricos a dos colas. Si se analizaban dos grupos se realizó un “Test de student”, si se analizaban más de dos grupos con un solo factor como tratamiento se realizó un ANOVA de una vía y si se analizaban más de dos grupos con más de un factor como tratamiento se realizó un ANOVA de dos vías. El nivel de significación del ANOVA fue establecido por el ensayo post hoc de Bonferroni. En los casos en los que no existió homogeneidad de varianzas se procedió a realizar ensayos no paramétricos, Man-Whitney si se analizaban dos grupos o el ensayo de Kruskal-Wallis si se analizaban más de dos grupos.

Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. El número de datos incluidos en cada grupo corresponde, en todos los casos, al número de observaciones independientes realizadas.

**Tabla 1: anticuerpos primarios utilizados en western blot**

Antígeno	Especie	Dilución	Producido por:
GluR 2/3	conejo	1/2000	Eva García-Galloway
GAD6	ratón	1/500-1000	Developmental Hybridoma Bank
Calbindina	ratón	1/2000	Swant
$\beta$ III-actina	ratón	1/2000	Sigma
GluR1	conejos	1/1000	Chemicon
Sinaptofisina	ratón	1/10000	Sigma
Dinamina-1	ratón	1/2000	Santa Cruz
$\beta$ III-Tubulina	ratón	1/150000	Promega

**Tabla 2: anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

Antígeno	Especie	Dilución	Producido por:
GAD6	ratón	1/500	Developmental Hybridoma Bank
V-Glut 1	cabra	1/5000	Chemicon
c-fos	conejo	1/1000	Santa Cruz
Digoxigenina	ratón	1/250	Roche
IGF-I	conejo	1/250	IBT
Dinamina-1	ratón	1/2000	Santa Cruz
$\beta$ III-Tubulina	ratón	1/150000	Promega

**Tabla 3: anticuerpos secundarios utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.**

Especificidad	Marca	Especie	Dilución	Producido por:
Anti-ratón	alexa-594	burro	1/1000	Molecular Probes
Anti-ratón	alexa-488	burro	1/1000	Molecular Probes
Anti-ratón	biotinilado	cabra	1/250	Pierce
Anti-conejo	alexa-594	burro	1/1000	Molecular Probes
Anti-cabra	biotinilado	burro	1/1000	Vector

**Tabla 4: anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa utilizados en western blot.**

Especificidad	Especie	Dilución	Producido por:
Anti-conejo	conejo	1/10000	Jackson
Anti-ratón	ratón	1/10000	Affinity Bioreagents

## RESULTADOS



---

## PARTE I

Para intentar comprender el papel del IGF-1 circulante en sangre en la fisiología del sistema nervioso comenzamos estudiando el modelo de los ratones carentes de IGF-1 hepático “LID” (siglas del inglés “liver IGF-1 deficient”); como consecuencia de esa deficiencia estos ratones poseen una reducción del 60-75 % de niveles circulantes de IGF-1 pero no poseen alteraciones de desarrollo ni de crecimiento (Yakar et al., 1999). Estas características los transforman en un modelo idóneo para el objetivo que nos hemos propuesto.

### **A. Plasticidad sináptica en ratones LID**

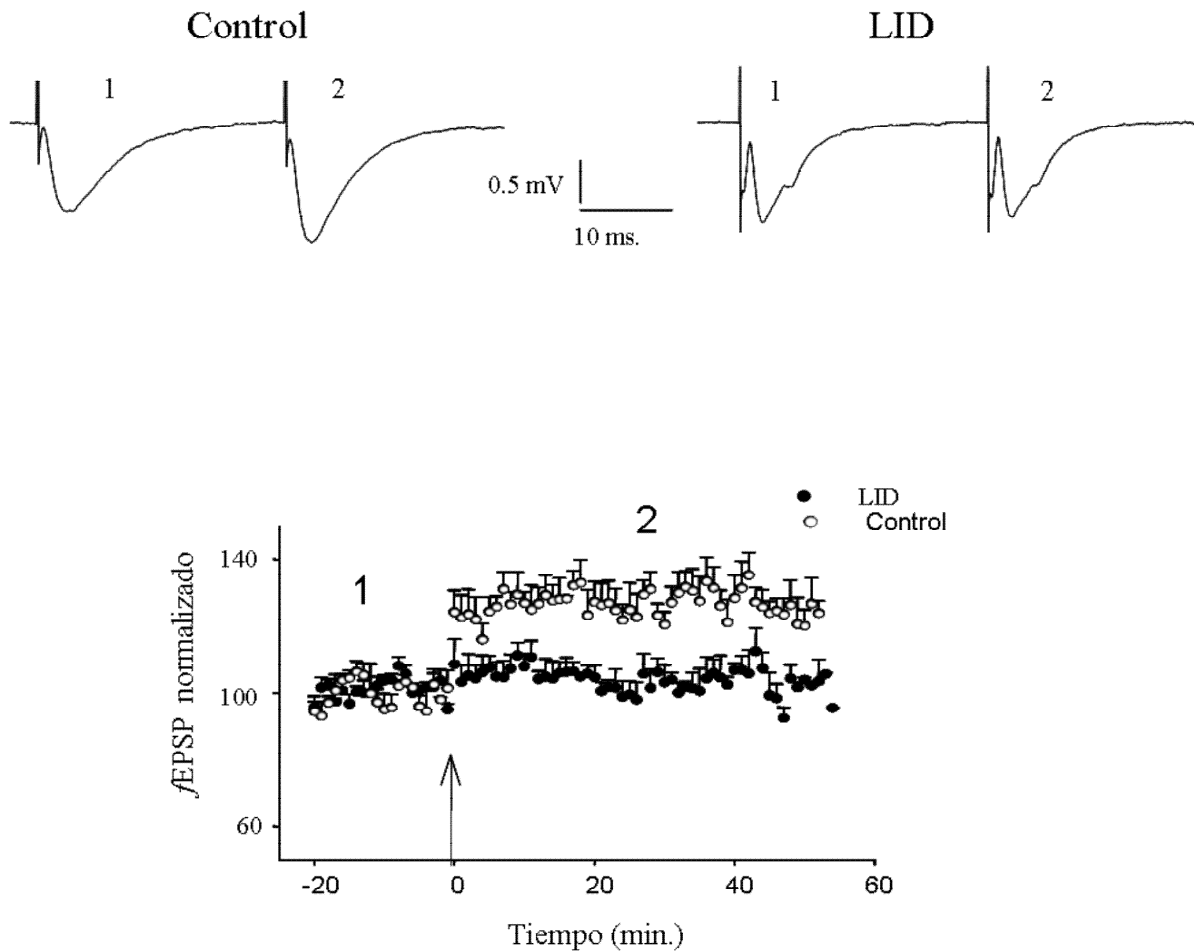
#### **A.1. Plasticidad sináptica en rodajas**

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que los ratones LID presentan deficiencias en protocolos de memoria espacial, estas deficiencias se encuentran acompañadas por una atrofia del giro dentado del hipocampo (Trejo et al., 2007, en prensa). Por esta razón decidimos estudiar la plasticidad sináptica de los ratones LID en las sinapsis formadas por las fibras del tracto perforante y las células granulares del giro dentado en rodajas de hipocampo de ratones adultos.

La Figura 3 muestra el curso temporal de la pendiente del potencial sináptico poblacional ( $\overline{fEPSP}$ ) en el giro dentado del hipocampo antes y después de la aplicación de un estímulo eléctrico de alta frecuencia en la vía perforante (estimulación tetánica). La estimulación tetánica de las rodajas de los animales controles indujo un aumento en la respuesta poblacional que se mantuvo durante 1 hora y puede, por lo tanto, ser definida como potenciación a largo plazo (LTP). Por el contrario, la aplicación del mismo protocolo de estimulación en rodajas de animales LID no produjo ningún tipo de potenciación (Figura 3).

Para estudiar las alteraciones responsables de la deficiencia de LTP en los ratones LID, estudiamos la facilitación por pulsos pareados (PPF). Al evocar dos potenciales sinápticos separados por un breve intervalo de tiempo, la amplitud y pendiente del segundo potencial se modifica con relación al primero de acuerdo al

intervalo de tiempo existente entre ambos estímulos. Esta forma de plasticidad sináptica a corto plazo se denomina facilitación por pulsos pareados y se produce principalmente por mecanismos presinápticos (Creager et al., 1980). El análisis de la PPF en rodajas de animales LID y controles indica que no existen diferencias (Figura 4 A), sugiriendo que la falta de LTP en los ratones no se origina por alteraciones presinápticas.



**Figura 3. Los ratones LID poseen alteraciones en la LTP.**

Gráfico del curso temporal de la pendiente del fEPSP en la capa molecular del giro dentado. Después de la estimulación tetánica de la vía perforante (indicada por la flecha) la pendiente del fEPSP se incrementa de manera continua en rodajas controles y no en rodajas LID. Los datos fueron normalizados por la pendiente promedio antes de la estimulación tetánica. Cada punto representa el promedio de 6 rodajas de ratones LID y de 5 de ratones controles. Los trazos representan fEPSP antes y después de la estimulación tetánica

Como ha sido mencionado anteriormente el IGF-1 actúa como modulador de las respuestas sinápticas en múltiples tipos de sinapsis (Gonzalez de la Vega et al., 2001; Nuñez et al., 2003), en el siguiente experimento estudiamos el efecto de la aplicación de IGF-1 en los fEPSP del giro dentado en rodajas de ratones LID. El IGF-1 no modificó la

---

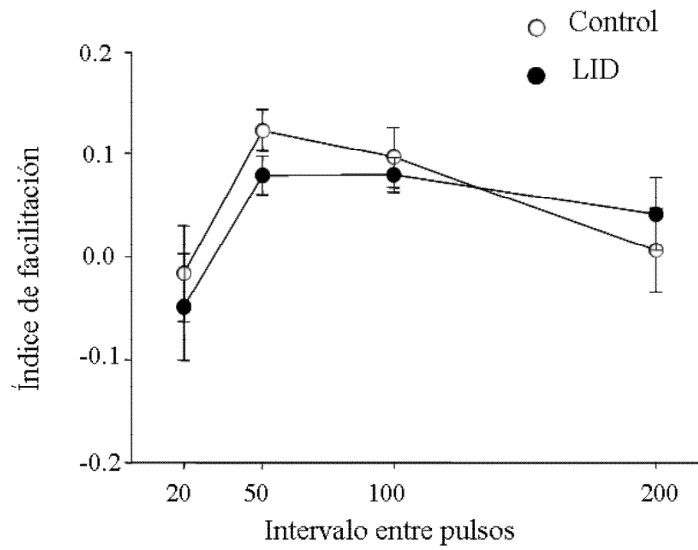
pendiente del  $fEPSP$  (Figura 4 B) sugiriendo que la transmisión sináptica en el giro dentado no se encuentra modulada por este factor trófico.

## A.2. Plasticidad sináptica de los ratones LID *in vivo*

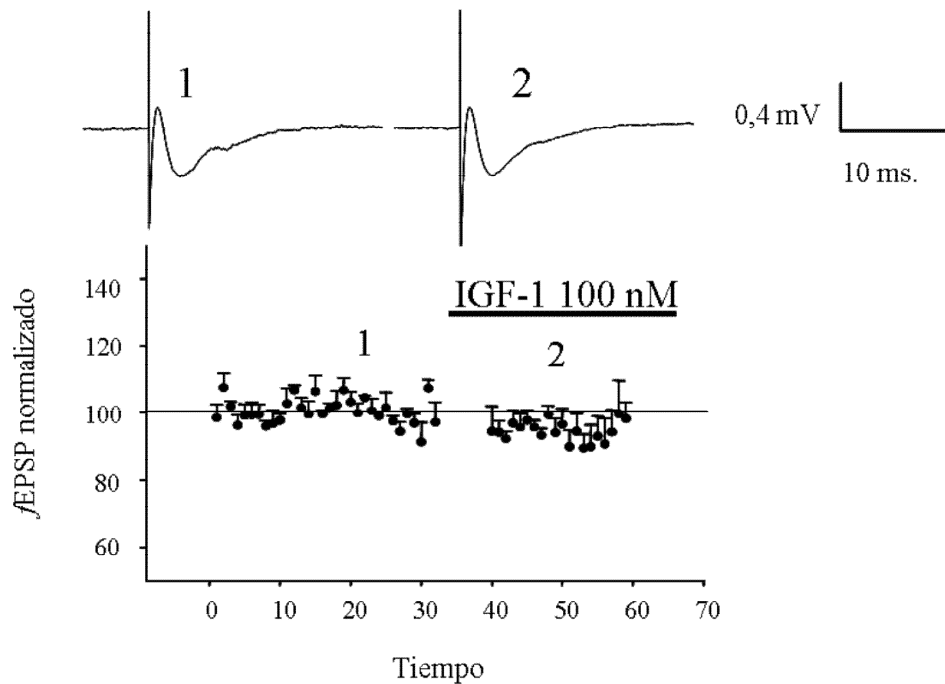
Los ratones LID poseen una atrofia del giro dentado que se puede recuperar después de un tratamiento crónico con IGF-1 (Trejo et al., 2007 en prensa). Con el objetivo de estudiar si el tratamiento con IGF-1 también revierte la carencia de LTP investigamos la plasticidad sináptica de los ratones LID *in vivo*. Los ratones LID tampoco presentaron LTP *in vivo* en la conexión sináptica del tracto perforante con las células granulares, confirmando los resultados obtenidos en rodajas de hipocampo (Figura 5 A). Por el contrario la estimulación tetánica indujo una depresión a largo plazo (LTD, pendiente  $80,46 \pm 1,51 \%$ ,  $N = 8$ ) significativa (Figura 5 A, B). El tratamiento crónico durante 1 mes con IGF-1 revirtió la carencia de LTP de los ratones LID aunque la LTP obtenida fue de menor magnitud a la de los controles (Figura 5 A, B). Estos resultados indican que la falta de LTP en los ratones LID es consecuencia de la carencia de IGF-1.

¿Son estas deficiencias en la LTP específicas del giro dentado del hipocampo o por el contrario los ratones LID poseen una alteración generalizada en la plasticidad sináptica? Para contestar a esta pregunta analizamos la LTP inducida en la corteza somatosensorial por la estimulación tetánica de las fibras comisurales del cuerpo caloso. La estimulación tetánica de estas fibras indujo LTP tanto en los ratones controles como en los ratones LID aunque el curso temporal y su magnitud fueron diferentes en ambos grupos (Figura 6 A). Por otra parte, los ratones LID poseen una LTP normal en las sinapsis formadas por las fibras comisurales de Schaffer y las neuronas piramidales de la capa CA1 del hipocampo (Figura 6 B). Estos resultados en conjunto sugieren que los ratones LID poseen una alteración específica de la plasticidad sináptica en el giro dentado del hipocampo.

A



B

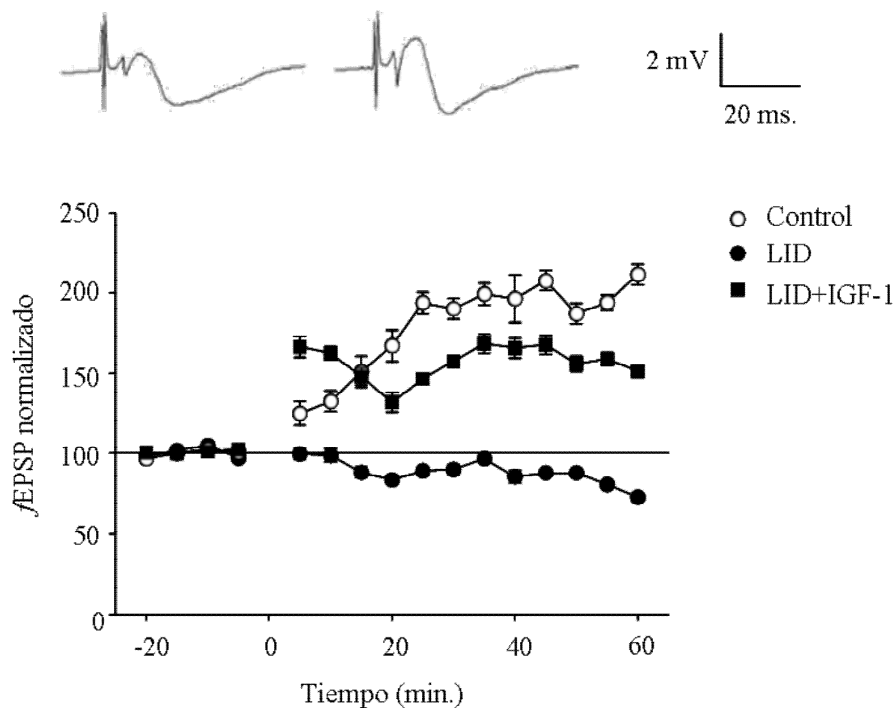


**Figura 4. Respuestas del giro dentado a la estimulación por IGF-1 y por pares de pulsos.**

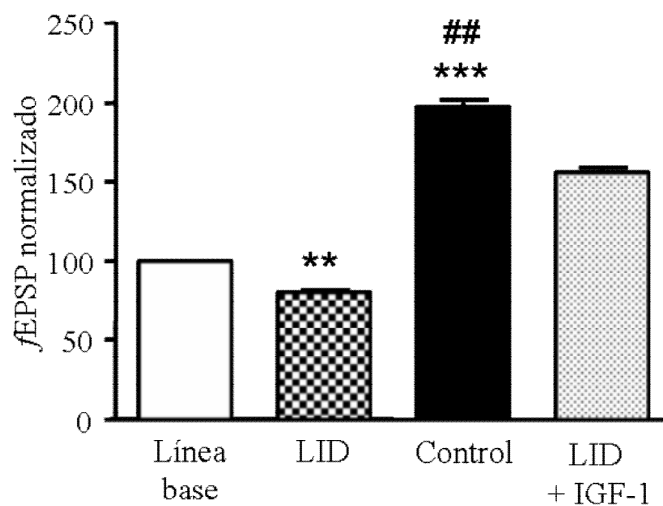
**A.** Índice de facilitación por pulsos pareados en la sinapsis del tracto perforante-células granulares de rodajas de ratones controles y LID. No se observaron diferencias entre los genotipos en el índice de facilitación en ninguno de los intervalos entre pulsos estudiados ( $p = 0,608$ ). Cada punto representa el promedio de las respuestas de al menos 5 rodajas. **B.** Curso temporal de la pendiente del fEPSP en el giro dentado antes y después de la perfusión de IGF-1 en rodajas de ratones LID. La perfusión de IGF-1 no modificó la pendiente del fEPSP. Cada punto representa el promedio de las respuestas de 5 rodajas.



A



B



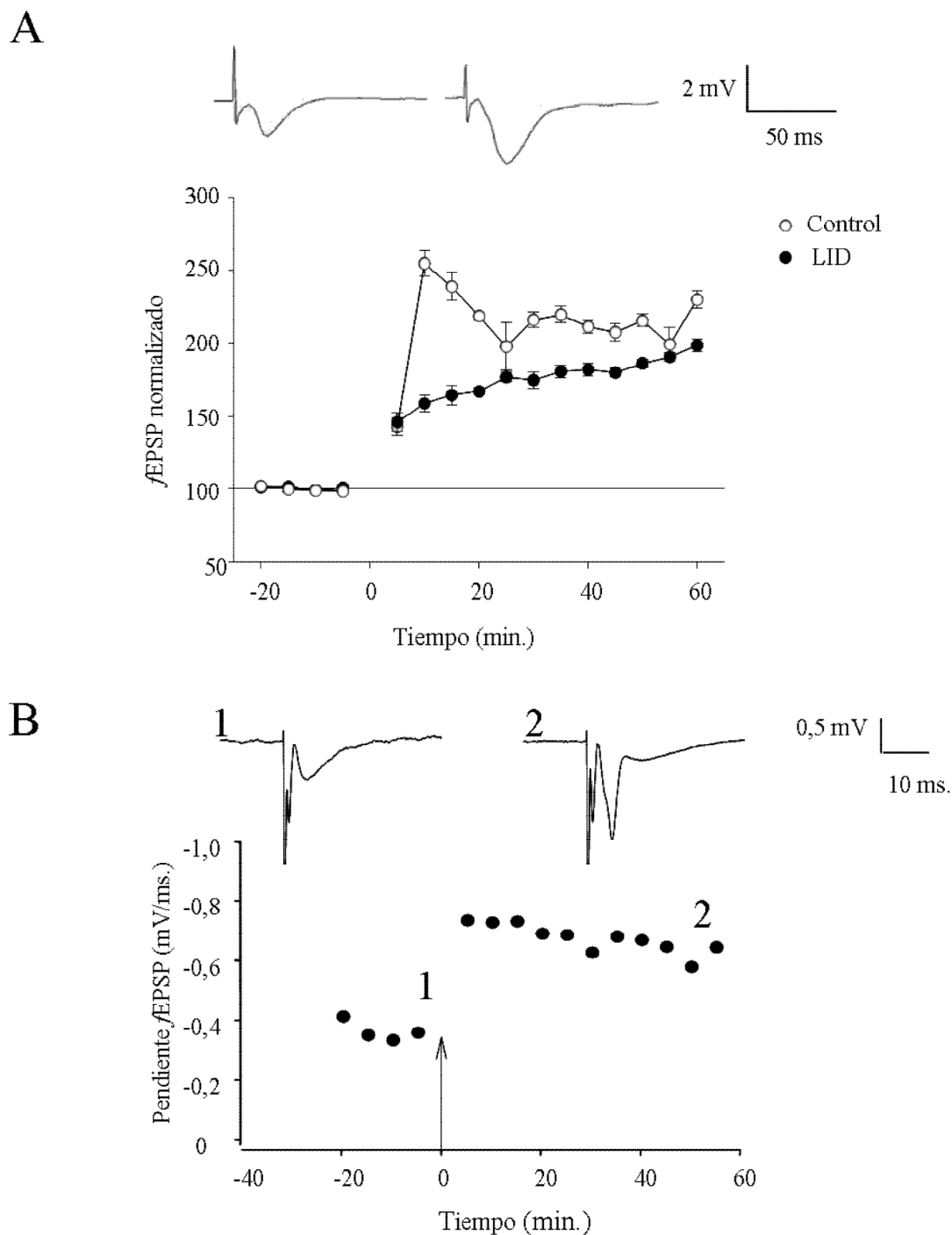
**Figura 5. La falta de LTP de los ratones LID se recupera por el tratamiento con IGF-1.**

**A.** Pendiente del fEPSP del giro dentado registrado *in vivo* antes y después de la estimulación tetánica del tracto perforante. Los ratones LID no desarrollaron LTP, sin embargo el tratamiento crónico con IGF-1 revirtió estas deficiencias. Los trazos ilustran los fEPSP antes (izquierda) y 60 minutos después (derecha) de la estimulación tetánica del tracto perforante en un ratón control. La línea horizontal señala la pendiente basal del fEPSP utilizado como 100 %. Cada punto representa la media de las respuestas de 6 a 8 animales. **B.** Promedio de los últimos 15 minutos de registro (45-60 minutos después de la estimulación tetánica) para cada grupo. Los ratones LID desarrollaron LTD, en tanto que los ratones controles y LID tratados con IGF-1 desarrollaron LTP aunque de menor magnitud. En esta y en las siguientes figuras \*\*,  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . ##  $p < 0,001$  vs. LID + IGF-1.

### **A.3. Reversión de la carencia de LTP por bloqueo de la transmisión inhibitoria**

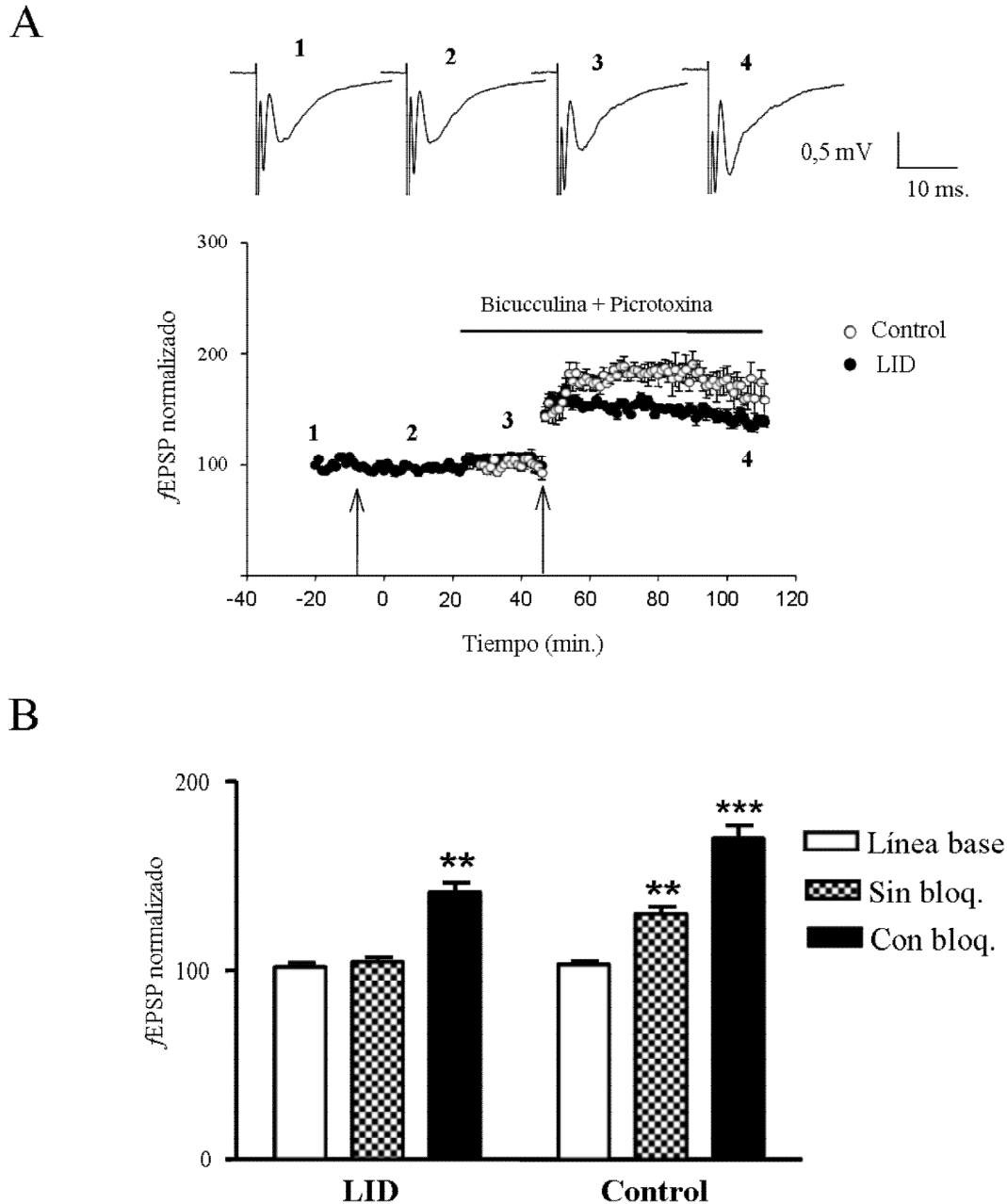
El giro dentado del hipocampo posee la particularidad de ser una de las pocas regiones del sistema nervioso donde se produce neurogenesis durante la edad adulta (Gage, 2002). Los estudios realizados en el laboratorio indican que los ratones LID poseen deficiencias en la supervivencia de las nuevas neuronas generadas en el giro dentado (Llorens-Martín et al. enviado). Las nuevas neuronas se incorporan al circuito hipocampal siguiendo un patrón determinado, en el cual primeramente se establecen las sinapsis inhibitorias y posteriormente las sinapsis excitatorias (Esposito et al., 2005). Por lo tanto la alteración en la supervivencia de las nuevas neuronas en los ratones LID podría conducir a un desequilibrio excitatorio/inhibitorio; las nuevas neuronas formarían contactos inhibitorios y no excitatorios, luego la deficiencia en la supervivencia provocaría que la subpoblación de neuronas que forma contactos excitatorios disminuya. Si esto fuese así la falta de LTP podría deberse a una “hiper-inhibición” del circuito hipocampal. Para poner a prueba esta hipótesis analizamos la LTP en presencia de bloqueantes de la transmisión GABAérgica rápida.

El bloqueo de la transmisión GABAérgica con bicuculina (10  $\mu$ M) y picrotoxina (100  $\mu$ M) revirtió la incapacidad de las rodajas de ratones LID de expresar LTP (Figura 7). La aplicación de los bloqueantes GABAérgicos después de la estimulación tetánica de la vía perforante no modificó la pendiente inicial del  $fEPSP$ , sugiriendo que el bloqueo de la transmisión inhibitoria no afecta la transmisión glutamatérgica en ausencia de estimulación tetánica. Estos resultados en conjunto sugieren que los ratones LID poseen una alteración específica de la plasticidad sináptica en el giro dentado por un desequilibrio entre la relación excitación/inhibición sobre las células granulares. Esta hipótesis fue posteriormente apoyada por medio del análisis morfológico de la cantidad de botones sinápticos glutamatérgicos y GABAérgicos existentes en la capa molecular del giro dentado (Trejo et al., 2007 en prensa).



**Figura 6. La falta de LTP de los ratones LID es específica del giro dentado.**

**A.** LTP en la corteza somatosensorial. A diferencia de lo observado en el giro dentado los ratones LID desarrollaron LTP en la corteza, aunque el curso temporal de la potenciación fue diferente al de los controles. Los trazos ilustran los fEPSP antes (izquierda) y 60 minutos después (derecha) de la estimulación tetánica. Cada punto representa la media de las respuestas de 6 a 8 animales. **B.** Experimento individual estudiando la LTP en la capa CA1 del hipocampo en rodajas de ratones LID tras la estimulación tetánica de las fibras colaterales de Schaffer, en ausencia de bloqueantes GABAérgicos. El experimento sugiere que la LTP en esa sinapsis no se encuentra afectada. Los trazos ilustran los fEPSP antes y después de la inducción de la LTP.



**Figura 7. Reversión de la falta de LTP de los ratones LID por bloqueo de la transmisión inhibitoria.**

**A.** La estimulación tetánica en rodajas de animales LID no induce LTP (flecha de la izquierda). La posterior perfusión de bloqueantes de la transmisión GABAérgica no modifica la pendiente de los  $fEPSP$  pero revela la capacidad de las rodajas de ratones LID de desarrollar LTP por una segunda estimulación tetánica (flecha de la derecha). Los trazos ilustran los  $fEPSP$  observados en una rodaja de ratón LID antes y después de la primera estimulación tetánica (1 y 2) antes de la segunda estimulación tetánica en presencia de bloqueantes GABAérgicos (3) y después de la estimulación tetánica en presencia de bloqueantes GABAérgicos (4). Cada punto representa el promedio de 5 rodajas. **B.** Respuestas media antes y después de la estimulación tetánica en presencia y ausencia de bloqueantes GABAérgicos. La estimulación tetánica indujo LTP en las rodajas de ratones LID sólo en presencia de bloqueantes GABAérgicos. Las rodajas de animales controles desarrollaron LTP tanto en presencia como en ausencia de bloqueantes GABAérgicos. Las barras representan el promedio de los últimos 10 minutos de registro de al menos 10 rodajas.

## **B. Análisis de la distribución de IGF-1 en ratones LID y controles**

Como se ha mencionado los ratones LID no producen IGF-1 en el hígado y en consecuencia presentan una reducción del (60-75 %) en los niveles de IGF-1 circulante en sangre. Por otra parte la producción de IGF-1 en músculo, bazo, corazón y tejido adiposo no se encuentra afectada (Yakar et al., 1999). Asimismo los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que la producción de ARN mensajero de *igf-1* en el hipocampo tampoco se encuentra alterada (Trejo et al., 2007 en prensa). Para estudiar que sucede con los niveles de proteína IGF-1 en el en el hipocampo, medimos sus niveles utilizando un ensayo de ELISA. Los niveles de IGF-1 en el hipocampo de los ratones LID son similares a los de los ratones control (Figura 8). Estos resultados podrían indicar que los niveles de IGF-1 en el hipocampo dependen de la síntesis local y no de la captación desde la sangre, sin embargo trabajos previos realizados en el laboratorio indican que bloqueando la entrada de IGF-1 de la sangre al cerebro, los niveles de IGF-1 en el cerebro descienden indicando que la sangre es una fuente principal de IGF-1 para el hipocampo y otras zonas del cerebro (Carro et al., 2005; Carro et al., 2006b).

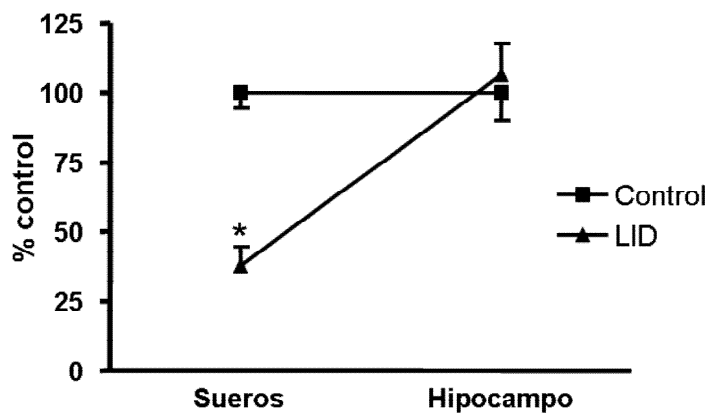
Alternativamente los niveles normales de IGF- 1 en el hipocampo podrían indicar que en los ratones LID existe un sistema compensatorio de captación del IGF-1 de sangre al cerebro de manera que la captación IGF-1 desde la sangre se incrementa para compensar el descenso en los niveles circulantes. En caso de existir este mecanismo podría funcionar compensando tanto descensos como aumentos en los niveles de IGF-1 circulante. Para poner a prueba esta hipótesis analizamos el efecto del incremento crónico de IGF-1 en sangre en sus niveles cerebrales. El experimento consistió en la administración de IGF-1 (50 µg/kg.día) humano a ratones control durante 10 días determinando su concentración en suero e hipocampo a las 48 horas y a los 10 días. Utilizando un ELISA específico de IGF-1 humano y otro de IGF-1 de ratón (Figura 9) pudimos determinar la variación en los niveles séricos e hipocampales tanto del IGF-1 humano administrado (exógeno) como del IGF-1 endógeno.

A las 48 de administración de IGF-1 humano, este es detectable en hipocampo y suero (Figura 10 A, C). Mientras que los niveles de IGF-1 exógeno en suero se

mantienen constantes entre las 48 horas y los diez días de tratamiento (Figura 10 A); en el mismo período existe un descenso significativo de su concentración en hipocampo (Figura 10 C). De la misma forma los niveles séricos de IGF-1 endógeno no se modifican durante el experimento (Figura 10 B) mientras que los niveles hipocampales disminuyen a los 10 días de tratamiento (Figura 10 D). Todos estos resultados son compatibles con un modelo en el cual el incremento crónico en los niveles circulantes de IGF-1 induce un descenso en su captación al cerebro de manera de mantener los niveles cerebrales constantes

**Tabla 5:** Niveles de IGF-1 en suero e hipocampo de ratones LID y control

	IGF-1 (ng/ml) Suero	IGF-1/ prot (pg/μg) Hipocampo
Control	34,6 ± 1,9 (n = 5)	3,04 ± 0,3 (n = 10)
LID	13,06 ± 2,39 (n = 6)	3,24 ± 0,33 (n = 17)



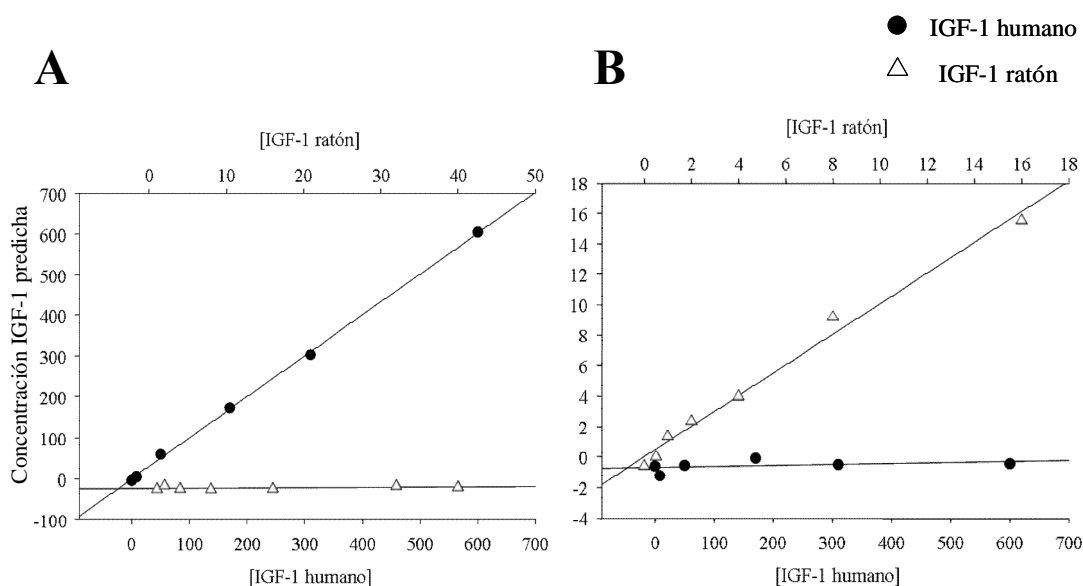
**Figura 8. Niveles de IGF-1 de ratones LID**

Gráfico ilustrando los niveles normalizados de IGF-1 en sangre e hipocampo de los ratones LID y controles. Los ratones LID poseen niveles normales de IGF-1 en el cerebro a pesar de tener una pronunciada reducción en los niveles plasmáticos. Indicando que la distribución de IGF-1 es diferente entre los ratones controles y LID. Los valores normalizados corresponden a los datos de la Tabla 5. En esta y en las siguientes figuras, \* p < 0,05.

La existencia de niveles normales de IGF-1 en el cerebro de los ratones LID plantea un problema a la hora de interpretar las causas subyacentes a las alteraciones de

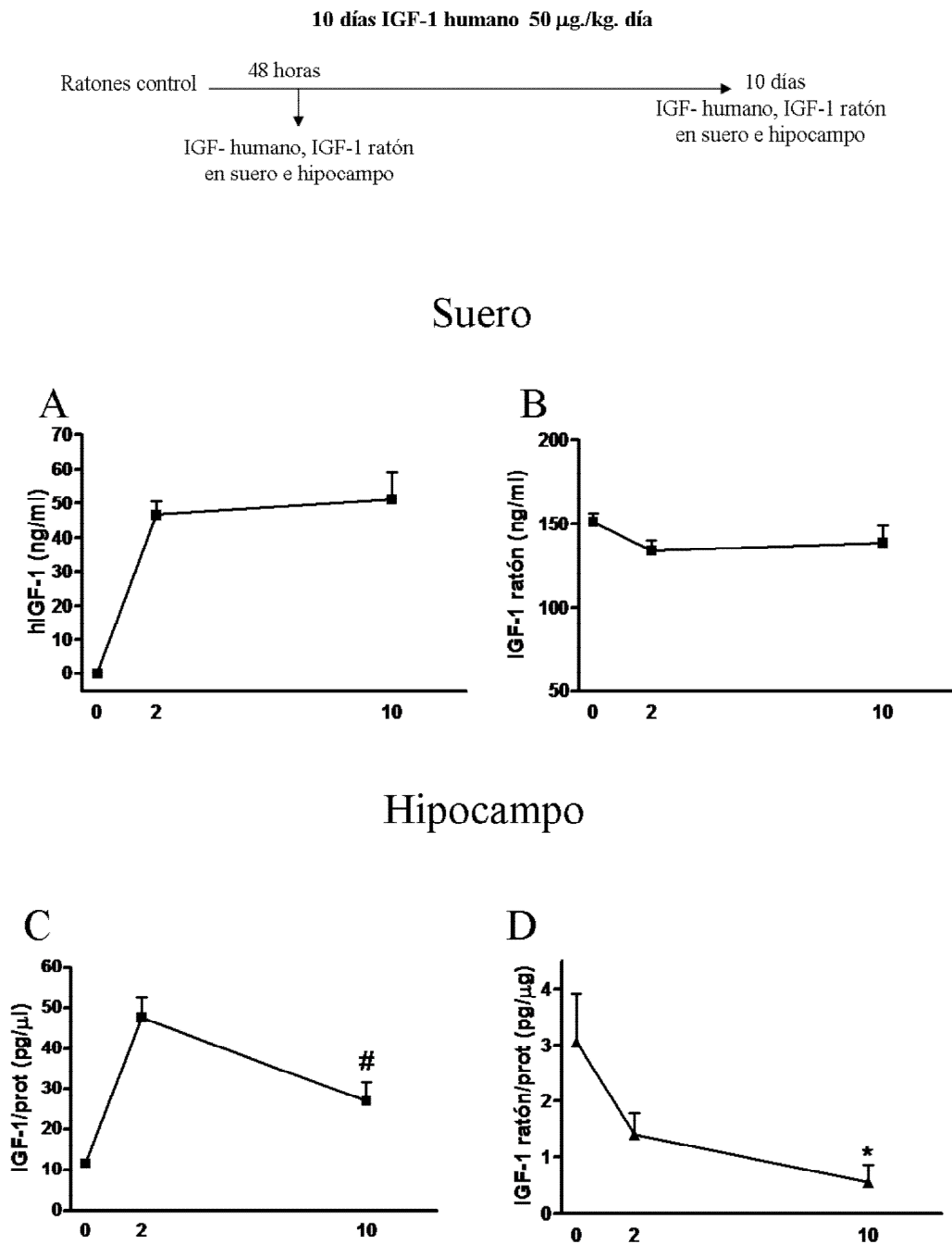
la plasticidad sináptica, morfológicas y de aprendizaje que presentan estos ratones. Todas estas alteraciones tienen que ser consecuencia de los bajos niveles de IGF-1 en sangre porque son revertidos por la administración crónica de IGF-1. Sin embargo no podrían explicarse en función de una disminución de los niveles de IGF-1 cerebrales porque estos son normales. Un modelo posible para resolver esta aparente paradoja podría plantear que las deficiencias de los ratones LID se producen por la imposibilidad de aumentar de manera transitoria la entrada del IGF-1 de la sangre al cerebro en el momento que este lo requiera. Trabajos previos realizados en el laboratorio demostraron que el ejercicio físico agudo incrementa la entrada de IGF-1 de la sangre al cerebro (Carro et al., 2000) y que la entrada inducida por ejercicio físico tiene efectos neuroprotectores y angiogénicos (Carro et al., 2001; Lopez-Lopez et al., 2004). Algunos de estos efectos beneficiosos no se observaron en los ratones LID, sugiriendo que son producidos por el IGF-1 circulante.

La entrada al cerebro de IGF-1 en respuesta a ejercicio físico se correlaciona con la actividad neuronal medida por marcadores moleculares (Carro et al., 2000), esto podría sugerir que el aumento en la actividad neuronal es el responsable del incremento de la captación de IGF-1. Para poner a prueba este modelo estudiamos la modulación de la captación de IGF-1 de la sangre al cerebro por la actividad neuronal.



**Figura 9. Especificidad de los ensayos de ELISA de IGF-1 humano y de ratón.**

Para comprobar la especificidad de los ensayos de ELISA de IGF-1 humano y de ratón analizamos concentraciones crecientes de IGF-1 de ratón en el ELISA de IGF-1 humano (A) y de IGF-1 humano en el ELISA de IGF-1 de ratón (B). Los resultados indican que ambos ELISAs no detectan el IGF-1 de la otra especie lo que permite su diferenciación.



**Figura 10. Efecto del aumento crónico de los niveles de IGF-1 en sangre en su entrada al cerebro.**

A. A las 48 horas de administración de IGF-1 humano sus niveles en suero son detectables y se mantienen constantes hasta los 10 días de tratamiento. B. La administración de IGF-1 humano no altera los niveles de IGF-1 endógeno, que se mantienen constantes a lo largo del experimento. C. A las 48 horas el IGF-1 humano administrado sistémicamente es detectable en el hipocampo, sin embargo entre las 48 horas y los 10 días sus niveles en el hipocampo disminuyen a pesar de que los niveles séricos se mantienen constantes. D. Por su parte los niveles de IGF-1 endógeno hipocampales disminuyen a las 48 horas de tratamiento alcanzando una disminución significativa a los 10 días de tratamiento, sugiriendo que el incremento de IGF-1 en suero induce una disminución en la captación de IGF-1 en el cerebro. #,  $p < 0,05$  comparado con 4 de tratamiento; \*,  $p < 0,05$  comparado con cero días de tratamiento. De aquí en más hIGF-1: IGF-1 humano.



## **C. Modulación de la captación de IGF-1 por actividad neuronal**

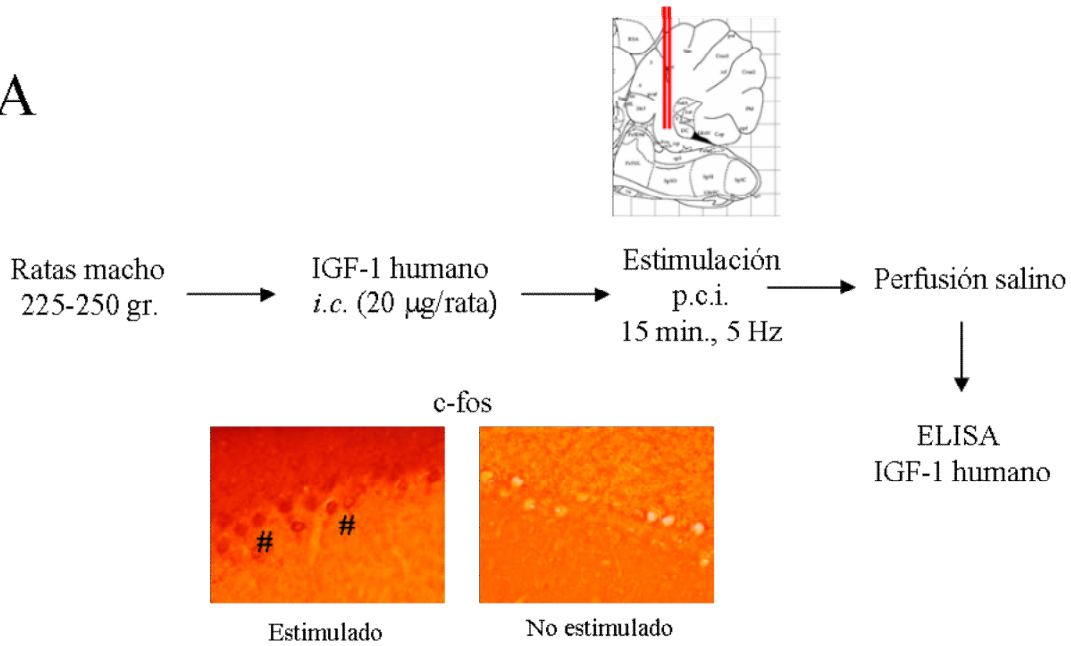
### **C.1. Captación de IGF-1 en cerebelo**

Un requisito fundamental para poder estudiar la captación de IGF-1 de la sangre al cerebro es poder diferenciar el IGF-1 circulante en sangre del que se encuentra en el cerebro. La primera estrategia utilizada para poder realizar esta distinción fue administrar a los animales de experimentación IGF-1 humano en forma aguda y posteriormente utilizar el ELISA específico para IGF-1 humano para detectar su presencia en el sistema nervioso central.

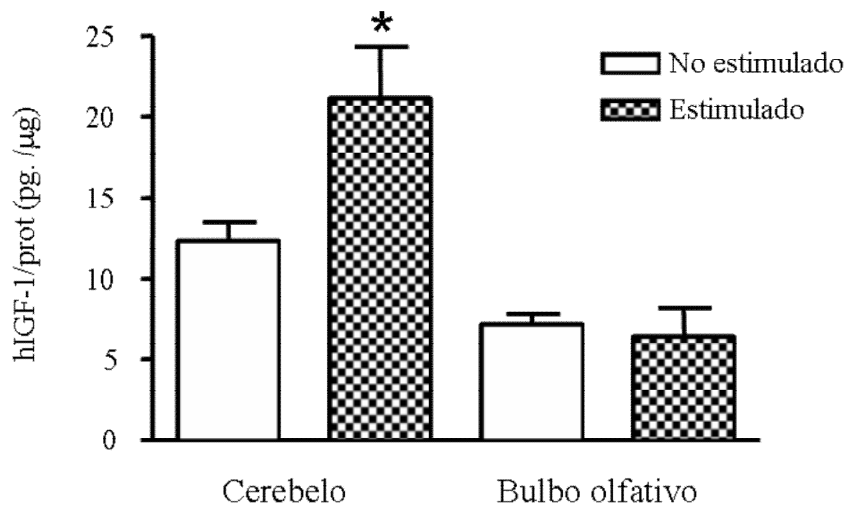
El primer experimento realizado para estudiar la modulación de la captación de IGF-1 por la actividad neuronal consistió en medir la captación de IGF-1 en el cerebelo después de la estimulación eléctrica del pedúnculo cerebeloso inferior ese pedúnculo es el punto principal de entrada de fibras aferentes al cerebelo, a través de él pasan axones tanto de las fibras musgosas como de las fibras trepadoras. Así la estimulación del pedúnculo cerebeloso inferior produce una activación masiva de la corteza cerebelosa ipsilateral al sitio de estimulación (Tian y Bishop, 2002). El protocolo experimental consistió en la administración intra carotida (*i.c.*) de 20 µg de IGF-1 a ratas a las que se les estimulo el pedúnculo cerebeloso inferior. Se administró el IGF-1 *i.c.* para lograr una llegada rápida al cerebro y disminuir las cantidades administradas. Los experimentos se realizaron en ratas para disponer de mayor cantidad de tejido para medir niveles de IGF-1 y para facilitar la administración *i.c.*.

La estimulación del pedúnculo cerebeloso inferior incrementó los niveles de IGF-1 humano en el cerebelo ( $21,19 \pm 3,13$  pg/µg proteína, en animales estimulados vs.  $12,34 \pm 1,15$  pg/µg proteína en no estimulados, N = 7 y 12 respectivamente) y no en el bulbo olfativo ( $6,45 \pm 1,72$ , pg/µg proteína en estimulados, y  $7,19 \pm 0,62$  pg/µg proteína en no estimulados, N = 7 y = 12 respectivamente; Figura 11), sugiriendo que la actividad neuronal aumenta la captación de IGF-1. Para investigar la generalidad de este proceso continuamos nuestro análisis en la corteza somatosensorial, particularmente decidimos estudiar la región de la corteza donde se localiza la sensibilidad de las vibrisas (corteza de barriles).

A



B



**Figura 11. La actividad neuronal incrementa la captación de IGF-1 en el cerebelo.**

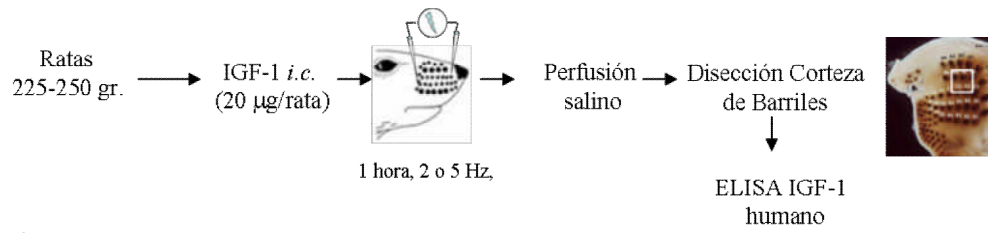
A. El IGF-1 humano se inyectó *i.c.* a animales anestesiados, se estimuló el pedúnculo a 5 Hz durante 15 minutos, se perfundió el animal con solución salina para lavar la sangre y se extrajo el cerebelo para medir niveles de IGF-1 humano. Los “#” indican neuronas positivas para el marcador molecular de activación neuronal c-fos en la corteza cerebelosa de animales estimulados. Aumento 40X, p.c.i pedúnculo cerebeloso inferior. B. Niveles de IGF-1 humano captado de la sangre en cerebelo después de la estimulación del pedúnculo cerebeloso inferior. La estimulación incrementó los niveles de IGF-1 en los cerebelos de los animales estimulados pero no modificó los niveles en el bulbo olfativo.

## C.2. Captación de IGF-1 en corteza de barriles

La estimulación eléctrica sub-epidérmica en la almohadilla de las vibrisas es una técnica poco invasiva que imita la estimulación sensorial natural produciendo una respuesta en la corteza somestésica primaria (Castro-Alamancos, 2004). Al igual que en el experimento anterior, en este experimento estudiamos la captación del IGF-1 de la sangre a la corteza somatosensorial después de la estimulación eléctrica de las vibrisas. Coincidiendo con lo observado en cerebelo, la estimulación eléctrica de las vibrisas incrementó la captación de IGF-1 en la corteza de barriles contralateral ( $30,74 \pm 3,64$  pg/ $\mu$ g proteína en estimulados,  $18,12 \pm 2,87$  pg/ $\mu$ g proteína en no estimulados, N 20 y 14 respectivamente; Figura 12 A). El aumento en la captación de IGF-1 es específico de la corteza de barriles ya que los niveles de IGF-1 en el bulbo olfativo son similares en animales estimulados ( $19,67 \pm 3,78$ , N = 9) y no estimulados ( $16,73 \pm 2,77$ , N = 7; Figura 12 B).

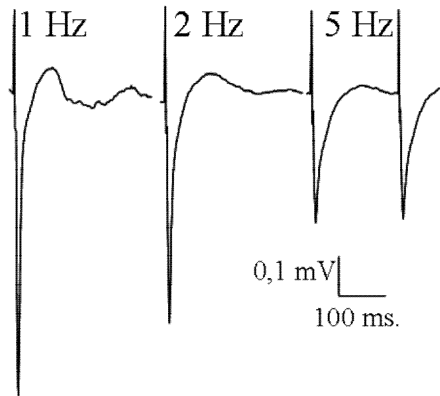
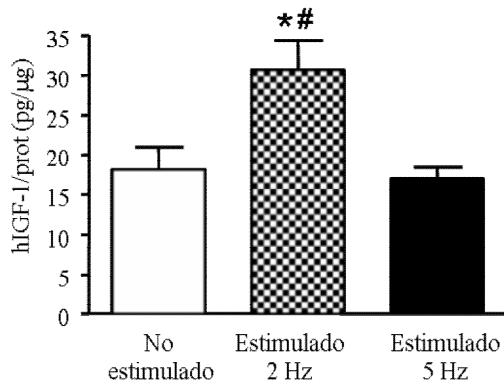
La respuesta de las neuronas corticales de la corteza de barriles es dependiente de la frecuencia de estimulación de las vibrisas, con frecuencias de estimulación superiores a 2 Hz las neuronas corticales se desensibilizan como consecuencia de la depresión dependiente de actividad de las sinapsis tálamo-corticales (Chung et al., 2002). Concordando con las dependencia de frecuencia de la actividad eléctrica en la corteza, la captación de IGF-1 no se incrementa si se aumenta la frecuencia de estimulación de las vibrisas a 5Hz ( $16,99 \pm 1,43$  pg/ $\mu$ g proteína, N = 10; Figura 12 A).

Como se mencionó en la introducción, las evidencias disponibles hasta el momento sobre la entrada de IGF-1 de la sangre al cerebro indican que la principal vía de entrada es a través del plexo coroideo y el LCR (Carro et al., 2000; Carro et al., 2005). Para comprobar si la estimulación de las vibrisas incrementaba la captación de IGF-1 a través de plexo coroideo medimos sus niveles en el LCR. Los niveles de IGF-1 en LCR no se vieron modificados tras 1 hora de estimulación de las vibrisas ( $99,77 \pm 4,64$  ng/ml, en estimulados,  $93,76 \pm 6,89$  ng/ml en no estimulados, N = 8 en ambos grupos,  $p = 0,48$  test de student) sugiriendo que el aumento en la captación de IGF-1 en la corteza no se produce a través del aumento de los niveles en LCR (Figura 12 C).



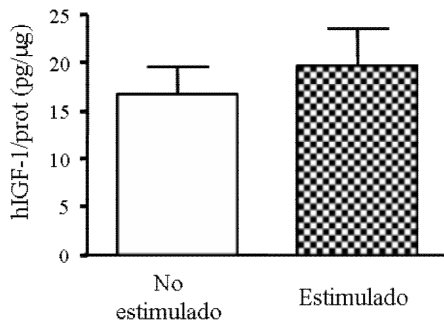
**A**

**Corteza de barriles**



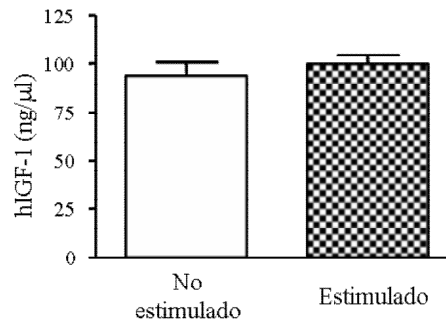
**B**

**Bulbo olfativo**



**C**

**LCR**



**Figura 12. La estimulación eléctrica de las vibrisas incrementa la captación de IGF-1 en la corteza de barriles.**

**A.** Niveles de IGF-1 en corteza de barriles tras la estimulación eléctrica de las vibrisas. Los niveles de IGF-1 fueron mayores en las cortezas de los animales estimulados a 2 Hz que en las cortezas de los animales no estimulados o estimulados a 5 Hz. Los trazos de la derecha son el promedio de 100 potenciales evocados en la corteza de barriles, la estimulación a 5 Hz produce una respuesta del 50 % de amplitud que la evocada por la estimulación a 2 Hz; #  $p < 0,05$  comparado con estimulados 5Hz. **B.** Niveles de IGF-1 humano en el bulbo olfativo de los animales estimulados y no estimulados, no se observaron diferencias significativas ( $p = 0,56$ ). **C.** La estimulación eléctrica de las vibrisas no incrementa los niveles de IGF-1 en LCR. El esquema superior ilustra el protocolo experimental utilizado en A.

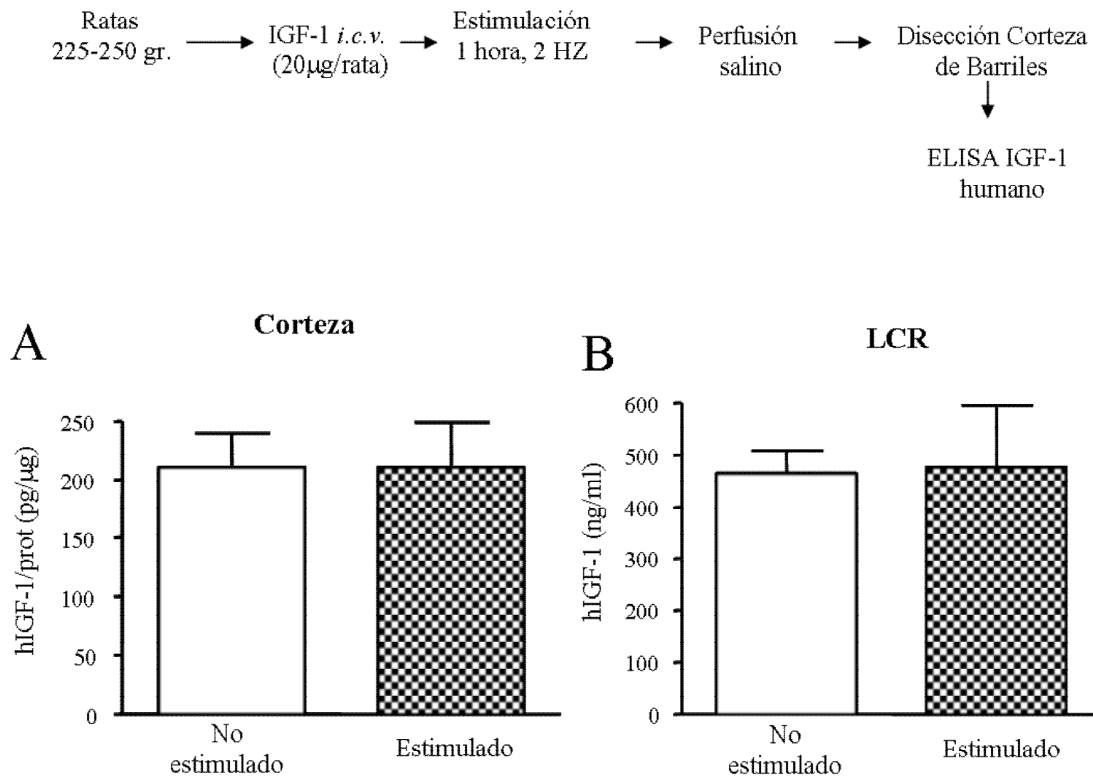
La fotografía de la corteza de barriles ha sido adaptada a partir de:  
([www.ias.uwe.ac.uk/WhiskerBot/whiskerbot.htm](http://www.ias.uwe.ac.uk/WhiskerBot/whiskerbot.htm)).

La distribución del IGF-1 circulante en el cerebro puede modularse tanto a través de su entrada (Carro et al., 2000) como de su distribución (Guan et al., 2000; Nagaraja et al., 2005). Para investigar cual de estos factores produce el incremento de IGF-1 en la corteza de barriles por actividad neuronal, repetimos el experimento de estimulación de las vibrisas administrando ahora el IGF-1 de forma intra-cerebro-ventricular (i.c.v). Si la actividad eléctrica modulase la localización del IGF-1 presente en el cerebro, este efecto sería evidente incluso después de incrementar sus niveles intracerebrales. Si, por el contrario, la actividad eléctrica modula la captación del IGF-1 circulante, un aumento generalizado de los niveles de IGF-1 intracerebrales eliminaría su acción. Los niveles de IGF-1 en la corteza de barriles después de la inyección de IGF-1 icv fueron similares en los animales estimulados ( $211,0 \pm 38,10$  pg/ $\mu$ g proteína, N = 7) y no estimulados ( $211,0 \pm 28,53$  pg/ $\mu$ g proteína, N = 8), apoyando la posibilidad de que la actividad neuronal modula la captación del IGF-1 y no su localización (Figura 13).

Las vías somatosensoriales son cruzadas, es decir, la representación cortical de un hemisferio se encuentra en la corteza somatosensorial del hemisferio cerebral del lado opuesto, aunque en toda la corteza existen conexiones interhemisfericas. No obstante debido a que el protocolo de estimulación de vibrisas solo estimula las vibrisas de un lado del rostro, sería esperable que el aumento en la captación de IGF-1 se viese limitado al hemisferio cortical correspondiente (el contralateral). Sin embargo el análisis del IGF-1 presente en los dos hemisferios de los animales estimulados indica que no existen diferencias inter-hemisfericas (Figura 13). Una posible explicación a estos resultados es la existencia de conexiones interhemisfericas que incrementen la actividad neuronal en los dos hemisferios (Wiest et al., 2005). Alternativamente puede ser el reflejo de las limitaciones técnicas del método de análisis por ELISA.

### **C.3. Análisis inmunohistoquímico de la captación de IGF-1**

Con el objetivo de obtener mayor información sobre la localización del IGF-1 captado por actividad neuronal realizamos un análisis por inmunohistoquímica de la captación de IGF-1 después de la estimulación de las vibrisas. Debido a la falta de anticuerpos específicos de IGF-1 de rata o humano caracterizados para la detección inmunohistoquímica optamos por una estrategia de marcado del IGF-1 con digoxigenina (IGF-DIG), una molécula vegetal detectable fácilmente por medio de anticuerpos y que unida a IGF-1 no altera su capacidad de entrar al cerebro (Carro et al., 2000).



**Figura 13.** La estimulación eléctrica de las vibrisas no incrementa la captación de IGF-1 en la corteza de barriles tras su inyección *i.c.v.*

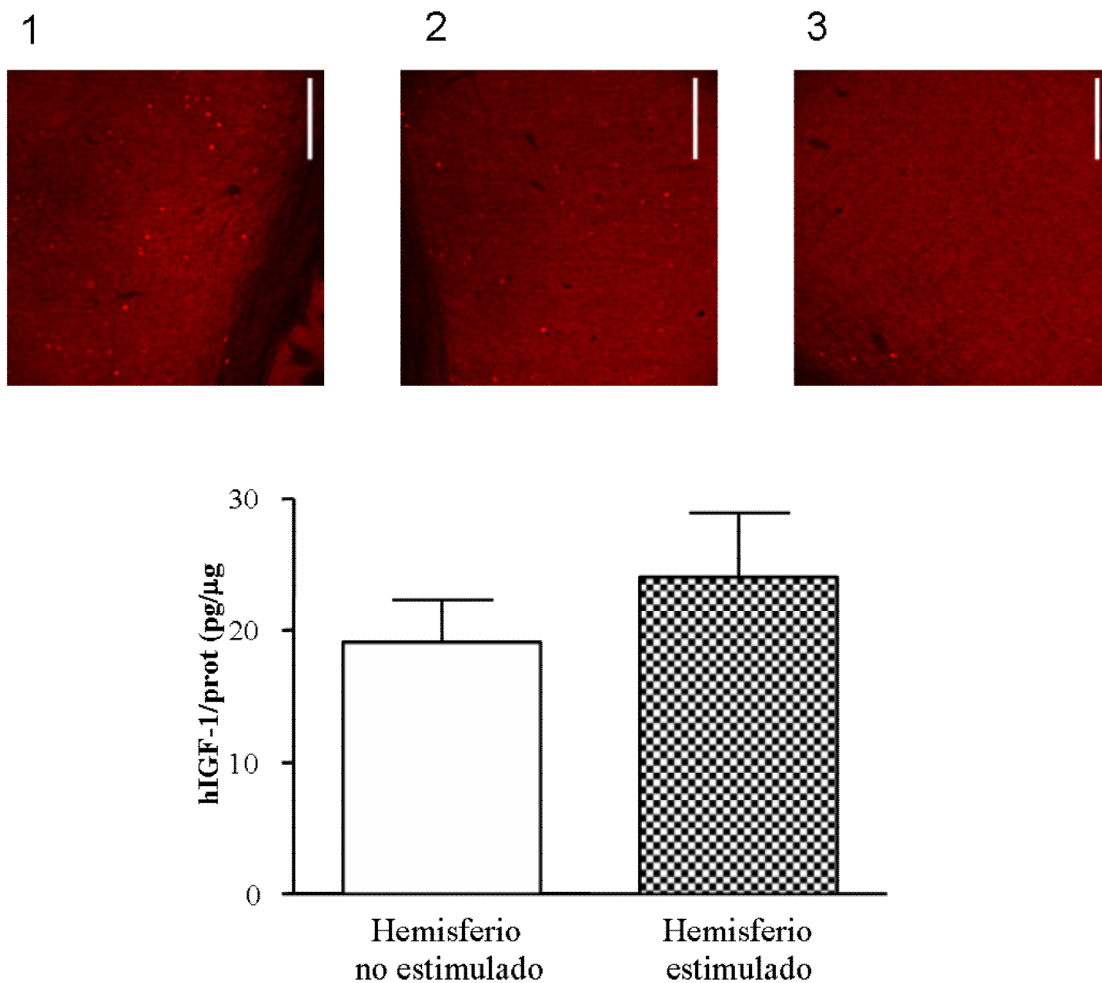
**A.** Niveles de IGF-1 en la corteza de barriles tras la estimulación eléctrica de las vibrisas cuando el IGF-1 se inyecta *i.c.v.* Utilizando esta vía de administración el aumento de IGF-1 asociado a la actividad neuronal desaparece observándose niveles similares en animales estimulado y no estimulado. **B.** Los niveles de IGF-1 en LCR tras la inyección *i.c.v.* son elevados (comparar con figura 12) y similares en animales estimulado ( $477.3 \pm 118.4$  ng/ml, N = 6) y no estimulado ( $465.7 \pm 43.55$  ng/ml, N = 7).

La estimulación de las vibrisas durante una hora a 2Hz tras la administración *i.c* de 20 µg de IGF-DIG indujo su captación en el hemisferio contralateral en la corteza de barriles (Figura 15). La coherencia entre las zonas de captación y la localización de corteza de barriles se mantuvo en el sentido rostro-caudal, de manera que en diferentes niveles del eje rostro caudal se observó la presencia de IGF-DIG en corteza de barriles (Figura 15).

Para comprobar la especificidad de la señal observada realizamos un ensayo de inmunofluorescencia doble analizando la colocalización de la inmunodetección de digoxigenina e IGF-1. La señal de digoxigenina colocaliza con la señal de IGF-1 (Figura 16) sugiriendo que corresponde a IGF-DIG; por su parte la señal de IGF-1 colocaliza sólo parcialmente con la señal de digoxigenina ya que el anticuerpo utilizado reconoce tanto el IGF-1 de rata como el de humano (Figura 17). A continuación estudiamos la captación de IGF-DIG en la estación de relevo talámica de la vía sensitiva

de las vibrisas, el núcleo talámico ventro-postero-medial (VPM). De la misma forma que en la corteza, la señal de IGF

-DIG se localiza en el VPM contralateral al sitio de estimulación, sugiriendo que la captación de IGF-DIG en el tálamo se incrementa por la actividad neuronal (Figura 17).



**Figura 14. No existen diferencias interhemisféricas en la captación de IGF-1.**

No se observaron diferencias en el contenido de IGF-1 humano entre las cortezas de barriles del hemisferio “estimulado” (contralateral al sitio de la estimulación) y del hemisferio “no estimulado” (ipsilateral al sitio de la estimulación;  $p = 0,399$ ). Las fotografías ilustran la inmunoreactividad observada contra c-fos en el hemisferio estimulado (1) y no estimulado (2) de un animal estimulado y en un animal no estimulado (3). Barras de calibración 100  $\mu\text{m}$ .

Al igual que la estimulación de las vibrisas, la estimulación del nervio ciático incrementó la captación de IGF-1 en la corteza somatosensorial en la región correspondiente a la sensibilidad del miembro inferior contralateral apoyando la generalidad del incremento de la captación de IGF-1 por la actividad neuronal (Figura 18).

**Figura 15. El IGF-1 captado se localiza en corteza de barriles**

A. Imágenes obtenidas a 1X del extremo rostral de la corteza de barriles de una animal estimulado en las vibrisas e inyectado con IGF-DIG. La reactividad contra digoxigenina se localiza en el hemisferio estimulado principalmente en la corteza de barriles. La imagen de la derecha corresponde a un detalle a 20X de la zona recuadrada. B. Imagen de una región más caudal de la corteza de barriles, donde al igual que en "A" la marca se localiza en la corteza de barriles. Se observa también reactividad en zonas periventriculares como área CA1 del hipocampo y el núcleo hipotalámico dorso medial (DMC). C. Imagen correspondiente a un animal inyectado con IGF-DIG sin estimulación en las vibrisas. En este caso no existen diferencias entre hemisferios. M1, corteza motora primaria; S1HL, corteza sensitiva primaria área miembro inferior; S1FL, corteza sensitiva primaria área miembro superior; S1BF, corteza sensitiva primaria área de barriles; RET, núcleo reticular talámico; VPM, núcleo talámico posteromedial.



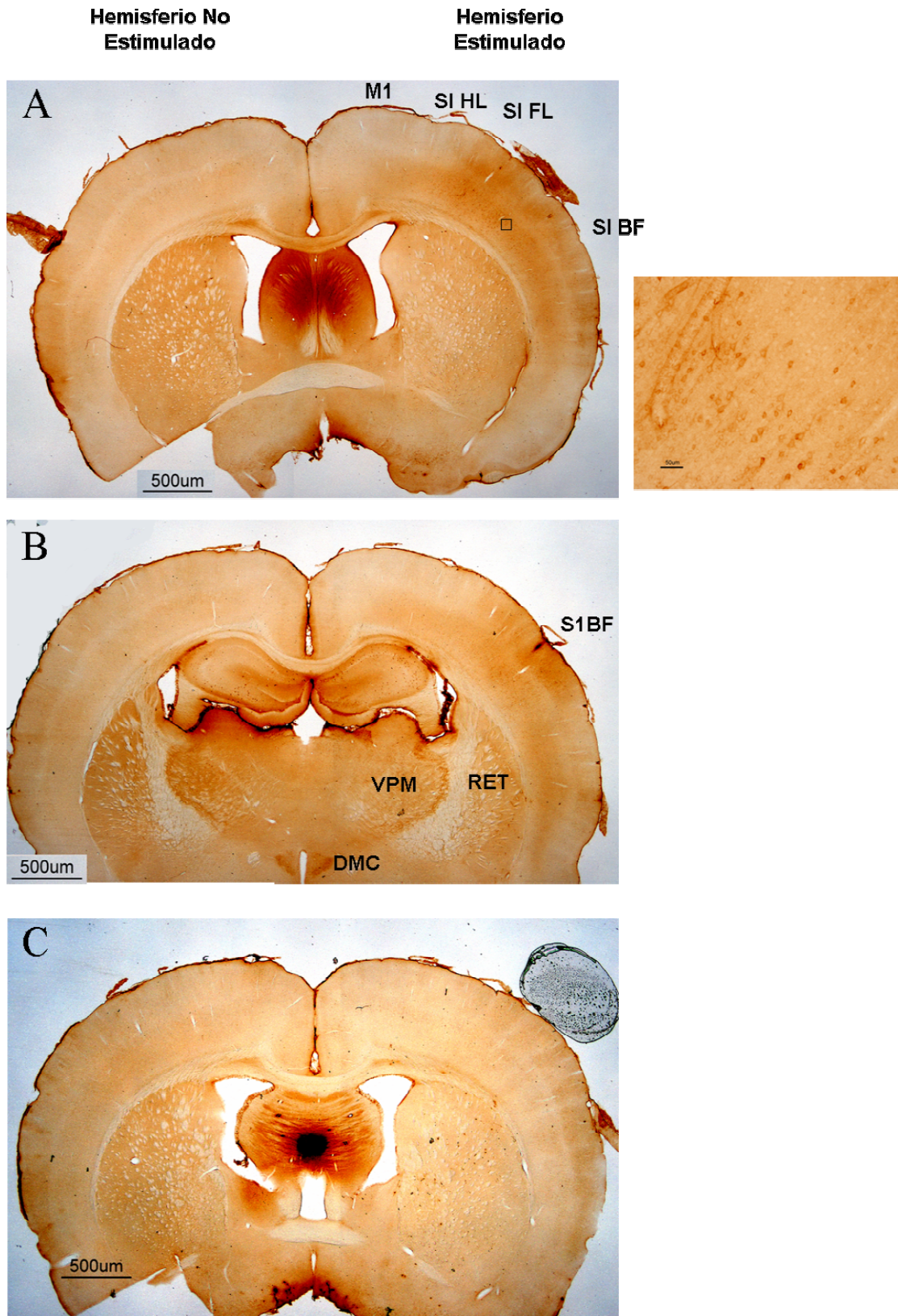
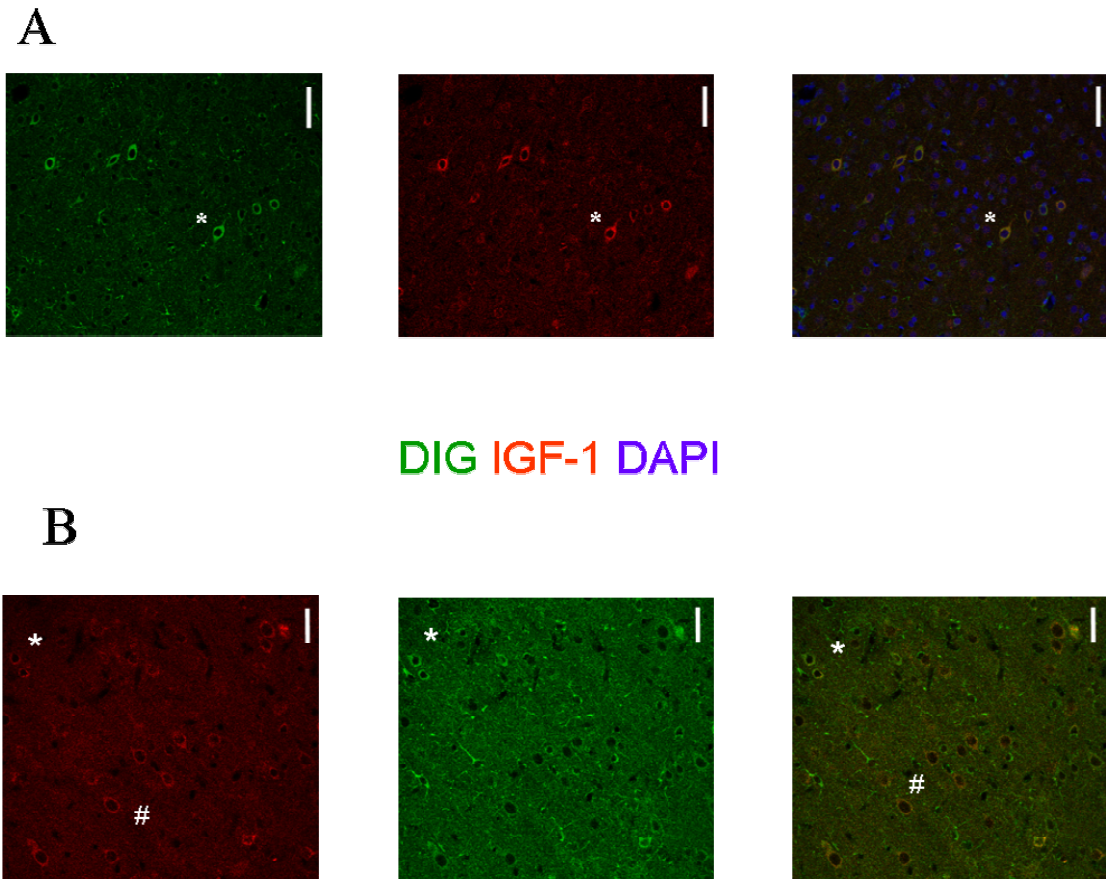
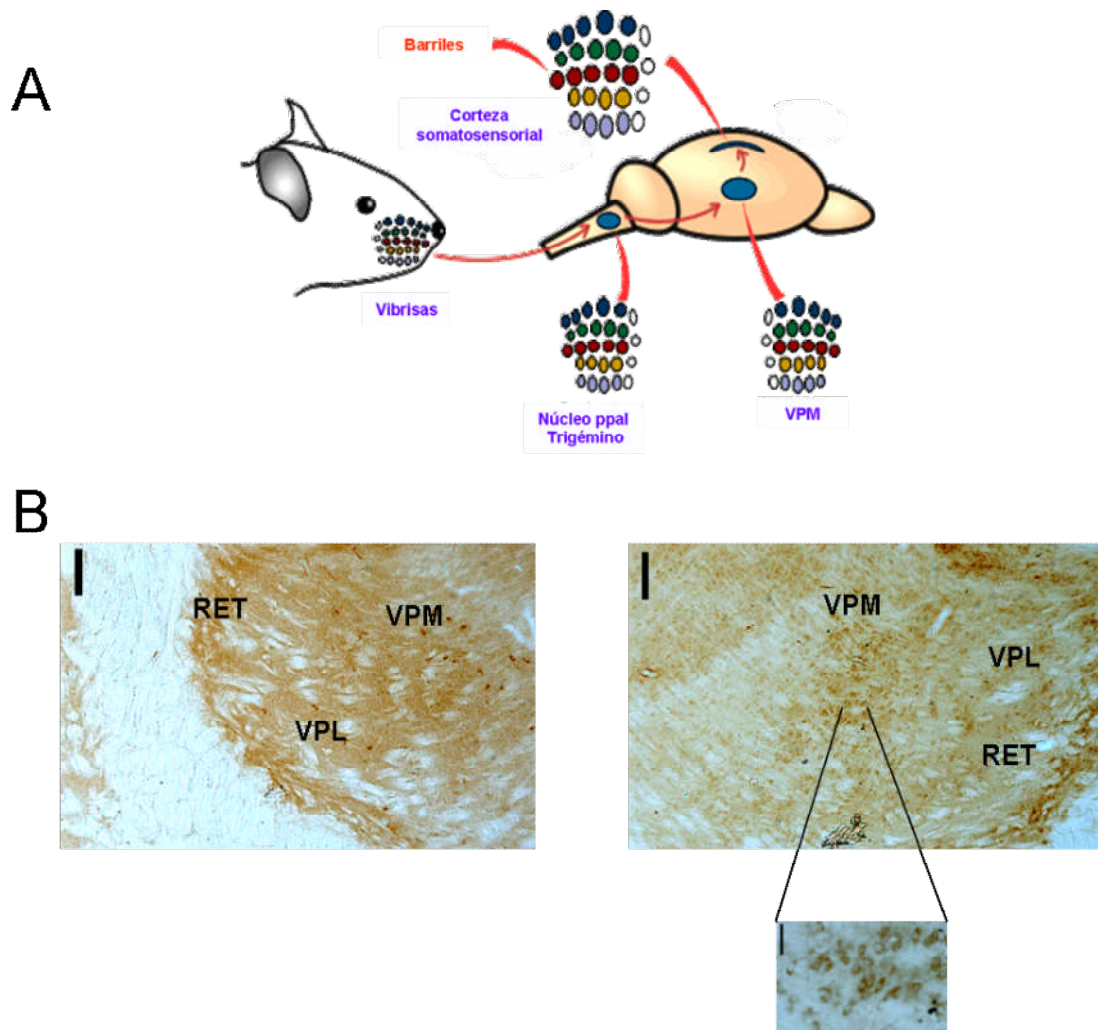


FIGURA 15



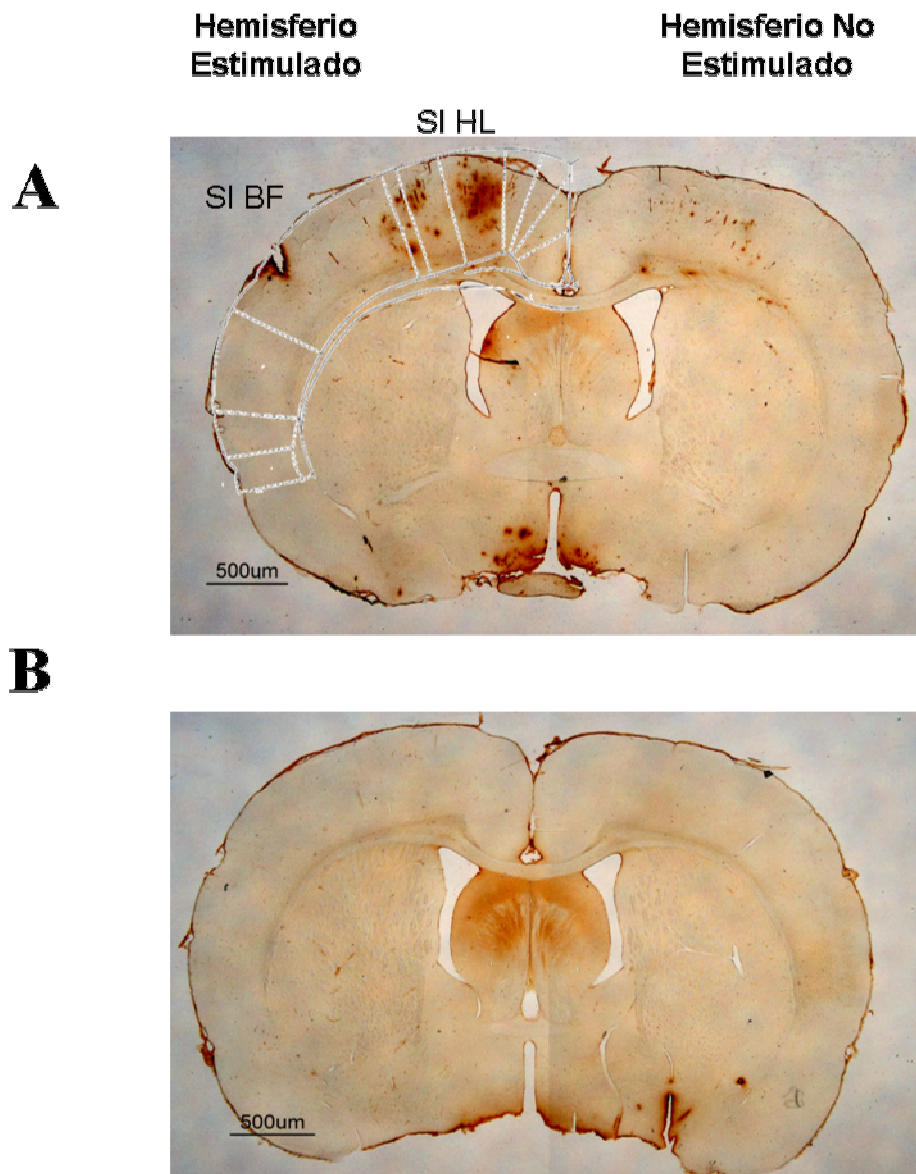
**Figura 16. Especificidad de la señal de digoxigenina.**

**A** Fotografías ilustrativas de la reactividad observada contra IGF-1 y digoxigenina. Las señales colocalizan demostrando la efectividad de la inmunodetección de digoxigenina para localizar IGF-DIG. **B.** Fotografías ilustrando la presencia de células positivas para IGF-1 que no son positivas para digoxigenina. \* perfiles positivos tanto para IGF-1 como para digoxigenina. # perfiles positivos para IGF-1 negativos para digoxigenina. Las fotografías de A y B corresponden a un animal diferente. Aumento 40X barra de calibración, 50  $\mu$ m.



**Figura 17. La estimulación de las vibrisas incrementa la captación de IGF-1 en tálamo.**

A. Esquema de la vía somatosensorial. Las terminales sensitivas de las neuronas del núcleo principal del trigémino hacen sinapsis en el núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM). Las neuronas tálamicas a su vez envían axones a las neuronas corticales de capa IV en la corteza de barriles. La decusación de la vía se produce en el tronco del encéfalo de manera que la representaciones tálamica y cortical son contralaterales al campo receptivo (adaptado desde <http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/pathway/somatosensory.htm>). B. Fotografías de la inmunoreactividad contra digoxigenina en el tálamo de un animal estimulado en las vibrisas e inyectado con IGF-DIG. La señal de DIG se localiza en el hemi-tálamo estimulado (contralateral, fotografía derecha) y no en el hemi-tálamo no estimulado (contralateral, imagen izquierda) al sitio estimulado. La imagen de la izquierda corresponde al hemi-tálamo contralateral del mismo animal. Las imágenes fueron tomadas a 5X y el detalle a 40X. RET, núcleo reticular del tálamo; VPL núcleo posterolateral del tálamo. Barras de calibración de imágenes 5X: 200  $\mu$ m, 40X: 50  $\mu$ m



**Figura 18.** Captación de IGF-DIG en la corteza somatósensorial tras la estimulación del nervio ciático.

**A.** Composición de imágenes de una animal estimulado en el nervio ciático e inyectado con IGF-DIG *i.c.* (20 µg/rata). La captación de IGF-1 se localizó en la corteza somatosensorial correspondiente al miembro inferior confirmando los resultados obtenidos tras la estimulación de las vibrisas. **B.** En un animal no estimulado, no se observa marca de IGF-DIG. Aumento 1X.; S1HL, corteza sensitiva primaria área miembro inferior; S1BF, corteza sensitiva primaria área de barriles.

## Parte II

Sumado al descenso en los niveles de insulina, la diabetes mellitus produce una disminución en los niveles de IGF-1 circulante (Busiguina et al., 1996; Maes et al., 1983; Wuarin et al., 1994). En la segunda parte del trabajo continuaremos estudiando la acción del IGF-1 circulante sobre el sistema nervioso utilizando la diabetes como un modelo patológico. Concentraremos nuestro estudio en la neuropatía diabética, ya que se trata de un síndrome neurológico que afecta al sistema nervioso periférico y central y que se encuentra relacionado con las alteraciones del IGF-1 (Ishii, 1995). Para ello caracterizaremos las alteraciones del sistema somatosensorial central y periférico y posteriormente investigaremos el efecto del tratamiento con IGF-1 sobre su desarrollo.

### **A. Caracterización de la neuropatía diabética central y periférica**

Para estudiar el efecto del IGF-1 en las alteraciones neurológicas asociadas a la diabetes comenzamos caracterizando el desarrollo periférico y central de la neuropatía diabética. La diabetes fue inducida en ratas por medio de la inyección de streptozotocina (STZ). En los 3 días posteriores a la inyección de la droga más del 80% de los animales desarrollaron una marcada hiperglicemia (>350 mg/dl) indicando que habían desarrollado diabetes. Los animales que no desarrollaron diabetes tras la inyección de STZ no fueron incluidos en el estudio. Durante la duración del experimento las ratas diabéticas (RDs) no aumentaron de peso (Tabla 6) y exhibieron poliuria, hiperfagia y polidipsia.

Tabla 6: Glicemia y peso corporal de las ratas controles y diabéticas.

Grupo	Peso previo a STZ	Peso 4 semanas	Glucosa 4 semanas	Peso 8 semanas	Glucosa 8 semanas
Control (n = 6)	271,42 ± 3,04	339,1 ± 8,63	92,00 ± 2,63	369,5 ± 3,83	89,11 ± 2,65
Diabéticas (n = 10)	273,1 ± 2,23	233,2 ± 7,70	592 ± 6,51	216 ± 4,72	562,3 ± 17,88
Diabéticas + IGF-1 (n = 10)	275,5 ± 2,63	233,8 ± 4,58	553,71 ± 30,61	248,57 ± 13,21	573,75 ± 12,65

El peso corporal es expresado en gramos, la glicemia es expresada como dg/ml. Los datos corresponden a grupos desarrollados en paralelo.

El primer paso para caracterizar la neuropatía diabética en nuestro modelo fue estudiar las alteraciones perceptivas en este modelo, para ello estudiamos la sensibilidad térmica en las ratas diabéticas

### **A.1. Desarrollo de las alteraciones en la percepción térmica**

La sensibilidad térmica de las RDs fue medida 4 y 8 semanas después de la inducción de la diabetes mediante el “plantar test”. En este ensayo se coloca una fuente de radiación infrarroja debajo de la pata de la rata y se contabiliza el tiempo que tarda el animal en retirarla. Los experimentos se realizaron incluyendo un grupo de ratas no diabéticas cuyo tiempo medio de respuesta se utilizó como 100%. A las 4 semanas de diabetes las RDs presentaron menor sensibilidad térmica que las ratas control ( $126,8 \pm 5,27$  %, N = 43; Figura 19) esta hiposensibilidad térmica se agravó a las 8 semanas de diabetes ( $149 \pm 9,78$  %, N = 22; Figura 19).

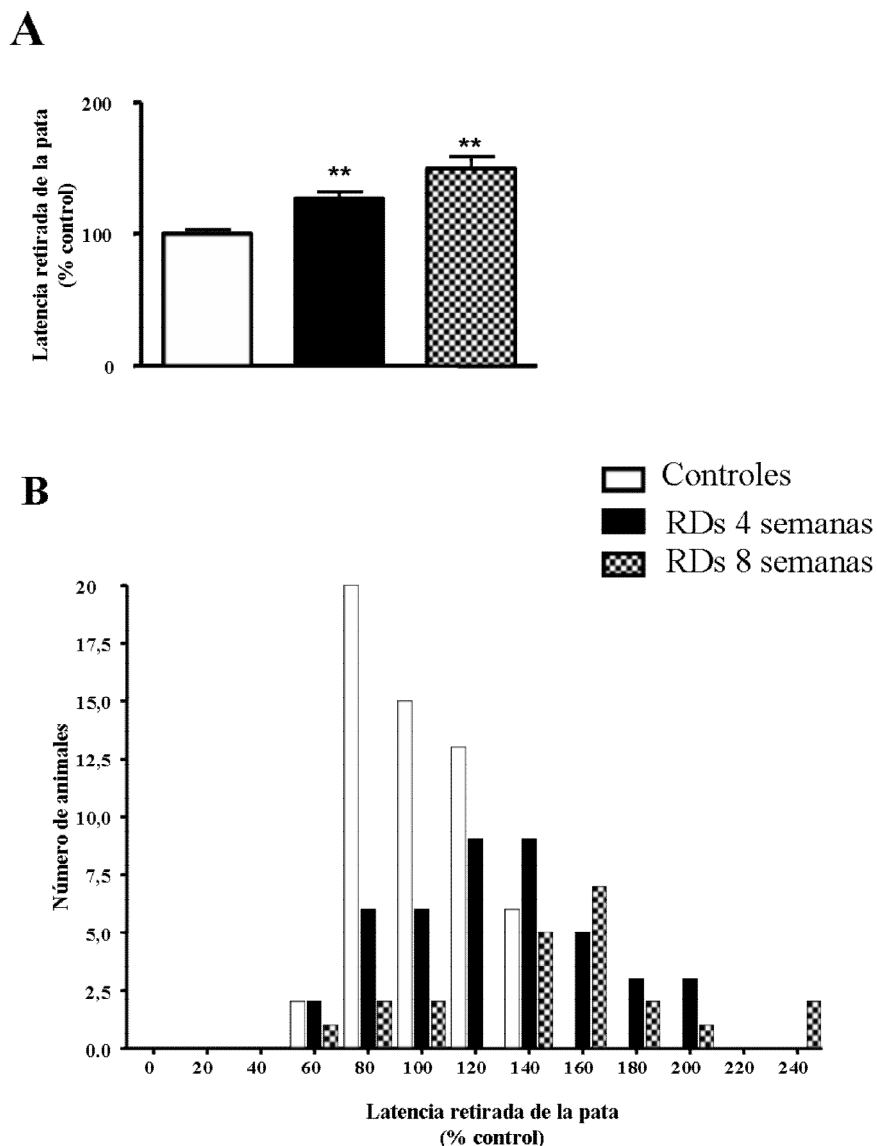
### **A.2. Análisis de la neuropatía diabética periférica**

El presente estudio de las alteraciones asociadas a la neuropatía diabética se centró en la comparación entre las alteraciones del sistema nervioso periférico y el sistema nervioso central (SNC) a las 4 y 8 semanas de diabetes, analizándose principalmente la vía somatosensorial. Como se mencionó en la introducción, las alteraciones del sistema nervioso periférico han sido ampliamente estudiadas mientras que las alteraciones del SNC no han sido estudiadas en profundidad y su causas permanecen mayoritariamente incomprendidas. En una primera aproximación para analizar las alteraciones periféricas estudiamos el funcionamiento de los nervios periféricos midiendo la velocidad de conducción de los nervios motores (VCNM).

A las 4 semanas de diabetes la VCNM se encuentra reducida y esta alteración permanece constante en las RDs de 8 semanas (Figura 19 A). Indicando que la alteración en VCNM asociada a la diabetes ya se encuentra establecida a las 4 semanas de diabetes y se mantiene estable entre las 4 y las 8.

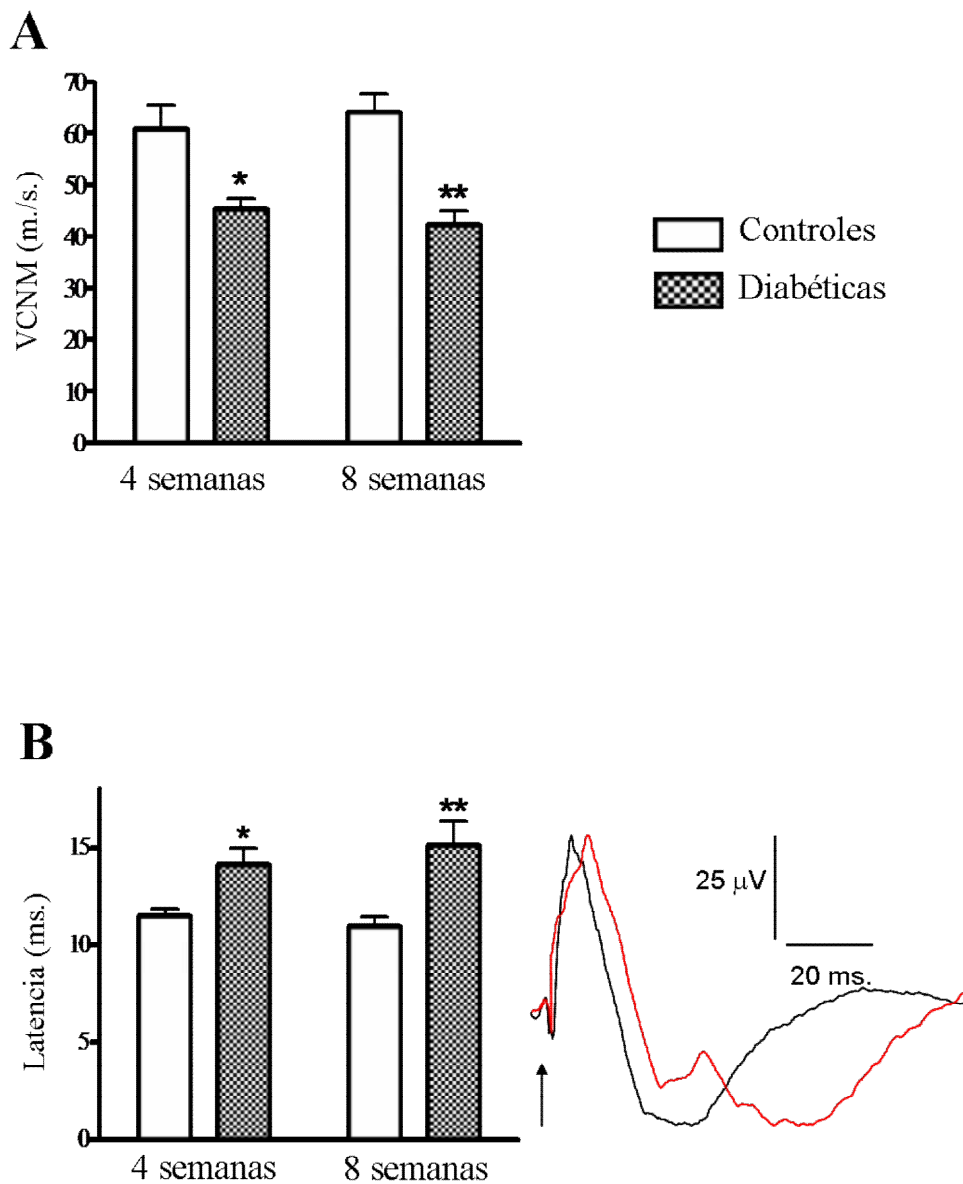
El siguiente paso fue investigar el funcionamiento de la vía somatosensorial propioceptiva en la primer estación de relevo, el núcleo gracilis de los núcleos del cordón posterior (NCP), para ello medimos la latencia del potencial evocado en los NCP por la estimulación del nervio ciático (potencial nervio-gracilis). El potencial nervio-

gracilis consistió en una onda positiva inicial seguida por una onda negativa de larga duración y gran amplitud, atribuible a la activación de las vía espinales descendentes por “rebote” del estímulo. El pico de la primera onda positiva fue utilizado para comparar los valores de latencia del potencial nervio-gracilis (Figura. 19 B). Concordando con lo observado en la medición de la VCNM la latencia de los potenciales nervio-gracilis se incrementó significativamente en las RDs de 4 semanas (controles  $11,5 \pm 0,36$  ms RDs 4 semanas:  $14,1 \pm 0,86$  ms, N= 13 y 10 respectivamente) y 8 semanas (controles  $10,96 \pm 0,46$  ms., RDs 8 semanas:  $15,1 \pm 1,18$  ms, N = 9 y 11 respectivamente).



**Figura 19. Desarrollo de la hiposensibilidad térmica.**

**A.** Tiempo medio de respuesta de retirada de la pata frente a la radiación infrarroja. Las RDs presentaron una marcada pérdida de sensibilidad térmica a las 4 y a las 8 semanas de diabetes. **B.** Histograma de distribución de frecuencias de las respuestas a la radiación infrarroja; se observa una tendencia homogénea hacia el incremento de las latencias en las RDs.



**Figura 20. Desarrollo de la neuropatía diabética periférica**

**A.** VCNM en las ratas diabéticas. A las 4 semanas de diabetes las VCNM se encuentra alterada, esta alteración permanece sin cambios entre las 4 y las 8 semanas de diabetes. **B.** Latencias de los potenciales nervio-gracilis. La latencias del potencial nervio-gracilis no se diferenció entre los dos grupos de ratas controles mientras que ambos grupos de RDs presentaron latencias significativamente mayores que sus controles. Los trazos son el promedio de 100 potenciales evocados en una rata control (línea negra) y una rata diabética de 4 semanas (línea roja), la flecha indica el momento de la estimulación.

### A.3. Análisis de la neuropatía diabética central

Los resultados previos indican que el IGF-1 circulante puede modular la actividad neuronal. Por tanto, en situaciones patológicas como la diabetes, la disminución de los niveles séricos de IGF-1 podría provocar alteraciones importantes en el procesamiento de la información sensorial. Con el objetivo de investigar las posibles alteraciones centrales del funcionamiento del sistema somatosensorial en ratas



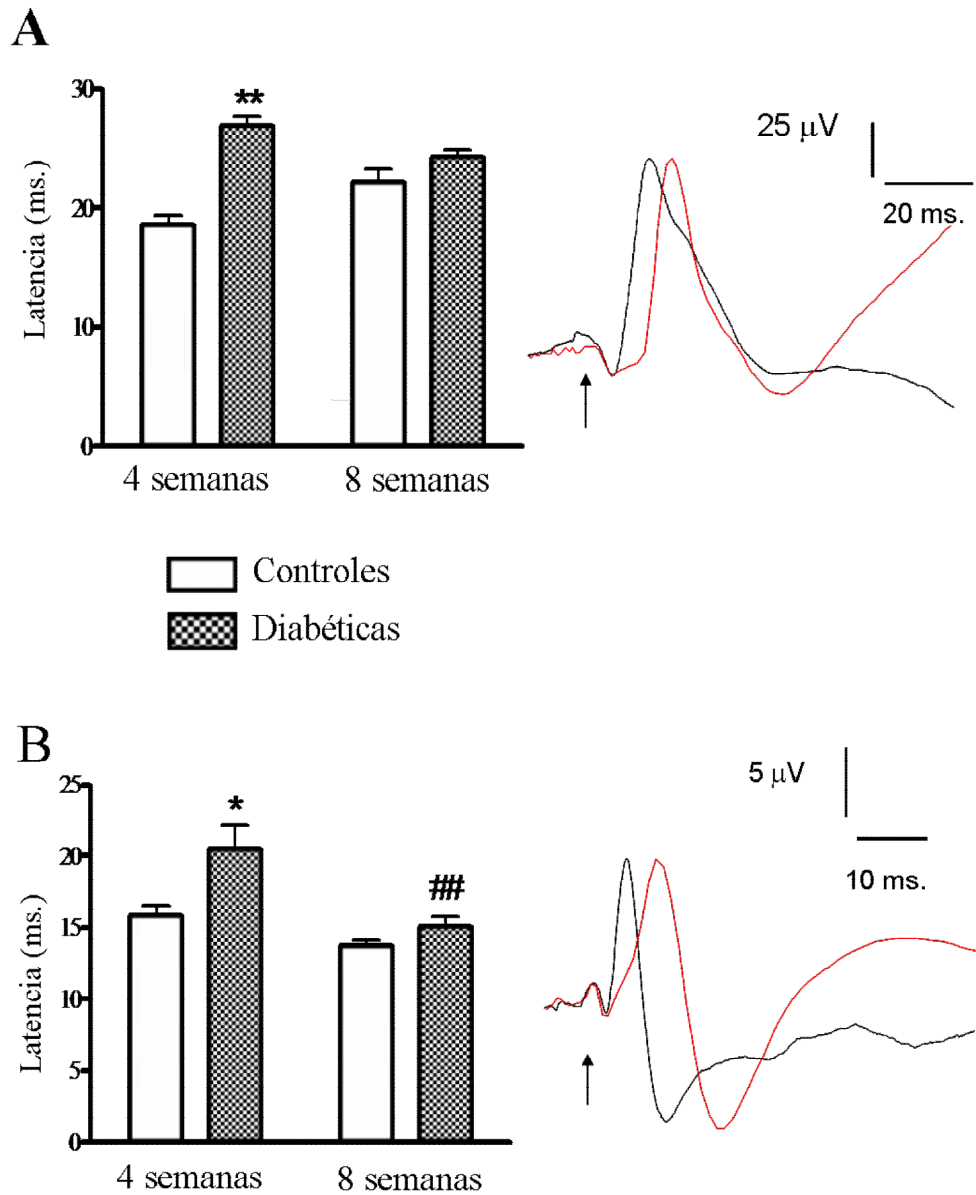
---

diabéticas, estudiamos los potenciales evocados en la corteza somatosensorial primaria (SI) por la estimulación del nervio ciático (potencial nervio-corteza, Figura 21 A). De esta forma analizamos la transmisión de la información somatosensorial en todo su recorrido, desde el nervio periférico hasta la SI.

El potencial nervio-corteza consistió en una onda positiva bien definida que cambia de polaridad al introducir el electrodo a mayor profundidad en la corteza. En concordancia con el incremento de la latencia del potencial nervio-gracilis, las RDs de 4 semanas presentaron una latencia mayor del potencial nervio-corteza que sus controles (controles:  $18,64 \pm 0,74$ , N = 10; RDs:  $26,94 \pm 0,74$ , N = 14; Figura 21 A). Por el contrario las RDs de 8 semanas presentaron una recuperación espontánea de latencia de los potenciales nervio-corteza alcanzando valores similares a los controles (controles:  $22,13 \pm 1,12$ , N = 10; RDs:  $24,25 \pm 0,64$ , N = 11; Figura 21 A). Reforzando esta observación el análisis estadístico indica que existe una interacción significativa ( $p < 0.01$ ) entre el factor “diabetes” y el factor “tiempo post inyección,” indicando que la diabetes afecta diferencialmente la latencia de los potenciales nervio-corteza en las RDs de 4 y 8 semanas. Notablemente, esta recuperación espontánea entre las 4 y las 8 semanas se observó en la latencia del potencial nervio-corteza pero no se observa en la VCNM ni en la latencia del potencial nervio-gracilis, sugiriendo que se origina en la sección del SNC de la vía somatosensorial; para poner a prueba esta hipótesis registramos los potenciales evocados en SI por estimulación de los NCP (potenciales NCP-corteza).

Coincidiendo con las latencias de los potenciales nervio-corteza las latencias de los potenciales NCP-corteza de las RDs de 4 semanas fueron mayores que la de sus controles ( $20,47 \pm 1,64$ , N = 11 en RDs vs.  $15,86 \pm 0,68$ , N = 10 en los controles, Figura 21 B) mientras que en las RDs de 8 semanas las latencias de estos potenciales fueron normales ( $15,07 \pm 0,68$ , N = 15 en RDs vs.  $13,7 \pm 0,35$ , N = 9 en los controles; Figura 21 B) llegando a ser significativamente menores que las latencias de las RDs de 4 semanas. Estos datos sugieren que entre las 4 y las 8 semanas de diabetes existe un fenómeno de recuperación espontánea de la vía somatosensorial. Alternativamente esta recuperación podría ser producto de un proceso madurativo entre las 4 y las 8 semanas post-inyección (correspondientes a 4 a 5 meses de edad), el análisis estadístico indica que

la interacción entre este el factor “tiempo post inyección” y el factor “diabetes” no fue significativa, lo que no permite descartar esa hipótesis.



**Figura 21. Desarrollo de la neuropatía diabética central.**

**A.** Potenciales nervio-corteza. Las latencias fueron mayores en las RDs de 4 mientras que en las RDs de 8 semanas retornaron a valores normales. **B.** Potenciales NCP-corteza. Al igual que en los potenciales nervio-corteza las latencias son mayores en las RDs de 4 semanas y no en las RDs de 8 semanas. Incluso las RDs de 8 semanas tienen latencias menores que las RDs de 4 semanas indicando que las latencias se modifican espontáneamente en las RDs. ##  $p < 0,01$  comparado con RDs de 4 semanas. Los trazos son el promedio de 100 potenciales evocados en una rata control (línea negra) y una rata diabética de 4 semanas (línea roja), la flecha indica el momento de la estimulación.

## **A.4. Análisis de la corteza somatosensorial**

### **A.4.1. Amplitud de potenciales evocados**

El análisis de los potenciales evocados no solo permite estudiar el funcionamiento de la transmisión nerviosa midiendo la latencia, también permite estudiar el estado de la transmisión sináptica. Los picos de los potenciales evocados reflejan la sumatoria de los potenciales sinápticos que por ser de mayor duración temporal que los potenciales de acción poseen mayor probabilidad de sumarse temporalmente para dar una respuesta poblacional. De esta forma la amplitud de los potenciales evocados es una medida de la cantidad de sinapsis que se activan sincronizadamente tras la llegada del estímulo.

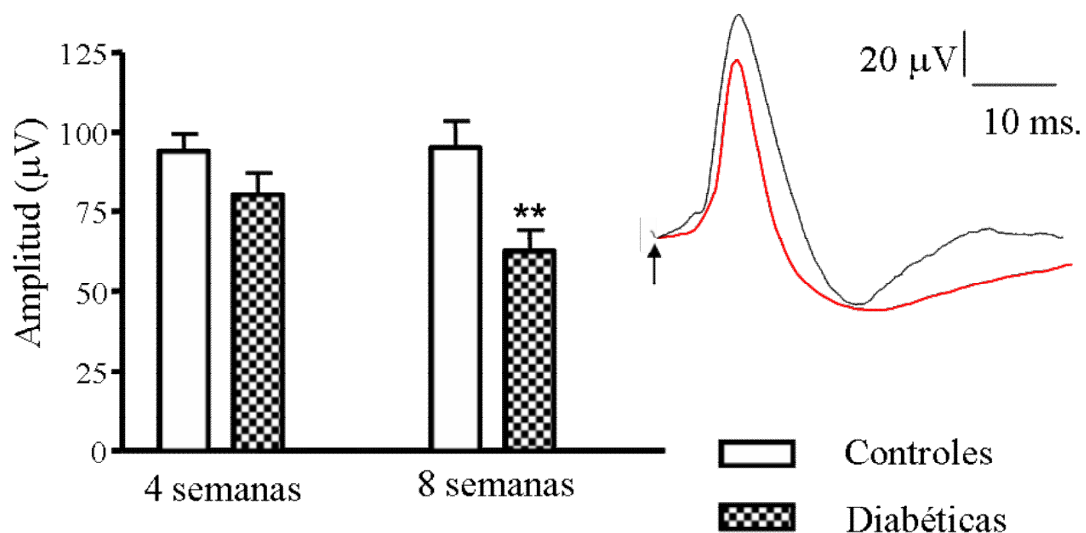
Para estudiar en mayor profundidad las alteraciones en el sistema somatosensorial central analizamos las amplitudes de los potenciales nervio-corteza en ratas controles y diabéticas. Nuestro estudio se centró en ese tipo de potenciales puesto que poseen la mayor relación amplitud/ruido y la distancia y la cantidad de sinapsis entre el sitio de estimulación y el de registro hacen que la amplitud dependa en menor medida de la intensidad de estimulación que los potenciales nervio-gracilis y los potenciales NCP-corteza. A diferencia de lo observado al estudiar las latencias, la amplitud de los potenciales nervio-corteza fue similar entre ratas diabéticas y controles de 4 semanas (Figura 22). Por el contrario en las RDs de 8 semanas la amplitud de los potenciales disminuyó desde  $95,2 \pm 8,3 \mu\text{V}$  en las ratas control ( $N = 10$ ) hasta  $62,6 \pm 6,7 \mu\text{V}$  ( $N = 11$ ) en las RDs de 8 semanas (Figura 22). Estos resultados sugieren que a las 8 semanas de diabetes y no a las 4 la transmisión sináptica en SI se encuentra alterada.

### **A.4.2. Análisis por Western Blot**

Con el objetivo de profundizar en esta observación realizamos un análisis por Western blot de los niveles de proteínas relacionadas con la transmisión sináptica. Comenzamos analizando proteínas relacionadas con los dos principales neurotransmisores del SNC el GABA y el glutamato. Para estudiar la transmisión GABAérgica medimos los niveles de GAD6 la enzima responsable de la síntesis de GABA y normalmente utilizada como marcador del contenido de GABA en el SNC. Los niveles de GAD6 no se vieron modificados en las ratas RDs de 4 u 8 semanas (Figura 23 A).

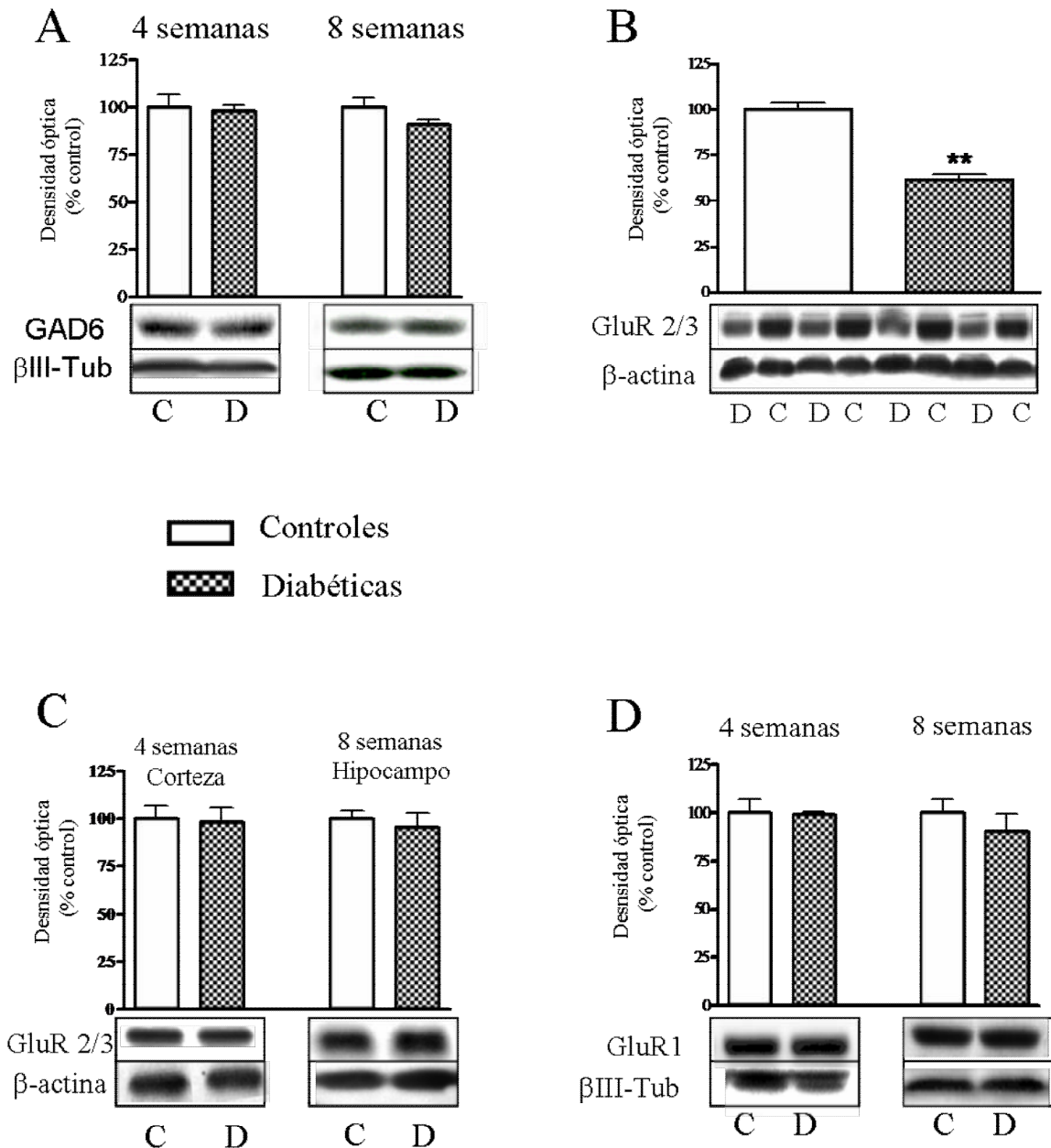
En el siguiente paso estudiamos la transmisión glutamatérgica analizando niveles de las subunidades GluR2 GluR3 del receptor de AMPA. Los niveles de GluR2/3 a las 4 semanas de diabetes fueron equivalentes a los controles (Figura 23 C), por el contrario las RDs de 8 semanas presentaron una marcada disminución en el contenido de GluR 2/3. Esta reducción no se detectó en los hipocampos del mismo grupo de ratas indicando que es específica de SI (Figura 23 C). Además los niveles de la subunidad GluR1 del receptor de AMPA en SI fueron equivalentes a los de los controles (Figura 23 D).

A continuación estudiamos los niveles de marcadores presinápticos; analizamos niveles de sinaptofisina y dinamina, ambas localizadas exclusivamente en las terminales presinápticas donde forman parte del aparato de exocitosis de vesículas sinápticas. Los niveles de sinaptofisina fueron normales en RDs de 4 y 8 semanas. De la misma forma los niveles de dinamina en RDs de 8 semanas también fueron normales (Figura 24 A, B) sugiriendo que la maquinaria presináptica no se encuentra alterada.



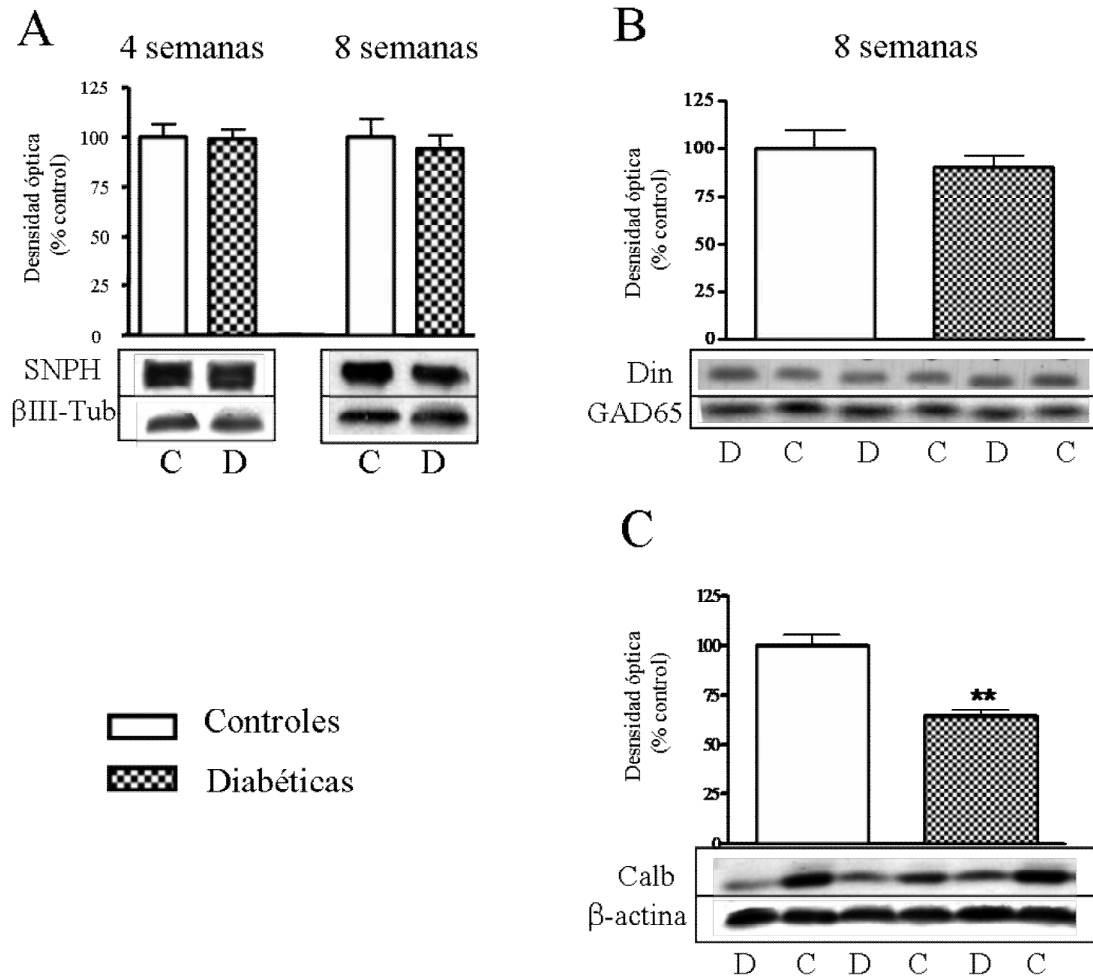
**Figura 22. Reducción en la amplitud de los potenciales nervio-corteza.**

La amplitud de los potenciales nervio-corteza de las RDs de 4 semanas fue similar a la de los controles mientras que a las 8 semanas de diabetes se observó una marcada reducción su amplitud. Los trazos son el promedio de 100 potenciales evocados en RDs de 8 semanas (línea roja) y en controles (línea negra).



**Figura 21. Análisis bioquímico de SI en ratas diabéticas.**

**A.** Los niveles de la enzima responsable de la síntesis de GABA, GAD6, no se encuentran alterados en la corteza de las RDs de 4 y 8 semanas. **B.** En la SI de las RDs de 8 semanas existe una reducción del 40 % de los niveles de las subunidades GluR2/3 del receptor de AMPA. **C** La reducción de GluR2/3 en la corteza de las RDs de 8 semanas es específica ya que los niveles de estas proteínas en corteza de RDs de 4 semanas y en hipocampo de RDs de 8 semanas son normales. **D.** El contenido de la subunidad del receptor de AMPA GluR1 en las cortezas de las RDs de 4 y 8 semanas es normal indicando que las alteraciones se limitan a las subunidades GluR2/3.



**Figura 24. Análisis bioquímico de SI en ratas diabéticas.**

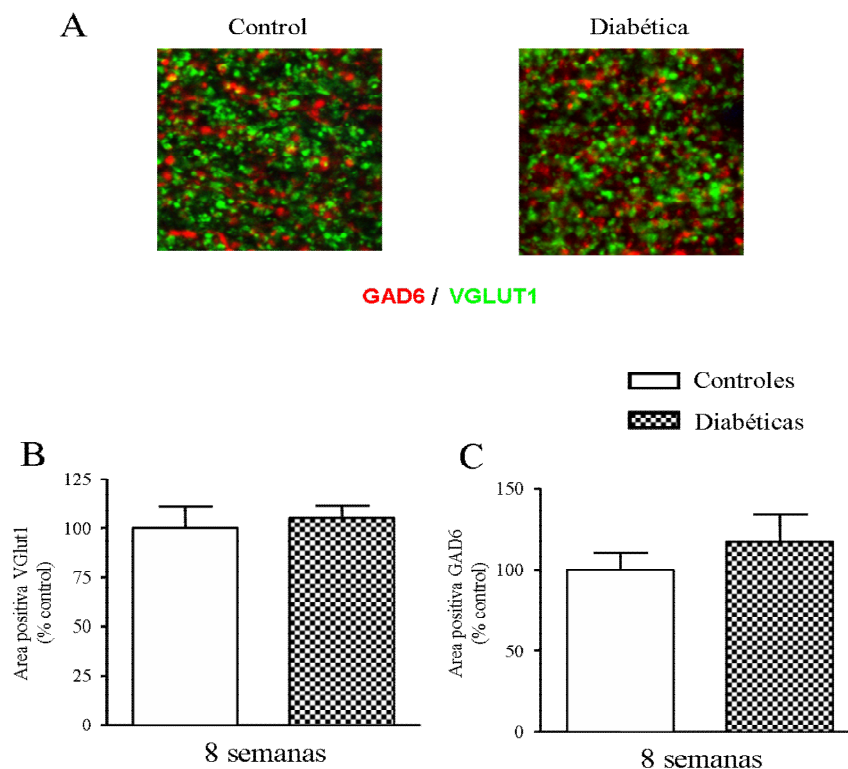
A. El contenido del marcador presináptico sinaptofisina no se encuentra modificado en RDs de 4 y 8 semanas. B. De manera similar la cantidad de dinamina, en la SI de las RDs de 8 semanas es normal. C. Los niveles de la proteína tampón de calcio calbindina se encuentran reducidos en un 36% en la SI de las RDs de 8 semanas.

La subunidad GluR2 hace al receptor de AMPA impermeable al calcio (Pellegrini-Giampietro et al., 1997) por lo tanto un descenso en sus niveles puede indicar un desarreglo en la homeostasis del calcio. Para investigar esta posibilidad medimos niveles de calbindina una proteína tampón de calcio intracelular. Los niveles de calbindina en SI de las RDs de 8 semanas se encuentran disminuidos sugiriendo que existe un desarreglo en la homeostasis del calcio.

#### A.4.3. Análisis de sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas en SI

El análisis bioquímico indica que existe una disminución de GluR2/3 en SI en las RDs de 8 semanas que se ven acompañada por niveles normales de proteínas presinápticas como la dinamina y la sinaptofisina. Estos resultados apuntan a que la reducción en la amplitud de los potenciales nervio-corteza en las RDs de 8 semanas es

consecuencia de la cantidad de receptores AMPA postsinápticos. Para explorar en mayor profundidad esta posibilidad realizamos un análisis morfométrico de botones sinápticos glutamatergicos y GABAérgicos en SI midiendo el área ocupada por perfiles positivos para GAD6 o para el transportador vesicular de glutamato de tipo 1 (VGlut1) por inmunofluorescencia. El recuento de los perfiles positivos mostró que no existen diferencias entre los controles y las RDs de 8 semanas (Figura 25) apoyando la hipótesis que la reducción de las amplitudes de los potenciales evocados es producto de alteraciones postsinápticas.



**Figura 25. Análisis morfométrico del número de sinapsis en SI de ratas diabéticas.**

**A** Fotografías representativas del marcaje para VGlut1 (sinapsis glutamatérgicas, en verde) y GAD6 (sinapsis GABAérgicas en rojo) en ratas controles y diabéticas. Se muestran botones sinápticos positivos de capa IV de SI. El análisis contabiliza el porcentaje del área ocupada por señal positiva para los dos marcadores. **B.** Resultados del recuento del área cubierta por botones positivos para VGlut1 y GAD6, no se observaron diferencias entre los controles y las RDs de 8 semanas sugiriendo que no existen alteraciones en la cantidad de botones sinápticos en SI.

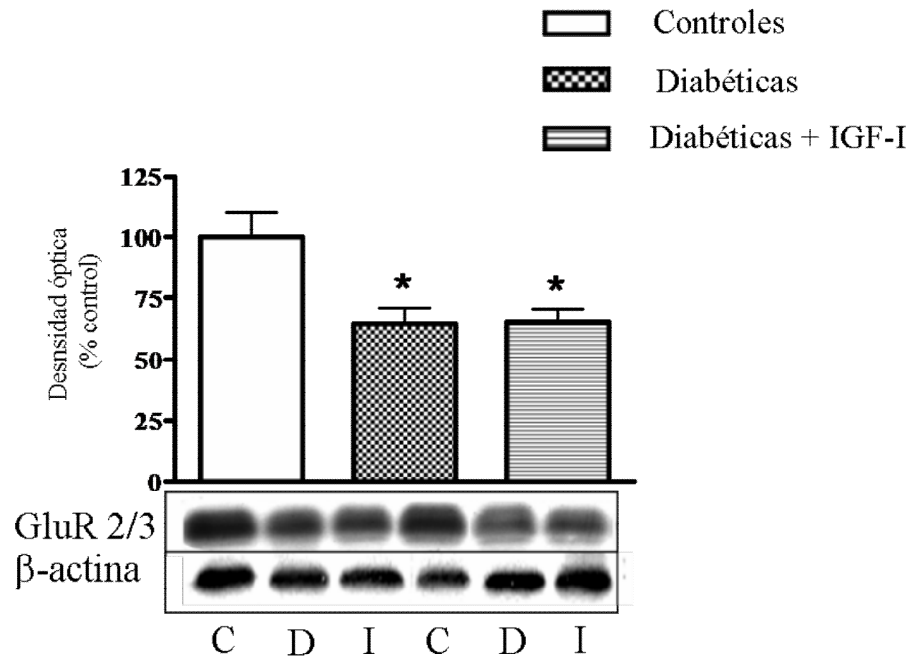
## **B. Efecto del tratamiento de la neuropatía diabética con IGF-1**

Los resultados descritos hasta aquí indican que las alteraciones del sistema somatosensorial periférico y central asociadas a la diabetes siguen un curso temporal diferente. Mientras que las alteraciones periféricas representadas por la disminución en la VCNM y el retraso al potencial nervio-gracilis aparecen a las 4 semanas de diabetes, las alteraciones centrales, caracterizadas por la disminución de la amplitud del potencial

nervio-corteza y la alteración en los niveles de receptores de glutamato en SI, aparecen a las 8 semanas de diabetes. A continuación estudiamos el efecto del tratamiento con IGF-1 en el desarrollo de las alteraciones centrales y periféricas asociadas a la diabetes. Para ello se realizamos un tratamiento de 4 semanas de duración entre las 4 y las 8 semanas de diabetes por medio de bombas osmóticas sub-cutáneas. Las bombas sub-cutáneas producen un flujo constante de 0.25  $\mu$ l/hora la concentración de IGF-1 la ajustamos para lograr una dosis de 50  $\mu$ g/kg.día.

El tratamiento con IGF-1 revirtió la disminución en la VCNM y el aumento de la latencia de los potenciales nervio-gracilis. Por su parte las latencias de los potenciales nervio-corteza y NCP-corteza, que no se encontraban afectados en las RDs de 8 semanas, no fueron modificadas por el tratamiento con IGF-1, al igual que el número de perfiles positivos para GAD6 y VGlut-1. La administración de IGF-1 no previno la disminución en la amplitud del potencial nervio-corteza ni la disminución del contenido de GluR2/3 en SI (Figura 26). Finalmente ninguno el tratamiento con IGF-1 revirtió la hiposensibilidad térmica de las RDs. Estos resultados en conjunto indican que el IGF-1 mejora las alteraciones somatosensoriales asociadas a la diabetes actuando en el sistema nervioso periférico. Por otra parte indican que las alteraciones centrales y periféricas una vez iniciadas son independientes entre si. Los resultados del tratamiento con IGF-1 se hallan resumidos en la Tabla 7 y en la figura 26.





**Figura 24. Efecto del tratamiento con IGF-1 en la depleción de GluR2/3 en SI.**

El gráfico ilustra los niveles de GluR 2/3 en SI de RDs de 8 semanas y RDs de 8 semanas tratadas con IGF-1. El tratamiento con IGF-1 no previno las disminuciones en los niveles de GluR 2/3 (64 % en RDs N = 5, 65 % en RDs + IGF-1, N = 6). C, D e I en la figura significan controles, RDs 8 semanas y RDs de 8 semanas tratadas con IGF-1 respectivamente.

**Tabla 7. Efectos del IGF-1 en las alteraciones somatosensoriales centrales y periféricas**

Grupo	Control	Diabéticas 8 semanas	Diabéticas 8 semanas + IGF-1	p	Efecto
VCNM	100 ± 5,74 (11)	66 ± 4,15 (10)	95,15 ± 6,64 (12)	<0,001	recuperación
Nervio-Gracilis latencia	100 ± 4,17 (9)	138 ± 10,74 (11)	106,50 ± 9,52 (9)	<0,05±	recuperación
Sensibilidad térmica	100 ± 2,92 (56)	149,5 ± 9,78 (22)	96,75 ± 10,55 (10)	<0,01	recuperación
Nervio-Corteza amplitud	100 ± 8,73 (10)	65,74 ± 6,99 (11)	72,89 ± 5,16 (10)	0,41	sin efecto

Los valores son expresados como media normalizadas ± SEM. Los datos de los controles y las diabéticas de 8 semanas son tomados de las otras figuras; p: significancia estadística entre los grupos "diabéticas 8 semanas" y "diabéticas 8 semanas + IGF-1".



DISCUSIÓN

---



Las acciones del IGF-1 circulante en sangre sobre el SNC fueron caracterizadas hace más de dos décadas cuando fue identificado como el responsable de inhibir la liberación de hormona de crecimiento actuando sobre las neuronas hipotalámicas somatostatinérgicas (Berelowitz et al., 1981). Actualmente las evidencias sobre los efectos del IGF-1 en el cerebro han ido aumentando permitiendo que sea reconocido como un potente factor neurotrófico con acciones pleiotrópicas en el SNC (Aberg et al., 2006; Carro y Torres-Aleman, 2006). No obstante las diferencias existentes entre las acciones del IGF-1 sintetizado dentro del SNC y el IGF-1 circulante en sangre no han sido comprendidas. En el presente trabajo hemos estudiado la fisiología del IGF-1 centrándonos en los efectos del IGF-1 circulante en sangre sobre el sistema nervioso.

Nuestros resultados indican que la carencia de IGF-1 sérico en los ratones LID altera la plasticidad sináptica en el giro dentado del hipocampo debido a un desarreglo de la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria sobre las neuronas granulares. Estas alteraciones son acompañadas de niveles normales de IGF-1 en el hipocampo. Para explicar estas observaciones planteamos un modelo en el cual la entrada de IGF-1 de la sangre al SNC se encuentra acoplada a incrementos localizados de la actividad neuronal. Este modelo parece cumplirse en protocolos de estimulación eléctrica de vías aferentes al cerebelo y a la corteza somatosensorial de barriles.

En la segunda parte estudiamos los posibles efectos terapéuticos del tratamiento con IGF-1 en la neuropatía diabética central y periférica. En esta patología los niveles de IGF-1 disminuyen por lo que puede provocar una alteración funcional en el Sistema Nervioso Central. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con IGF-1 solo revierte las alteraciones periféricas y no las centrales, revirtiendo las alteraciones en la percepción térmica. Además, los datos obtenidos sugirieron que las alteraciones centrales y periféricas una vez desarrolladas son independientes entre si.

En resumen, la primera parte de este trabajo demuestra que el IGF-1 circulante en sangre es un modulador de la fisiología del sistema nervioso, aportando además un mecanismo por el cual una neuro-hormona circulante en sangre puede tener efectos localizados tanto espacial como temporalmente. En tanto que la segunda parte aporta información sobre el desarrollo de la neuropatía diabética e indica que la administración de IGF-1 puede ser beneficiosa para el tratamiento de este síndrome.

## PARTE I

### **A. Plasticidad sináptica en ratones carentes de IGF-1 hepático**

El descubrimiento del IGF-1 se produjo en el marco de la descripción de los mecanismos por los cuales la adenohipófisis controlaba el crecimiento corporal. Su caracterización condujo a la postulación de la hipótesis de las somatomedinas (Daughaday et al., 1972). Esta hipótesis sostenía que la hormona de crecimiento (GH) liberada por la adenohipófisis inducía la producción y liberación de IGF-1 por el hígado siendo este el responsable del crecimiento de músculos, huesos y demás órganos. Posteriormente la caracterización de la síntesis local de IGF-1 en prácticamente todos los órganos (Roberts et al., 1987) amplió la hipótesis de las somatomedinas original incluyendo la posibilidad adicional que el IGF-1 fuese sintetizado localmente en respuesta a hormona de crecimiento y actuase parácrina o autócrinamente.

La creación de los ratones LID (Yakar et al., 1999) fue un hito crucial en el debate acerca del IGF-1 endócrino vs el autócrino/parácrino. Los ratones LID presentaban niveles indetectables de RNA mensajero de *igf-1* en hígado mientras que en el resto de los órganos la síntesis de IGF-1 era normal. En consecuencia los ratones LID presentaban una reducción del 60-75 % de los niveles circulantes de IGF-1 y un incremento de 4 veces en los niveles de GH. A pesar de los niveles bajos de IGF-1 en sangre el crecimiento y el tamaño corporal de los ratones LID era normal. Así Yakar et al. (1999) demostraron en un solo experimento que la mayor parte del IGF-1 circulante provenía del hígado y que el crecimiento corporal no dependía de la presencia de niveles normales de IGF-1 plasmático. Posteriormente, los experimentos realizados en los ratones LID demostraron que a pesar de tener un crecimiento y tamaño corporal normal, los ratones LID poseían múltiples alteraciones como hiperinsulinemia, insensibilidad a insulina en músculo (Yakar et al., 2001), y alteraciones en la hematopoyesis (Welniak et al., 2004). Además, los trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que los ratones LID poseen alteraciones en la fisiología cerebral como amiloidosis prematura (Carro et al., 2002) y disminución en la angiogenesis en respuesta a ejercicio (Lopez-Lopez et al., 2004).

Nuestros resultados amplían las observaciones realizadas en los ratones LID demostrando que poseen deficiencias en la LTP del giro dentado del hipocampo. La falta de LTP de los ratones LID se ve acompañada por deterioro en el aprendizaje asociativo espacial, atrofia del giro dentado y disminución de la cantidad de botones sinápticos glutamatérgicos pero no de los botones sinápticos GABAérgicos (Trejo et al., 2007 en prensa). Estas alteraciones parecen estar limitadas al giro dentado del hipocampo ya que la LTP en la corteza SI y en la región CA1 del hipocampo es normal. Este efecto región-específico podría ser consecuencia de los efectos diferenciales del IGF-1 en la modulación de la excitabilidad neuronal en las distintas zonas cerebrales. El IGF-1 modula las propiedades electrofisiológicas de las neuronas de manera diferente dependiendo la región cerebral estudiada. Así el IGF-1 incrementa de manera aguda las corrientes de calcio de tipo “L” y no las de tipo “N” en neuronas granulares del cerebelo y piramidales del hipocampo (Bence-Hanulec et al., 2000) mientras que solamente modula las corrientes de calcio tipo “N” en la corteza motora (Shan et al., 2003); disminuye la excitabilidad de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (Hawkes et al., 2006) e incrementa la excitabilidad en los núcleos del cordón posterior por el bloqueo de corrientes de potasio (Nuñez et al., 2003); también en los núcleos del cordón posterior incrementa la amplitud de los potenciales sinápticos glutamatérgicos mientras que en el cerebelo tiene el efecto contrario (Wang y Linden, 2000).

Nuestros resultados apuntan a que la deficiencia en la LTP de los ratones LID se relaciona con efectos tróficos del IGF-1 y no con sus efectos agudos como modulador de la excitabilidad neuronal. Primeramente en las rodajas de hipocampo la falta de LTP se observa en un ambiente libre del IGF-1 de la sangre tanto para las rodajas control como para las de los animales LID; en segundo lugar, si se agrega IGF-1 a la solución de registro la amplitud de los potenciales sinápticos no se modifica. Por otra parte, la facilitación por pulsos pareados de los ratones LIDs no se encuentra alterada. En cambio, el número de botones sinápticos glutamatérgicos se encuentra reducido y se revierte, al igual que la falta de LTP, por el tratamiento crónico con IGF-1 (Trejo et al., 2007 en prensa), sugiriendo que la cantidad de terminales presinápticas se encuentra alterada pero no así su funcionamiento. Todos estos resultados son compatibles con un modelo en el que la falta de LTP se origina por una alteración en la relación entre la entrada excitatoria e inhibitoria al giro dentado, por la falta crónica de IGF-1 circulante.

Es importante notar que el bloqueo de la transmisión GABAérgica revierte la falta de LTP en las rodajas de los ratones LID, indicando que estas poseen la capacidad de desarrollar LTP en el giro dentado del hipocampo. Por otra parte bloquear la transmisión inhibitoria después de la estimulación tetánica no modificó la pendiente del potencial sináptico (Figura 5), la falta de un efecto retrogrado de los bloqueantes GABAérgicos descarta la existencia de una “LTP inhibitoria” enmascarando la LTP de las sinapsis excitatorias. La información poblacional brindada por el registro de potenciales sinápticos de campo no descarta que en condiciones basales, existan sinapsis que desarrollen LTP y que no son detectadas por ser una minoría. Continuar estos estudios combinando registros intracelulares con registros poblacionales podría aclarar esta posibilidad y al mismo tiempo dar información más concreta sobre la cantidad de sinapsis glutamatérgicas de las neuronas granulares de los ratones LID por medio de la medición de la frecuencia de potenciales sinápticos espontáneos.

Las alteraciones observadas en la LTP de los ratones LID así como la disminución en la cantidad de botones glutamatérgicos parecen manifestarse de manera específica en el giro dentado del hipocampo, una de las pocas zonas del SNC que posee neurogenesis en la edad adulta (Gage, 2002), sugiriendo la existencia de un vínculo entre la neurogenesis y la falta de LTP en este modelo. Esta correlación se ve reforzada por la relación existente entre el IGF-1 y la neurogenesis; el tratamiento con IGF-1 induce la formación de nuevas neuronas en el giro dentado (Aberg et al., 2000) y en el bulbo olfativo (Pixley et al., 1998); además el IGF-1 circulante es responsable de la neurogenesis inducida por ejercicio físico (Trejo et al., 2001). Finalmente, se ha demostrado que los ratones LID poseen alteraciones en la supervivencia de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo (Llorens-Martín et al. no publicados).

En el giro dentado del hipocampo las nuevas neuronas se incorporan al circuito neuronal siguiendo un patrón en el cual primero se forman las sinapsis inhibitorias y posteriormente las excitatorias y este patrón no responde a la presencia de receptores en la neurona postsináptica sino su inervación por los axones aferentes (Esposito et al., 2005). Así, la combinación de la disminución de la supervivencia de las nuevas neuronas y su patrón de incorporación al circuito hipocámpal podría explicar las alteraciones en la LTP de los ratones LID. La disminución en la supervivencia de las nuevas neuronas transformaría la población de neuronas granulares del giro dentado



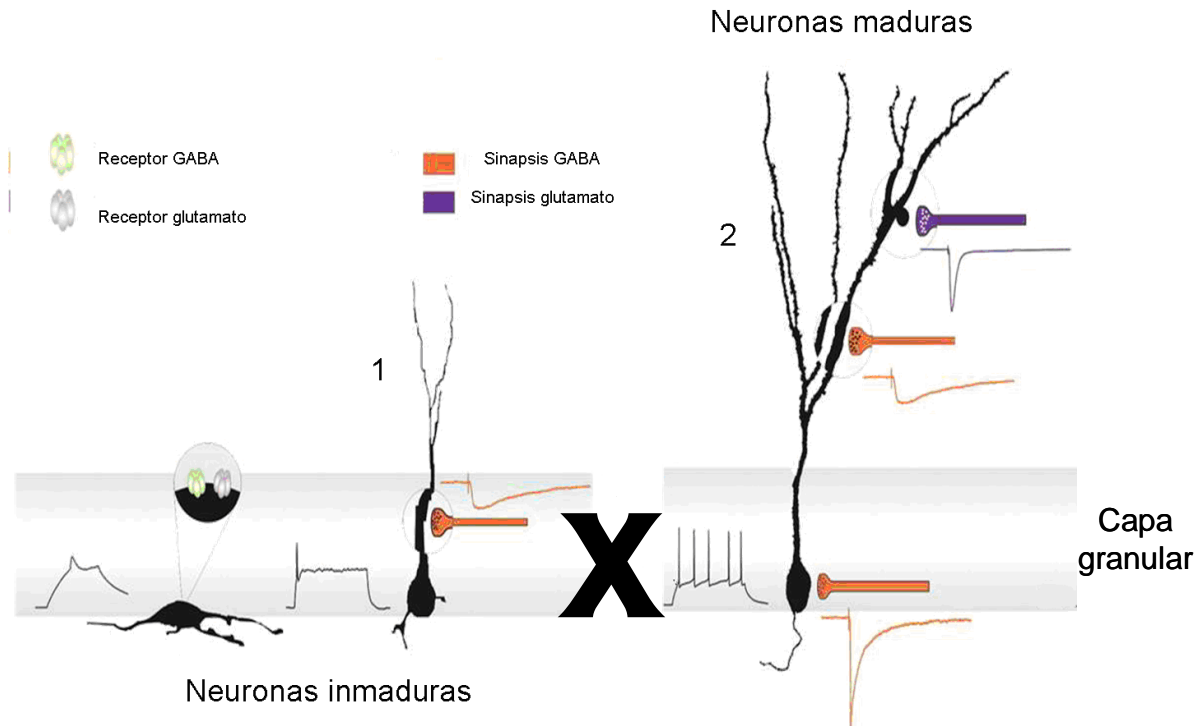
disminuyendo la proporción de neuronas totalmente maduras que poseen inervación tanto inhibitoria como excitatoria a favor de la población de neuronas inmaduras que no han formado contactos excitatorios (Figura 27). Nuevamente esta hipótesis predice que si se estudiaran individualmente las neuronas granulares por medio de registros intracelulares una proporción de ellas presentaría LTP.

Alternativamente la disminución en el número de sinapsis glutamatergicas podría ser consecuencia de los efectos del IGF-1 como factor trófico necesario para el mantenimiento de las sinapsis. Esta acción del IGF-1 ha sido demostrada durante el desarrollo en la corteza SI (Gutierrez-Ospina et al., 1996; Niblock et al., 2000) cerebelo (Fukudome et al., 2003), núcleo hipogloso e hipocampo (O'Kusky et al., 2000) y durante la madurez en CA3 (Poe et al., 2001) y unión neuromuscular (Payne et al., 2006). Sin embargo los datos publicados sobre el efecto sinaptogénico del IGF-1 en el giro dentado indican que es consecuencia de su efecto como inductor de la neurogenesis ya que la sobre-expresión de IGF-1 en el cerebro produce un incremento en el número de sinapsis y de neuronas en el giro dentado pero la relación entre el número de sinapsis y el de neuronas es normal (O'Kusky et al., 2000) indicando que el incremento en el número de sinapsis es atribuible al mayor número de neuronas. Esta observación también se cumple en los ratones LIDs, donde la relación entre el número de neuronas granulares y el número de sinapsis en los ratones LIDs es normal (Trejo et al., 2007 en prensa).

Las alteraciones cognitivas y de la plasticidad sináptica observadas en los ratones LID coinciden con los trabajos publicados relacionando el IGF-1 con el aprendizaje hipocampal. El bloqueo del receptor de IGF-1 en el plexo coroideo es suficiente para inducir un déficit cognitivo (Carro et al., 2005) y la administración de IGF-1 revierte las deficiencias en el aprendizaje producidas por la diabetes (Lupien et al., 2003) y el envejecimiento (Aleman et al., 1999). Asimismo el IGF-1 revierte las alteraciones en la plasticidad sináptica a corto plazo asociada al envejecimiento (Ramsey et al., 2004) y es responsable de la mejora cognitiva inducida por el ejercicio físico (Ding et al., 2006)

Es de destacar que mientras que los niveles de IGF-1 de los ratones LID son bajos, los de GH se encuentran elevados (Yakar et al., 1999). Existen numerosos

trabajos relacionando positivamente los niveles de GH con funciones cognitivas y plasticidad sináptica (Drago et al., 1996; Mahmoud y Grover, 2006; Schneider-Rivas et al., 1995) parte de estos efectos podrían ser atribuibles a los cambios en los niveles de IGF-1 inducidos por la GH ya que en el modelo de ratones LID, en el que la relación entre los niveles de las dos hormonas se haya interrumpida, el aprendizaje y la plasticidad sináptica se encuentran relacionados con los niveles de IGF-1 y no de GH



**Figura 27:** relación hipotética entre las alteraciones en la neurogenesis en los ratones LID y sus alteraciones en la plasticidad sináptica. “1”. Las nuevas neuronas formadas en el giro dentado del hipocampo antes de alcanzar su madurez forman sinapsis inhibitorias. “2” La formación de sinapsis excitatorias se da únicamente al alcanzar la madurez. Los ratones LID poseen una disminución en la supervivencia de las nuevas neuronas que conlleva una atrofia del giro dentado y una disminución de la cantidad de neuronas maduras. Como consecuencia de eso la relación existente entre la cantidad de contactos excitatorios e inhibitorios en el circuito del giro dentado se ve alterada resultando en deficiencias en la LTP (Esposito et al., 2005).

. Por lo tanto nuestros resultados demuestran que la reducción en los niveles circulantes de IGF-1 en los ratones LID trae aparejada alteraciones de la plasticidad sináptica específicamente en el giro dentado que probablemente se relacionen con alteraciones en la neurogenesis y el aprendizaje.

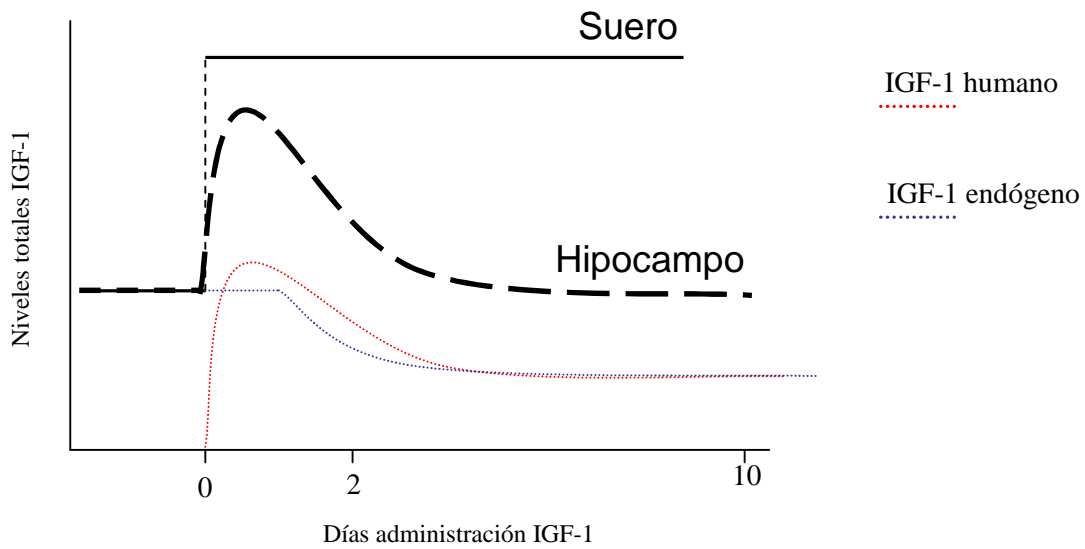
### **B. Captación de IGF-1 acoplada a la actividad eléctrica**

Las alteraciones en el hipocampo observadas en los ratones LID se ven acompañadas por niveles normales de IGF-1 en el hipocampo tanto de proteína como

RNA mensajero, indicando que la síntesis local y el contenido total de IGF-1 en el hipocampo son normales. Si los niveles de IGF-1 en el hipocampo dependiesen exclusivamente de la síntesis local estas observaciones serían totalmente esperables. Sin embargo aunque indirectos varios resultados indican que el IGF-1 proveniente de la sangre realiza un aporte significativo al IGF-1 total del cerebro, contradiciendo esa explicación: el ejercicio físico incrementa los niveles cerebrales de IGF-1 (Carro et al., 2000), y este incremento es dependiente de la entrada de IGF-1 desde la sangre ya que es bloqueado por la administración de un anticuerpo contra IGF-1 (Trejo et al., 2001); asimismo el bloqueo de la entrada de IGF-1 a través del plexo coroideo reducen los niveles de IGF-1 en LCR (Carro et al., 2005). Además, un trabajo reciente ha demostrado que en el modelo de ratón enano “Ames”, que posee niveles reducidos de GH e IGF-1, los niveles de IGF-1 en el hipocampo no sólo no se encuentran reducidos sino que se encuentran incrementados y, al igual que en los ratones LID, la síntesis local de IGF-1 es normal (Sun et al., 2005). De la misma forma, nuestros resultados también sugieren que el IGF-1 de la sangre realiza un aporte principal al IGF-1 total del hipocampo ya que observamos que después de 48 horas o 10 días de administración de IGF-1 humano, este es detectable en el hipocampo indicando que el IGF-1 proveniente de la sangre se encuentra normalmente en el cerebro.

En este contexto en el que el IGF-1 circulante realiza un aporte significativo al IGF-1 total del cerebro, los niveles normales de IGF-1 en el hipocampo de los ratones LIDs pueden ser interpretados como la consecuencia de una mayor captación de IGF-1 desde la sangre. Para poner a prueba esta explicación, especulamos que si un descenso en los niveles circulantes de IGF-1 produce un incremento en la captación de IGF-1, la situación opuesta, un incremento en los niveles circulantes podría conducir a un descenso de la entrada de IGF-1 al cerebro. Nuestros resultados apoyan esta última hipótesis ya que la cantidad de IGF-1 humano en el hipocampo disminuye entre las 48 horas y los 10 días de tratamiento, mientras que los niveles en suero se mantienen constantes. Acompañando la caída en los niveles de IGF-1 humano, los niveles de IGF-1 endógeno en el hipocampo también disminuyen como cabría esperar si la entrada de IGF-1 desde la sangre se redujese. Actualmente no poseemos un ensayo para poder estimar los niveles totales de IGF-1 (endógeno + exógeno) y la comparación de los valores absolutos de los ensayos de ELISA de IGF-1 humano y endógeno no es válida, pero un corolario a los resultados obtenidos es que los niveles totales de IGF-1 en el

hipocampo a los 10 días de tratamiento deberían ser similares a los niveles previos al tratamiento (Figura 28).



**Figura 28:** Esquema hipotético para explicar el comportamiento de los niveles cerebrales de IGF-1 de la Figura 10. Al comienzo del tratamiento los niveles de IGF-1 de suero aumentan y posteriormente se mantienen constantes. Al aumentar los niveles de IGF-1 en suero aumentan también los niveles en el hipocampo, sin embargo entre las 48 horas y los 10 días de tratamiento volverían a los niveles normales. Este descenso sería consecuencia de una menor captación del IGF-1 de la sangre. Así al analizar los niveles de IGF-1 exógeno se observaría un descenso neto. De la misma forma al disminuir la captación de IGF-1 de la sangre se reduciría la cantidad de IGF-1 endógeno en el hipocampo ya que este también proviene de la sangre.

La reducción o el aumento en los niveles centrales de IGF-1 puede ser consecuencia de la disminución o aumento de su captación desde la sangre; alternatively podría producirse por alteraciones en la expresión o localización de las IGFBPs cerebrales. Las IGFBPs son un factor central para la disponibilidad y localización de IGF-1 y han sido postuladas como un mecanismo de modulación de los efectos del IGF-1 en el cerebro (Walter et al., 1999). En condiciones normales el IGF-1 circula en sangre unido a la IGFBP3 y la ALS, este complejo molecular incrementa su vida media (Guler et al., 1989; Pan y Kastin, 2000) y forma un reservorio constante de IGF-1 en sangre. La importancia de las IGFBPs en la modulación del IGF-1 se ve demostrada en el ratón KO de la ALS que posee una disminución de la concentración de IGF-1 en suero del 60% aunque su la síntesis de IGF-1 en hígado es normal (Ueki et al.,

2000). Por lo tanto las IGFbps son un factor crucial para determinar la localización y disponibilidad del IGF-1 (Silha y Murphy, 2002).

En condiciones normales las IGFbps más expresadas dentro del SNC de los roedores son las 2, 4 y 5. Su patrón de expresión sugiere que existen funciones específicas asociadas a cada tipo de IGFbp, ya que existen regiones específicas de fuerte expresión para cada una de ellas, el plexo coroideo para IGFbp2 el giro dentado del hipocampo para IGFbp5 y CA1 del hipocampo para IGFbp4 (Allen brain atlas 2007: <http://www.brainatlas.org/aba/>). La sobre-expresión de las IGFbps 1, 2, 5 y 6 en el cerebro retarda su desarrollo presumiblemente inhibiendo la activación del IGF-1R (D'Ercole et al., 1994; Hoeflich et al., 2001; Salih et al., 2004), la sobre-expresión de IGFbp6 conduce a alteraciones en la homeostasis energética (Bienvenu et al., 2005) y alteraciones en la expresión de IGFbp2 has sido relacionados con la etiología del trastorno bipolar (Bezchlibnyk et al., 2007) y la esclerosis múltiple (Chesik et al., 2006; Chesik et al., 2004). Por lo tanto la modulación de la expresión de IGFbps podría ser un mecanismo posible para modular los niveles centrales de IGF-1 y compensar las variaciones en los niveles circulantes.

Los niveles normales de IGF-1 en el hipocampo de los ratones LIDs indican que sus deficiencias no son atribuibles a un descenso crónico en los niveles IGF-1 en el hipocampo. Sin embargo dado que la administración crónica de IGF-1 revierte todas las alteraciones observadas en los ratones LID, los niveles bajos de IGF-1 en sangre pueden ser considerados la causa primaria de todas estas disfunciones. En consecuencia, nos encontramos frente a una situación en la cual los niveles hipocampales de IGF-1 no son un parámetro relacionado con la función hipocampal mientras que los niveles séricos si lo son. Para explicar estos resultados planteamos un modelo en el cual la entrada de IGF-1 al cerebro se modula espacial y temporalmente en función de la actividad neuronal (Figura 29).

Nuestros resultados indican que la activación de las vías aferentes al cerebelo y la corteza somatosensorial incrementan la entrada de IGF-1 específicamente en las zonas estimuladas. En corteza somatosensorial de barriles este aumento se observa cuando se estimulan las vibrisas a 2 Hz y no a 5 Hz coincidiendo con la actividad sináptica en las neuronas corticales que se deprime a frecuencias superiores a 2 Hz

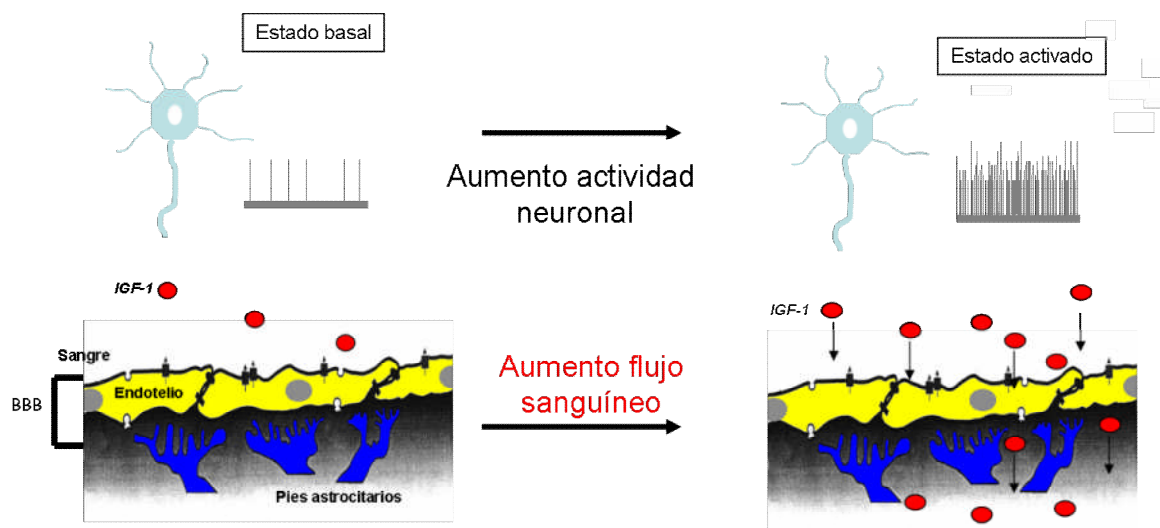
(Castro-Alamancos, 2004; Chung et al., 2002). La captación de IGF-1 observada por medio de inmunohistoquímica coincide con la somatotopía de la vía sensitiva de las vibrisas observándose en la corteza y en el núcleo tálamico VPM contralateral al sitio de estimulación. Por lo tanto nuestros resultados sugieren que el incremento en la actividad neuronal aumenta la captación de IGF-1 proveniente de la sangre.

Los trabajos realizados en el laboratorio hasta el momento han demostrado que la entrada al cerebro del IGF-1 proveniente de la sangre puede suceder a través del plexo coroideo (Carro et al., 2000; Carro et al., 2006a; Carro et al., 2006b). Sin embargo los receptores de IGF-1 están presentes en las células endoteliales y en los pies astrocíticos que los rodean (Garcia-Segura et al., 1997), sugiriendo que el IGF-1 también podría entrar al cerebro a través de endotelio como ha sido sugerido por otros estudios (Pan y Kastin, 2000; Reinhardt y Bondy, 1994). Dos evidencias en nuestros resultados sugieren que la entrada de IGF-1 acoplada a actividad neuronal podría producirse a través de esta vía. Primeramente los niveles de IGF-1 en el LCR de los animales estimulados y no estimulados en las vibrisas son similares, segundo la inyección i.c.v elimina las diferencias en la concentración de IGF-1 en la corteza de barriles entre los animales estimulados y no estimulados

Si la entrada de IGF-1 acoplada a actividad neuronal se produjese a través del endotelio de los capilares cerebrales, esta podría estar relacionada con la hiper-hemia funcional (Harder et al., 1998). Se denomina así el proceso por el cual se incrementa el flujo sanguíneo en respuesta al aumento de la actividad neuronal y que es el fundamento del las técnicas modernas de imagen cerebral como la resonancia magnética funcional (Lauritzen y Gold, 2003).

Tradicionalmente la hiper-emia funcional ha sido interpretada como una respuesta destinada aumentar la llegada de oxígeno y glucosa a través de los capilares cerebrales en respuesta al incremento en la actividad metabólica en zonas de mayor actividad neuronal. Sin embargo actualmente se encuentra establecido que aunque exista una correlación entre el aumento en el consumo de glucosa y oxígeno y el aumento de flujo sanguíneo en zonas de mayor actividad neuronal; esta correlación no implica causalidad ya que estos procesos pueden desacoplarse (Lauritzen, 2005). Por lo tanto, un posible mecanismo para explicar la entrada de IGF-1 en respuesta al

incremento de la actividad neuronal es que esta sea consecuencia del aumento del flujo sanguíneo por la hiper-emia funcional. Para poner a prueba esta hipótesis sería necesario inhibir la hiper-emia funcional, bloqueando por ejemplo la producción de óxido nítrico y evaluar si la entrada de IGF-1 acoplada a actividad eléctrica se sigue produciendo.



**Figura 29:** En el estado basal la entrada de IGF-1 a través de la barrera hematoencefálica es prácticamente indetectable. Al incrementarse la actividad neuronal se incrementa el flujo sanguíneo cerebral local y se incrementa la entrada de IGF-1 en las zonas activadas. Este incremento en la entrada puede ser consecuencia directa del aumento en el flujo sanguíneo o puede estar independiente de este, actualmente no podemos discriminar entre estas dos posibilidades. BBB, barrera hematoencefálica.

Como se ha comentado, la entrada de IGF-1 al cerebro se incrementa en respuesta al ejercicio físico (Carro et al., 2000). Sin embargo hasta el momento este es el único paradigma de aumento de la entrada de IGF-1 al cerebro del que hayamos tenido conocimiento. El ejercicio físico como paradigma posee un espectro demasiado amplio de acciones como para brindar información precisa sobre cual es la causa del incremento de la entrada de IGF-1 al cerebro. El ejercicio incrementa los niveles circulantes de IGF-1 (Hornum et al., 1997; Schwarz et al., 1996), la circulación sanguínea cerebral (Gillespie et al., 1997; Ide y Secher, 2000), la actividad neuronal en corteza e hipocampo (Nishijima y Soya, 2006; Nybo y Secher, 2004) y la concentración en sangre de múltiples hormona y metabolitos (Mastorakos y Pavlatou, 2005).

Por lo tanto existía la posibilidad de que el aumento de la captación de IGF-1 fuese una particularidad del ejercicio físico que no se observase con ningún otro

paradigma. Nuestros resultados generan una posibilidad alternativa en la que el mecanismo general de captación de IGF-1 es por el incremento de la actividad neuronal y el ejercicio físico es un caso particular de incremento en la actividad neuronal.

El papel neuroprotector del IGF-1 ha sido ampliamente estudiado (Aberg et al., 2006; Carro y Torres-Aleman, 2006; Russo et al., 2005). El descenso en los niveles cerebrales y circulantes de IGF-1 han sido relacionado con el deterioro de las funciones cognitivas asociadas al envejecimiento, particularmente los trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron una relación causal entre la alteración de la entrada de IGF-1 al cerebro y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Carro et al., 2005; Carro et al., 2006a; Carro et al., 2006b). Tanto el ejercicio físico como la actividad intelectual han sido relacionados con una menor incidencia de Alzheimer y un mejor desempeño cognitivo en la senescencia (Cotman y Berchtold, 2002; Kramer et al., 2006).

La relación existente entre el ejercicio físico y el aumento en la actividad de factores neurotróficos como el IGF-1 (Lanfranco et al., 2003; Trejo et al., 2002), el BDNF (Gomez-Pinilla et al., 2002) y el bFGF2 (Kleim et al., 2003), ya ha sido planteada como una posible explicación de sus efectos beneficiosos. El mecanismo de captación de IGF-1 acoplado a actividad neuronal sugiere que la relación entre la actividad intelectual y la prevención de alteraciones neurológicas asociadas a la vejez (Churchill et al., 2002) también podría estar relacionada con la entrada de factores tróficos circulantes. Esta especulación aunque arriesgada dada la gran cantidad de factores culturales relacionados con la salud que acompañan la “actividad intelectual” es plausible de ser puesta a prueba en modelos animales. Recientemente se ha publicado un trabajo relacionando estos dos aspectos; en él se reporta que la mejora en la recuperación de la lesión medular asociada al enriquecimiento ambiental en ratas, es dependiente de IGF-1 (Koopmans et al., 2006). Dado que el enriquecimiento ambiental tras la lesión medular no incluye un componente de ejercicio físico este hallazgo podría estar relacionado con el incremento en la actividad “neural” asociada al protocolo (Koopmans et al., 2006).

Los efectos del IGF-1 circulante en sangre sobre el sistema nervioso coinciden con el modelo de transmisión volumétrica postulado en la década de los 80 (Agnati y



Fuxe, 1990; Agnati et al., 1986). Este modelo postula que sumado a la transmisión sináptica tradicional, existe mecanismos de transmisión de la información asociados a la difusión espacial de moléculas en distancias mayores que el espacio sináptico; los elementos básicos para que se produzca la transmisión volumétrica son:

- Una fuente de la señal que vaya a transmitir volumétricamente que la libere en el espacio extracelular o en el torrente sanguíneo o en el espacio linfático.
- Un espacio de difusión de la molécula señalizadora que sea mayor que la brecha sináptica.
- Un canal de transmisión que intervenga en la difusión de la molécula señalizadora.
- Una célula o grupo celular que actúen como receptores de la molécula señalizadora y sean afectados por esta.

La transmisión de la mayoría de los neuromoduladores liberados por terminales nerviosas en el SNC como la dopamina (Fuxe et al., 2006; Pickel et al., 2002), la serotonina ((Hentall et al., 2006; Zhou et al., 1998) la acetilcolina (Crespo et al., 2006; Descarries et al., 1997), los opioides (Elde et al., 1995; Fuxe et al., 2005), o la noradrenalina (Antonopoulos et al., 2004), cumplen los requisitos para que su transmisión pueda ser considerada volumétrica ya que el sitio de liberación no se encuentra en yuxtaposición con sus receptores. Asimismo factores circulantes en sangre entran al SNC y se transmiten de manera volumétrica, hormonas como la prolactina (Kruger et al., 2006), la leptina (Zlokovic et al., 2000), los estrógenos; por su parte moléculas pro-inflamatorias como la IL-1 (Konsman et al., 2000; Vitkovic et al., 2000) entran al SNC a través del plexo coroideo y activan áreas cerebrales distantes de manera volumétrica. Incluso sin los resultados presentados aquí, el IGF-1 cumpliría los requisitos como para ser considerado una molécula que actúa de manera volumétrica ya que se libera al torrente sanguíneo; entra al SNC a través del canal del plexo coroideo de manera dependiente de su receptor y de megalina (Carro et al., 2005) y activa su receptor en neuronas de múltiples áreas cerebrales (Carro et al., 2000), No obstante la captación acoplada a actividad neuronal, da una especificidad espacial y temporal a la entrada de IGF-1 y esto brinda un contexto más general para explicar bajo que circunstancias el IGF-1 ejercería la gran cantidad de efectos que se le han atribuido.

La relación entre la actividad neuronal y la modulación del IGF-1 ha sido muy poco estudiada. Pero estudios realizados en nuestro laboratorio administrando IGF-1 *in vivo*, demostraron que este inducía un incremento en la actividad neuronal en cerebelo (Carro et al., 2000) y en los núcleos del cordón posterior, (Nuñez et al., 2003) donde incrementaba el campo receptivo de las neuronas por medio del bloqueo de corrientes de potasio de tipo “A”. También, trabajos anteriores (Castro-Alamancos y Torres-Aleman, 1993) demostraron que la estimulación eléctrica del núcleo del tronco cerebral de la oliva inferior inducía la liberación de IGF-1 en el cerebelo y que este IGF-1 inhibía la liberación de GABA inducida por la administración de glutamato en la corteza cerebelosa sugiriendo que el IGF-1 podría inducir LTD en el cerebelo. Trabajos sucesivos demostraron que el IGF-1 sintetizado en la oliva inferior era necesario para la adquisición de un aprendizaje asociativo dependiente del cerebelo (Castro-Alamancos y Torres-Aleman, 1994) y confirmaron que el IGF-1 inducía LTD en cerebelo (Wang y Linden, 2000). Simultáneamente se demostró el IGF-1 inyectado en la oliva inferior era captado por las neuronas de la oliva, transportado anterógradamente y liberado en la corteza cerebelosa (Nieto-Bona et al., 1993), dejando abierta la posibilidad de que el IGF-1 proveniente de las neuronas de la oliva inferior y liberado en la corteza cerebelosa sea tanto sintetizado por ellas como captado, probablemente del torrente sanguíneo. Otros trabajos relacionando la actividad neuronal con el sistema del IGF-1 han demostrado que la expresión de IGFBP2 se induce en la corteza visual por la “experiencia visual” (Tagawa et al., 2005) o por la despolarización en la corteza somatosensorial, por un mecanismo dependiente de receptores de NMDA (Holmin et al., 2001). Asimismo la estimulación eléctrica de los nervios periféricos induce la activación de la diana canónica de la vía de señalización del IGF-1, la proteína quinasa akt, en el núcleo de la raíz dorsal (Pezet et al., 2005).

Por lo tanto aunque poco desarrolladas, existen múltiples evidencias indicando la relación entre el sistema de IGF-1 y la actividad neuronal, experimentos futuros aportarán información sobre la trascendencia de la entrada de IGF-1 acoplada a actividad neuronal de la acción del IGF-1 circulante en el SNC.

## PARTE II

### **A. Análisis de la neuropatía diabética central y periférica**

Tradicionalmente la neuropatía diabética ha sido catalogada como un síndrome del sistema nervioso periférico (Greene et al., 1992; Said, 1983; Sima y Sugimoto, 1999; Sugimoto et al., 2000). No obstante en tiempos recientes las alteraciones en el SNC que acompañan a la diabetes, englobadas bajo el término de encefalopatía diabética (Gispén y Biessels, 2000; Sima, 2004) han sido estudiadas en mayor profundidad (Biessels y Gispén, 2005; Gispén y Biessels, 2000; Trudeau et al., 2004; Tun et al., 1990) aunque su origen no se ha entendido bien (Biessels y Gispén, 2005). La mayor parte de estos trabajos se han centrado en la caracterización de las alteraciones cognitivas y de la memoria asociadas a la diabetes (Biessels et al., 2002), dejando a un lado el estudio de las alteraciones del funcionamiento del sistema somatosensorial dentro del SNC (Chen y Pan, 2002; Emerick et al., 2005). Nuestro trabajo se centró en el estudio de las alteraciones del sistema somatosensorial central y periférico en etapas tempranas de la diabetes y el efecto del tratamiento con IGF-1 sobre ellas.

Los resultados presentados en este estudio demuestran la existencia de múltiples alteraciones en el sistema somatosensorial central en etapas tempranas de la diabetes. Estos cambios aparecen simultáneamente con las deficiencias en el sistema somatosensorial periférico. Los cambios en el sistema somatosensorial durante las primeras 4 semanas de diabetes se caracterizaron como: hiposensibilidad térmica, reducción en la VCNM e incremento en las latencias de los potenciales evocados nervio-gracilis, nervio-corteza y DCN-corteza. Entre las 4 y las 8 semanas de diabetes la reducción en la VCNM se mantuvo estable al tiempo que las latencias de los potenciales evocados del SNC vuelven a valores similares a sus controles. A las 8 semanas de diabetes encontramos una reducción de las amplitudes de los potenciales nervio-corteza acompañada de una caída en los niveles de las subunidades del receptor de AMPA GluR 2 y 3 y de la proteína tampón de calcio calbindina, sugiriendo que la transmisión sináptica y la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  podrían verse alteradas en SI durante la diabetes. El tratamiento con IGF-1 revirtió las deficiencias periféricas pero no las deficiencias centrales sugiriendo que ambas alteraciones una vez desarrolladas son independientes.

En nuestro trabajo las ratas diabéticas desarrollaron hiposensibilidad térmica a las 4 semanas de diabetes incrementándose el número de ratas “hiposensibles” a las 8 semanas. Los estudios realizados previamente estudiando la sensibilidad térmica de las ratas diabéticas reportan resultados contradictorios observándose tanto hiposensibilidad como hipersensibilidad térmica (Cameron et al., 2001; Chu et al., 1986; Fox et al., 1999). Estas discrepancias pueden ser atribuibles a los métodos utilizados para evaluar la sensibilidad térmica y la edad de inducción de la diabetes (Calcutt et al., 2004). Sin embargo, en esos trabajos tanto la hiper- como la hiposensibilidad térmica correlacionan con otros parámetros relacionados con la neuropatía periférica como la atrofia o la reducción en el flujo sanguíneo en los nervios periféricos o la reducción en la velocidad de conducción de los nervios motores o sensitivos, (Calcutt et al., 2004; Stevens et al., 2007) sugiriendo que ambos procesos pueden ser reflejo de alteraciones similares (Yasuda et al., 2003).

Se encuentra establecido que la diabetes inducida por STZ provoca reducción de la velocidad de conducción y del calibre del nervio ciático (Weis et al., 1995; Yagihashi et al., 1990). No obstante la reducción de la VCNM reportada en este modelo es variable. Nuestros resultados son similares a los reportados por múltiples estudios previos (Andriambelison et al., 2006; Li et al., 2005; Saini et al., 2004; Terata et al., 1999), pero difieren de los reportados por otros (Biessels et al., 1999; Kappelle et al., 1993; Moore et al., 1980). Las diferencias entre la reducción de la VCNM que nosotros hemos observado y la reportada por otros estudios podrían ser producto de la metodología utilizada o de la severidad de la diabetes desarrollada. Nuestro método para la evaluación de la VCNM involucra la exposición del nervio ciático, permitiéndonos tener una medida fiable de la distancia entre los dos puntos de estimulación. Sin embargo, esta metodología impide realizar mediciones en distintos estadios del desarrollo de la diabetes en el mismo animal, por lo tanto la diferencia en la metodología utilizada es una explicación probable para la discrepancia en la reducción de la VCNM observada en diferentes estudios.

En el presente trabajo hemos observado un incremento de las latencias de los potenciales evocados NCP-corteza indicando que a las 4 semanas de diabetes la transmisión en el sistema somatosensorial dentro del SNC se encuentra afectada. Posteriormente entre las 4 y las 8 semanas de diabetes las latencias de estos potenciales

evocados se normalizan. Trabajos previos estudiando la transmisión en las vías ascendentes de la medula espinal en ratas diabéticas (Biessels et al., 1999; Terada et al., 1993) demostraron que en etapas tempranas de la diabetes, la velocidad de conducción era normal. Teniendo en cuenta esos trabajos se podría especular que el incremento en la latencia del potencial evocado NCP-corteza que hemos observado podría ser producto de modificaciones sinápticas o de integración de las señales en las estaciones de relevo espinal-talámica o cortico-talámica, no obstante con la metodología utilizada no podemos concluir firmemente acerca de este punto.

A las 8 semanas de diabetes las latencias de los potenciales NCP-corteza se recuperan espontáneamente, sugiriendo la existencia de un efecto de compensación de las deficiencias periféricas. En este sentido existen estudios relacionando alteraciones en los nervios periféricos con estados de hiperexcitabilidad en el SNC (Ibuki et al., 1997; Kitagawa et al., 2005) que podrían producir una disminución de las latencias de los potenciales evocados. No obstante la interacción entre el factor diabetes y el factor edad no fue significativa, indicando que el factor edad afecta de la misma forma a los grupos de ratas controles y diabéticas e impidiendo descartar la existencia de procesos madurativos en el rango de edad estudiado (Biessels et al., 1999). Ampliar el rango de edades hasta edades mayores abarcar ayudaría a aclarar las causas de la recuperación espontánea que hemos observado.

La ratas diabéticas de 8 semanas mostraron un amplio rango de alteraciones en SI incluyendo tanto parámetros electrofisiológicos como bioquímicos. Los datos electrofisiológicos indican que la amplitud de los potenciales nervio-corteza se encuentra disminuida. Dado que los potenciales evocados representan la sumatoria espacio-temporal de las respuestas sinápticas, la reducción de su amplitud puede ser interpretada como consecuencia de alteraciones en la transmisión sináptica en la corteza SI. Para corroborar esta explicación realizamos un análisis bioquímico de proteínas asociadas a la transmisión sináptica y un análisis morfológico de la cantidad de botones sinápticos en la corteza. La densidad de botones glutamatérgicos y GABAérgicos así como los niveles de proteínas presinápticas como la sinaptofisina y la dinamina no se vieron modificadas en las ratas diabéticas de 8 semanas. En cambio observamos una reducción específica de las subunidades GluR 2/3 del receptor de AMPA que se correlacionó con la disminución en la amplitud de los potenciales evocados corticales.

La caída en los niveles de GluR 2/3 fue específica de SI de ratas diabéticas de 8 semanas ya que no se observó en ratas diabéticas de 4 semanas ni en el hipocampo de ratas diabéticas de 8 semanas. Sumando a esto el hecho de que el contenido de GluR-1 en SI no se vio modificado, indica que no se trata de una disminución extendida a todas las subunidades del receptor de AMPA. Por lo tanto la disminución en la amplitud de los potenciales evocados podría ser producto de la pérdida de receptores de AMPA postsinápticos en la corteza SI.

Los trabajos previos que han estudiado el contenido de receptores de glutamato en el CNS de ratas diabéticas (Trudeau et al., 2004; Valastro et al., 2002) reportan descensos en los niveles de GluR1 (Di Luca et al., 1999; Valastro et al., 2002) en el hipocampo y de NMDA en las cortezas SI e hipocámpal (Bean et al., 2006; Di Luca et al., 1999; Valastro et al., 2002). Concordando con nuestros resultados Valastro et al. (2002) observaron niveles normales de GluR 2/3 en el hipocampo. Por otro lado se han reportado incrementos en los niveles de GluR 2/3 en retina. Sin embargo los niveles de GluR 2/3 en SI no han sido estudiados. En conjunto los estudios publicados y nuestros resultados indican que existen modificaciones en el contenido de receptores de glutamato en animales diabéticos indicando que la transmisión glutamatérgica en el CNS está alterada por la diabetes. Concordando con esta hipótesis antagonistas de receptores AMPA y NMDA y de receptores metabotrópicos de glutamato reducen las alteraciones en la sensibilidad táctil en ratas diabéticas (Gupta et al., 2003; Malcangio y Tomlinson, 1998).

Una posibilidad alternativa a la disminución de los niveles de GluR 2/3 para explicar la reducción en la amplitud de los potenciales nervio-corteza podría ser la pérdida neuronal en SI a las 8 semanas de diabetes. Sin embargo la pérdida neuronal en ratas diabéticas solo se ha observado en etapas más avanzadas de la enfermedad (Li et al., 2005; Li et al., 2002) argumentando en contra de esta explicación.

Nuestros resultados extienden las observaciones previas sobre alteraciones de la transmisión glutamatérgica en el SNC durante la diabetes, indicando que la corteza somatosensorial y el hipocampo se ven afectados de manera diferente por la diabetes. Estas diferencias podrían ser consecuencia del proceso de alteraciones en las vías aferentes que sucede en SI como consecuencia del mal funcionamiento del nervio

periférico. Para poner a prueba esta hipótesis sería necesario estudiar si la prevención de la aparición de las alteraciones periféricas previene la caída en los niveles de GluR 2/3 en SI.

El descenso en los niveles de GluR 2/3 se vio acompañado por la disminución en los niveles de la proteína tampón de calcio calbindina. Tanto la subunidad GluR-2 del receptor AMPA como la calbindina son proteínas relacionadas con la homeostasis del calcio. La activación excesiva de los receptores ionotrópicos de glutamato produce muerte neuronal como consecuencia de la entrada de calcio a través de los receptores NMDA y AMPA permeables a calcio (Michaels y Rothman, 1990). La subunidad de GluR-2 hace al receptor de AMPA impermeable al calcio, su presencia ha sido postulada como un parámetro de resistencia a la muerte por excitotoxicidad (Pellegrini-Giampietro et al., 1997). La entrada masiva de calcio por sobreactivación de los receptores de glutamato esta relacionada con la neurodegeneración inducida por gran cantidad de insultos neurológicos, incluyendo isquemia, trauma y ataques epilepticos (Hollmann y Heinemann, 1994; Lipton y Rosenberg, 1994). Por lo tanto el descenso en los niveles de GluR 2/3 y de calbindina que hemos descrito podría ser la causa de que las ratas diabéticas posean una mayor susceptibilidad a agentes excitotoxicos, como ha sido demostrado (Kissela y Air, 2006).

## **B. Efecto del tratamiento de la neuropatía diabética con IGF-1**

La disminución en los niveles de IGF-1 ha sido postulada como una de las causas de la aparición de la neuropatía diabética (Ishii, 1995). Apoyando esta hipótesis se ha demostrado que el tratamiento con IGF-1 previene el deterioro cognitivo (Lupien et al., 2003), la atrofia de los nervios periféricos (Schmidt et al., 1999), mejora la regeneración de los nervios periféricos (Ishii y Lupien, 1995). Nuestros resultados concuerdan con estas observaciones ya que el tratamiento con IGF-1 revierte las deficiencias en la VCNM y la hiposensibilidad térmica sin modificar los niveles de glucosa en sangre. La reversión de la VCNM por el tratamiento con IGF-1 ha sido reportada previamente por Brusee et al (2004) sin embargo en su trabajo sólo han estudiado el efecto del tratamiento con IGF-1 i.c.v; hasta nuestro conocimiento esta es la primera evidencia directa de que el tratamiento sistémico con IGF-1 reestablece la VCNM en animales

diabéticos, aportando más evidencias a favor del tratamiento con IGF-1 como una terapia beneficiosa para la neuropatía diabética (Ishii, 1995).

El tratamiento con IGF-1 nos permitió analizar la relación existente entre las alteraciones periféricas, centrales y la hiposensibilidad térmica. El tratamiento con IGF-1 revierte la disminución en la VCNM y el incremento en las latencias de los potenciales nervio-gracilis, sugiriendo que recupera el funcionamiento de los nervios periféricos. Por el contrario no altera la disminución de los potenciales nervio-corteza ni la caída en los niveles de GluR 2/3 indicando que no previene la aparición de las alteraciones del SNC. El tratamiento con IGF-1 no afecta los parámetros que no se ven afectados a las 8 semanas de diabetes como las latencias de los potenciales evocados nervio-corteza y NCP-corteza o el número de botones glutamatérgicos y gabaérgicos. Finalmente el tratamiento con IGF-1 impidió la aparición de hiposensibilidad térmica en las ratas tratadas.

Las alteraciones centrales no se detectaron en las ratas diabéticas de 4 semanas, no obstante esto no implica que su aparición posterior no sea consecuencia de alteraciones presentes a las 4 semanas de diabetes. Por lo tanto, el presente estudio no responde a la pregunta de si las alteraciones centrales se desarrollan de manera independiente a las alteraciones periféricas. Para ello sería necesario prevenir la aparición de las alteraciones periféricas, por ejemplo, comenzando el tratamiento con IGF-1 inmediatamente después de la inducción de la diabetes. Aunque esa pregunta no ha sido contestada nuestros resultados indican que se pueden revertir las alteraciones periféricas sin revertir las alteraciones centrales, esto sugiere que, al menos una vez desarrolladas, son independientes entre si. No obstante un tratamiento más prolongado con IGF-1 o bien con insulina brindaría un mayor apoyo a la independencia de las alteraciones centrales y periféricas. Finalmente los resultados indican que la hiposensibilidad térmica puede ser explicada como una consecuencia de las alteraciones periféricas sin que sea necesario otro componente ya que el IGF-1 revierte ambas. Además esto implica que las alteraciones centrales no se relacionan con la hiposensibilidad térmica, aunque no descartan que estén relacionadas con alteraciones de sensibilidad táctil.

Finalmente nuestros resultados aportan información sobre el desarrollo de las alteraciones centrales en del sistema somatosensorial y como se relacionan con las



alteraciones periféricas, indicando además que el tratamiento con IGF-1 puede ser beneficiosos para el tratamiento de la neuropatía diabética.



CONCLUSIONES



1. Los ratones deficientes de IGF-1 hepático, LID, poseen deficiencias en la potenciación a largo plazo en el giro dentado del hipocampo.
2. Las deficiencias de la potenciación a largo plazo en los ratones LID se revierte tras el tratamiento crónico con IGF-1 y tras el bloqueo de la transmisión GABAérgica de manera inmediata.
3. Los niveles de IGF-1 en el hipocampo de los ratones LID son normales.
4. La estimulación eléctrica del pedúnculo cerebeloso inferior incrementa la captación de IGF-1 sérico en el cerebelo.
5. La estimulación eléctrica de la vibrisas incrementa la captación de IGF-1 sérico en la corteza de barriles.
6. A las 4 semanas de instaurada la diabetes existen alteraciones centrales y periféricas en la vía somatosensorial caracterizadas por hiposensibilidad térmica, disminución de la velocidad de conducción de los nervios periféricos e incremento de las latencias de los potenciales evocados.
7. La disminución de la velocidad de conducción de los nervios periféricos se mantiene constante entre la 4a y 8a semana de instaurada la diabetes.
8. El incremento en las latencias de los potenciales evocados se revierte parcialmente entre la 4a y 8a semana de instaurada la diabetes.
9. A las 8 semanas de diabetes existen alteraciones en la corteza somatosensorial caracterizadas por descenso en la amplitud de los potenciales evocados y de los niveles de las subunidades del receptor de AMPA GluR 2 y GluR 3.
10. El tratamiento con IGF-1 entre las 4 y las 8 semanas de diabetes revierte la disminución en la velocidad de conducción de los nervios periférico y la hiposensibilidad térmica pero no revierte las alteraciones en la corteza somatosensorial indicando que estas son independientes de las alteraciones del sistema nervioso periférico.



## BIBLIOGRAFÍA





- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS. 2000. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20(8):2896-2903.
- Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J. 2006. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal* 6:53-80.
- Acerini CL, Harris DA, Matyka KA, Watts AP, Umpleby AM, Russell-Jones DL, Dunger DB. 1998. Effects of low-dose recombinant human insulin-like growth factor-I on insulin sensitivity, growth hormone and glucagon levels in young adults with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 47(12):1481-1489.
- Agnati LF, Fuxe K. 1990. Nigrostriatal dopamine neurons, D1 transmission in basal and ischemic states and protective effects of gangliosides. *Lab Invest* 63(3):283-297.
- Agnati LF, Fuxe K, Zoli M, Ozini I, Toffano G, Ferraguti F. 1986. A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and beta-endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission. *Acta Physiol Scand* 128(2):201-207.
- Aleman A, Verhaar HJ, De Haan EH, De Vries WR, Samson MM, Drent ML, Van der Veen EA, Koppeschaar HP. 1999. Insulin-like growth factor-I and cognitive function in healthy older men. *J Clin Endocrinol Metab* 84(2):471-475.
- Andersson IK, Edwall D, Norstedt G, Rozell B, Skottner A, Hansson HA. 1988. Differing expression of insulin-like growth factor I in the developing and in the adult rat cerebellum. *Acta Physiol Scand* 132(2):167-173.
- Andriambeloso E, Baillet C, Vitte PA, Garotta G, Dreano M, Callizot N. 2006. Interleukin-6 attenuates the development of experimental diabetes-related neuropathy. *Neuropathology* 26(1):32-42.
- Antonopoulos J, Latsari M, Dori I, Chiotelli M, Parnavelas JG, Dinopoulos A. 2004. Noradrenergic innervation of the developing and mature septal area of the rat. *J Comp Neurol* 476(1):80-90.
- Avruch J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182(1-2):31-48.
- Barbieri M, Bonafe M, Franceschi C, Paolisso G. 2003. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(5):E1064-1071.
- Baxter RC, Martin JL, Beniac VA. 1989. High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. Purification and properties of the acid-labile subunit from human serum. *J Biol Chem* 264(20):11843-11848.
- Bean L, Zheng H, Patel KP, Monaghan DT. 2006. Regional variations in NMDA receptor downregulation in streptozotocin-diabetic rat brain. *Brain Res* 1115(1):217-222.
- Beck KD, Powell-Braxton L, Widmer HR, Valverde J, Hefti F. 1995. Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* 14(4):717-730.

- Bence-Hanulec KK, Marshall J, Blair LA. 2000. Potentiation of neuronal L calcium channels by IGF-1 requires phosphorylation of the alpha1 subunit on a specific tyrosine residue. *Neuron* 27(1):121-131.
- Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL. 1981. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212(4500):1279-1281.
- Bezchlibnyk YB, Xu L, Wang JF, Young LT. 2007. Decreased expression of insulin-like growth factor binding protein 2 in the prefrontal cortex of subjects with bipolar disorder and its regulation by lithium treatment. *Brain Res* 1147:213-217.
- Bienvenu G, Seurin D, Le Bouc Y, Even P, Babajko S, Magnan C. 2005. Dysregulation of energy homeostasis in mice overexpressing insulin-like growth factor-binding protein 6 in the brain. *Diabetologia* 48(6):1189-1197.
- Biessels GJ, Cristino NA, Rutten GJ, Hamers FP, Erkelens DW, Gispen WH. 1999. Neurophysiological changes in the central and peripheral nervous system of streptozotocin-diabetic rats. Course of development and effects of insulin treatment. *Brain* 122 (Pt 4):757-768.
- Biessels GJ, Gispen WH. 2005. The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? *Neurobiol Aging* 26 Suppl 1:36-41.
- Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. 1994. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia* 37(7):643-650.
- Biessels GJ, van der Heide LP, Kamal A, Bleys RL, Gispen WH. 2002. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol* 441(1-2):1-14.
- Blair LA, Bence-Hanulec KK, Mehta S, Franke T, Kaplan D, Marshall J. 1999. Akt-dependent potentiation of L channels by insulin-like growth factor-1 is required for neuronal survival. *J Neurosci* 19(6):1940-1951.
- Blair LA, Marshall J. 1997. IGF-1 modulates N and L calcium channels in a PI 3-kinase-dependent manner. *Neuron* 19(2):421-429.
- Blundell TL, Bedarkar S, Humbel RE. 1983. Tertiary structures, receptor binding, and antigenicity of insulinlike growth factors. *Fed Proc* 42(9):2592-2597.
- Bondy CA. 1991. Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci* 11(11):3442-3455.
- Braulke T, Dittmer F, Gotz W, von Figura K. 1999. Alteration in pancreatic immunoreactivity of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein (IGFBP)-6 and in intracellular degradation of IGFBP-3 in fibroblasts of IGF-II receptor/IGF-II-deficient mice. *Horm Metab Res* 31(2-3):235-241.
- Breese CR, D'Costa A, Rollins YD, Adams C, Booze RM, Sonntag WE, Leonard S. 1996. Expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-binding protein 2 (IGF-BP2) in the hippocampus following cytotoxic lesion of the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 369(3):388-404.
- Brussee V, Cunningham FA, Zochodne DW. 2004. Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy. *Diabetes* 53(7):1824-1830.
- Brywe KG, Mallard C, Gustavsson M, Hedtjarn M, Leverin AL, Wang X, Blomgren K, Isgaard J, Hagberg H. 2005. IGF-I neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3beta? *Eur J Neurosci* 21(6):1489-1502.
- Busiguina S, Chowen JA, Argente J, Torres-Aleman I. 1996. Specific alterations of the insulin-like growth factor I system in the cerebellum of diabetic rats. *Endocrinology* 137(11):4980-4987.

- Busiguina S, Fernandez AM, Barrios V, Clark R, Tolbert DL, Berciano J, Torres-Aleman I. 2000. Neurodegeneration is associated to changes in serum insulin-like growth factors. *Neurobiol Dis* 7(6 Pt B):657-665.
- Calcutt NA, Freshwater JD, Mizisin AP. 2004. Prevention of sensory disorders in diabetic Sprague-Dawley rats by aldose reductase inhibition or treatment with ciliary neurotrophic factor. *Diabetologia* 47(4):718-724.
- Cameron NE, Jack AM, Cotter MA. 2001. Effect of alpha-lipoic acid on vascular responses and nociception in diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 31(1):125-135.
- Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. 2000. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* 20(8):2926-2933.
- Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I. 2005. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci* 25(47):10884-10893.
- Carro E, Torres-Aleman I. 2004. The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 490(1-3):127-133.
- Carro E, Torres-Aleman I. 2006. Serum insulin-like growth factor I in brain function. *Keio J Med* 55(2):59-63.
- Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21(15):5678-5684.
- Carro E, Trejo JL, Gerber A, Loetscher H, Torrado J, Metzger F, Torres-Aleman I. 2006a. Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol Aging* 27(9):1250-1257.
- Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. 2002. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8(12):1390-1397.
- Carro E, Trejo JL, Spuch C, Bohl D, Heard JM, Torres-Aleman I. 2006b. Blockade of the insulin-like growth factor I receptor in the choroid plexus originates Alzheimer's-like neuropathology in rodents: new cues into the human disease? *Neurobiol Aging* 27(11):1618-1631.
- Carroll PV, Christ ER, Umpleby AM, Gowrie I, Jackson N, Bowes SB, Hovorka R, Croos P, Sonksen PH, Russell-Jones DL. 2000. IGF-I treatment in adults with type 1 diabetes: effects on glucose and protein metabolism in the fasting state and during a hyperinsulinemic-euglycemic amino acid clamp. *Diabetes* 49(5):789-796.
- Carroll PV, Umpleby M, Ward GS, Imuere S, Alexander E, Dunger D, Sonksen PH, Russell-Jones DL. 1997. rhIGF-I administration reduces insulin requirements, decreases growth hormone secretion, and improves the lipid profile in adults with IDDM. *Diabetes* 46(9):1453-1458.
- Casella SJ, Smith EP, van Wyk JJ, Joseph DR, Hynes MA, Hoyt EC, Lund PK. 1987. Isolation of rat testis cDNAs encoding an insulin-like growth factor I precursor. *Dna* 6(4):325-330.
- Castro-Alamancos MA. 2004. Absence of rapid sensory adaptation in neocortex during information processing states. *Neuron* 41(3):455-464.
- Castro-Alamancos MA, Torres-Aleman I. 1993. Long-term depression of glutamate-induced gamma-aminobutyric acid release in cerebellum by insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(15):7386-7390.
- Castro-Alamancos MA, Torres-Aleman I. 1994. Learning of the conditioned eye-blink response is impaired by an antisense insulin-like growth factor I oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21):10203-10207.

- Ceda GP, Dall'Aglio E, Maggio M, Lauretani F, Bandinelli S, Falzoi C, Grimaldi W, Ceresini G, Corradi F, Ferrucci L, Valenti G, Hoffman AR. 2005. Clinical implications of the reduced activity of the GH-IGF-I axis in older men. *J Endocrinol Invest* 28(11 Suppl Proceedings):96-100.
- Cobb MH, Goldsmith EJ. 1995. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270(25):14843-14846.
- Corpas E, Harman SM, Blackman MR. 1993. Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 14(1):20-39.
- Cotman CW, Berchtold NC. 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25(6):295-301.
- Creager R, Dunwiddie T, Lynch G. 1980. Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. *J Physiol* 299:409-424.
- Crespo JA, Sturm K, Saria A, Zernig G. 2006. Activation of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the nucleus accumbens core is necessary for the acquisition of drug reinforcement. *J Neurosci* 26(22):6004-6010.
- Chan SJ, Cao QP, Steiner DF. 1990. Evolution of the insulin superfamily: cloning of a hybrid insulin/insulin-like growth factor cDNA from amphioxus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(23):9319-9323.
- Cheetham TD, Jones J, Taylor AM, Holly J, Matthews DR, Dunger DB. 1993. The effects of recombinant insulin-like growth factor I administration on growth hormone levels and insulin requirements in adolescents with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36(7):678-681.
- Chen SR, Pan HL. 2002. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *J Neurophysiol* 87(6):2726-2733.
- Cheng CM, Cohen M, Tseng V, Bondy CA. 2001. Endogenous IGF1 enhances cell survival in the postnatal dentate gyrus. *J Neurosci Res* 64(4):341-347.
- Chesik D, De Keyser J, Glazenburg L, Wilczak N. 2006. Insulin-like growth factor binding proteins: regulation in chronic active plaques in multiple sclerosis and functional analysis of glial cells. *Eur J Neurosci* 24(6):1645-1652.
- Chesik D, De Keyser J, Wilczak N. 2004. Involvement of insulin-like growth factor binding protein-2 in activated microglia as assessed in post mortem human brain. *Neurosci Lett* 362(1):14-16.
- Chu PC, Lin MT, Shian LR, Leu SY. 1986. Alterations in physiologic functions and in brain monoamine content in streptozocin-diabetic rats. *Diabetes* 35(4):481-485.
- Chung S, Li X, Nelson SB. 2002. Short-term depression at thalamocortical synapses contributes to rapid adaptation of cortical sensory responses in vivo. *Neuron* 34(3):437-446.
- Churchill JD, Galvez R, Colcombe S, Swain RA, Kramer AF, Greenough WT. 2002. Exercise, experience and the aging brain. *Neurobiol Aging* 23(5):941-955.
- D'Ercole AJ, Dai Z, Xing Y, Boney C, Wilkie MB, Lauder JM, Han VK, Clemmons DR. 1994. Brain growth retardation due to the expression of human insulin like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: an in vivo model for the analysis of igf function in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 82(1-2):213-222.
- D'Ercole AJ, Ye P, O'Kusky JR. 2002. Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides* 36(2-3):209-220.
- D'Mello SR, Borodezt K, Soltoff SP. 1997. Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J Neurosci* 17(5):1548-1560.

- Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Jr., van den Brande JL, van Wyk JJ. 1972. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235(5333):107.
- DCCT. 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 329(14):977-986.
- Denko CW, Bergenstal DM. 1955. The effect of hypophysectomy and growth hormone on S35 fixation in cartilage. *Endocrinology* 57(1):76-86.
- Descarries L, Gisiger V, Steriade M. 1997. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol* 53(5):603-625.
- Devedjian JC, George M, Casellas A, Pujol A, Visa J, Pelegrin M, Gros L, Bosch F. 2000. Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in beta cells develop type 2 diabetes. *J Clin Invest* 105(6):731-740.
- Di Luca M, Ruts L, Gardoni F, Cattabeni F, Biessels GJ, Gispen WH. 1999. NMDA receptor subunits are modified transcriptionally and post-translationally in the brain of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 42(6):693-701.
- Di Mario U, Morano S, Valle E, Pozzessere G. 1995. Electrophysiological alterations of the central nervous system in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 11(3):259-277.
- Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z, Gomez-Pinilla F. 2006. Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience* 140(3):823-833.
- Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, Molinaro M, Rosenthal N, Musaro A. 2005. Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol* 168(2):193-199.
- Dore S, Bastianetto S, Kar S, Quirion R. 1999. Protective and rescuing abilities of IGF-I and some putative free radical scavengers against beta-amyloid-inducing toxicity in neurons. *Ann N Y Acad Sci* 890:356-364.
- Dore S, Kar S, Quirion R. 1997. Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid- and human amylin-induced toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9):4772-4777.
- Drago F, Di Leo F, Ikonou S, Anzallo C, Busa L, LoPresti L. 1996. Behavioral and endocrine effects of growth hormone administration in aged female rats. *Psychoneuroendocrinology* 21(4):401-410.
- Drakenberg K, Sara VR, Falkmer S, Gammeltoft S, Maake C, Reinecke M. 1993. Identification of IGF-1 receptors in primitive vertebrates. *Regul Pept* 43(1-2):73-81.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275(5300):661-665.
- Edmondson SR, Werther GA, Russell A, LeRoith D, Roberts CT, Jr., Beck F. 1995. Localization of growth hormone receptor/binding protein messenger ribonucleic acid (mRNA) during rat fetal development: relationship to insulin-like growth factor-I mRNA. *Endocrinology* 136(10):4602-4609.
- Elde R, Arvidsson U, Riedl M, Vulchanova L, Lee JH, Dado R, Nakano A, Chakrabarti S, Zhang X, Loh HH, et al. 1995. Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors. *Ann N Y Acad Sci* 757:390-404.

- Emerick AJ, Richards MP, Kartje GL, Neafsey EJ, Stubbs EB, Jr. 2005. Experimental diabetes attenuates cerebral cortical-evoked forelimb motor responses. *Diabetes* 54(9):2764-2771.
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25(44):10074-10086.
- Fernandez-Sanchez MT, Garcia-Rodriguez A, Diaz-Trelles R, Novelli A. 1996. Inhibition of protein phosphatases induces IGF-1-blocked neurotrophin-insensitive neuronal apoptosis. *FEBS Lett* 398(1):106-112.
- Fernandez AM, de la Vega AG, Torres-Aleman I. 1998. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3):1253-1258.
- Fernandez AM, Gonzalez de la Vega AG, Planas B, Torres-Aleman I. 1999. Neuroprotective actions of peripherally administered insulin-like growth factor I in the injured olivo-cerebellar pathway. *Eur J Neurosci* 11(6):2019-2030.
- Fernandez AM, Kim JK, Yakar S, Dupont J, Hernandez-Sanchez C, Castle AL, Filmore J, Shulman GI, Le Roith D. 2001. Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev* 15(15):1926-1934.
- Finch CE, Ruvkun G. 2001. The genetics of aging. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:435-462.
- Fox A, Eastwood C, Gentry C, Manning D, Urban L. 1999. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain* 81(3):307-316.
- Fukudome Y, Tabata T, Miyoshi T, Haruki S, Araishi K, Sawada S, Kano M. 2003. Insulin-like growth factor-I as a promoting factor for cerebellar Purkinje cell development. *Eur J Neurosci* 17(10):2006-2016.
- Fuxe K, Manger P, Genedani S, Agnati L. 2006. The nigrostriatal DA pathway and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*(70):71-83.
- Fuxe K, Rivera A, Jacobsen KX, Hoistad M, Leo G, Horvath TL, Staines W, De la Calle A, Agnati LF. 2005. Dynamics of volume transmission in the brain. Focus on catecholamine and opioid peptide communication and the role of uncoupling protein 2. *J Neural Transm* 112(1):65-76.
- G Paxinos CW. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- G Paxinos KF. 2003. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Gage FH. 2002. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 22(3):612-613.
- Galli C, Meucci O, Scorziello A, Werge TM, Calissano P, Schettini G. 1995. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci* 15(2):1172-1179.
- Garcia-Galloway E, Arango C, Pons S, Torres-Aleman I. 2003. Glutamate excitotoxicity attenuates insulin-like growth factor-I prosurvival signaling. *Mol Cell Neurosci* 24(4):1027-1037.
- Garcia-Segura LM, Perez J, Pons S, Rejas MT, Torres-Aleman I. 1991. Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Res* 560(1-2):167-174.

- Garcia-Segura LM, Rodriguez JR, Torres-Aleman I. 1997. Localization of the insulin-like growth factor I receptor in the cerebellum and hypothalamus of adult rats: an electron microscopic study. *J Neurocytol* 26(7):479-490.
- Gillespie CM, Merkel AL, Martin AA. 1997. Effects of insulin-like growth factor-I and LR3IGF-I on regional blood flow in normal rats. *J Endocrinol* 155(2):351-358.
- Gispén WH, Biessels GJ. 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 23(11):542-549.
- Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR. 2002. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol* 88(5):2187-2195.
- Gonzalez de la Vega A, Buno W, Pons S, Garcia-Calderat MS, Garcia-Galloway E, Torres-Aleman I. 2001. Insulin-like growth factor I potentiates kainate receptors through a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway. *Neuroreport* 12(6):1293-1296.
- Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA. 1992. Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care* 15(12):1902-1925.
- Guan J, Beilharz EJ, Skinner SJ, Williams CE, Gluckman PD. 2000. Intracerebral transportation and cellular localisation of insulin-like growth factor-1 following central administration to rats with hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res* 853(2):163-173.
- Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER. 1989. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121(6):753-758.
- Guo H, Yang Y, Geng Z, Zhu L, Yuan S, Zhao Y, Gao Y, Fu H. 1999. The change of insulin-like growth factor-1 in diabetic patients with neuropathy. *Chin Med J (Engl)* 112(1):76-79.
- Gupta M, Singh J, Sood S, Arora B. 2003. Mechanism of antinociceptive effect of nimodipine in experimental diabetic neuropathic pain. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25(1):49-52.
- Gutierrez-Ospina G, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ. 1996. In vivo effects of insulin-like growth factor-I on the development of sensory pathways: analysis of the primary somatic sensory cortex (S1) of transgenic mice. *Endocrinology* 137(12):5484-5492.
- Han VK, Hill DJ, Strain AJ, Towle AC, Lauder JM, Underwood LE, D'Ercole AJ. 1987. Identification of somatomedin/insulin-like growth factor immunoreactive cells in the human fetus. *Pediatr Res* 22(3):245-249.
- Hansen AP, Johansen K. 1970. Diurnal patterns of blood glucose, serum free fatty acids, insulin, glucagon and growth hormone in normals and juvenile diabetics. *Diabetologia* 6(1):27-33.
- Harder DR, Alkayed NJ, Lange AR, Gebremedhin D, Roman RJ. 1998. Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke* 29(1):229-234.
- Hawkes C, Jhamandas JH, Harris KH, Fu W, MacDonald RG, Kar S. 2006. Single transmembrane domain insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor regulates central cholinergic function by activating a G-protein-sensitive, protein kinase C-dependent pathway. *J Neurosci* 26(2):585-596.
- Hentall ID, Pinzon A, Noga BR. 2006. Spatial and temporal patterns of serotonin release in the rat's lumbar spinal cord following electrical stimulation of the nucleus raphe magnus. *Neuroscience* 142(3):893-903.

- Hoeflich A, Nedbal S, Blum WF, Erhard M, Lahm H, Brem G, Kolb HJ, Wanke R, Wolf E. 2001. Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* 142(5):1889-1898.
- Holmin S, Mathiesen T, Langmoen IA, Sandberg Nordqvist AC. 2001. Depolarization induces insulin-like growth factor binding protein-2 expression in vivo via NMDA receptor stimulation. *Growth Horm IGF Res* 11(6):399-406.
- Holt RI, Simpson HL, Sonksen PH. 2003. The role of the growth hormone-insulin-like growth factor axis in glucose homeostasis. *Diabet Med* 20(1):3-15.
- Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hong M, Lee VM. 1997. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem* 272(31):19547-19553.
- Hornum M, Cooper DM, Brasel JA, Bueno A, Sietsema KE. 1997. Exercise-induced changes in circulating growth factors with cyclic variation in plasma estradiol in women. *J Appl Physiol* 82(6):1946-1951.
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20(6):761-787.
- Hwang HJ, Kwon MJ, Nam TJ. 2007. Chemoprotective effect of insulin-like growth factor I against acetaminophen-induced cell death in Chang liver cells via ERK1/2 activation. *Toxicology* 230(1):76-82.
- Ibuki T, Hama AT, Wang XT, Pappas GD, Sagen J. 1997. Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. *Neuroscience* 76(3):845-858.
- Ide K, Secher NH. 2000. Cerebral blood flow and metabolism during exercise. *Prog Neurobiol* 61(4):397-414.
- Ishii DN. 1995. Implication of insulin-like growth factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Brain Res Brain Res Rev* 20(1):47-67.
- Ishii DN, Lupien SB. 1995. Insulin-like growth factors protect against diabetic neuropathy: effects on sensory nerve regeneration in rats. *J Neurosci Res* 40(1):138-144.
- Kadowaki T, Tamemoto H, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Yamauchi T, Satoh S, Sekihara H, Aizawa S, Yazaki Y. 1996. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1 and identification of insulin receptor substrate-2. *Diabet Med* 13(9 Suppl 6):S103-108.
- Kajimoto Y, Rotwein P. 1989. Structure and expression of a chicken insulin-like growth factor I precursor. *Mol Endocrinol* 3(12):1907-1913.
- Kapeller R, Cantley LC. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays* 16(8):565-576.
- Kappelle AC, Bravenboer B, van Buren T, Traber J, Erkelens DW, Gispen WH. 1993. Amelioration by the Ca<sup>2+</sup> antagonist, nimodipine of an existing neuropathy in the streptozotocin-induced, diabetic rat. *Br J Pharmacol* 108(3):780-785.
- Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG. 1996. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 28(6):619-637.
- Kelley KM, Schmidt KE, Berg L, Sak K, Galima MM, Gillespie C, Balogh L, Hawayek A, Reyes JA, Jamison M. 2002. Comparative endocrinology of the insulin-like growth factor-binding protein. *J Endocrinol* 175(1):3-18.



- Kim B, Cheng HL, Margolis B, Feldman EL. 1998. Insulin receptor substrate 2 and Shc play different roles in insulin-like growth factor I signaling. *J Biol Chem* 273(51):34543-34550.
- Kissela B, Air E. 2006. Diabetes: impact on stroke risk and poststroke recovery. *Semin Neurol* 26(1):100-107.
- Kitagawa J, Tsuboi Y, Ogawa A, Ren K, Hitomi S, Saitoh K, Takahashi O, Masuda Y, Harada T, Hanzawa N, Kanda K, Iwata K. 2005. Involvement of dorsal column nucleus neurons in nociceptive transmission in aged rats. *J Neurophysiol* 94(6):4178-4187.
- Kleim JA, Jones TA, Schallert T. 2003. Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury. *Neurochem Res* 28(11):1757-1769.
- Konsman JP, Tridon V, Dantzer R. 2000. Diffusion and action of intracerebroventricularly injected interleukin-1 in the CNS. *Neuroscience* 101(4):957-967.
- Koopmans GC, Brans M, Gomez-Pinilla F, Duis S, Gispen WH, Torres-Aleman I, Joosten EA, Hamers FP. 2006. Circulating insulin-like growth factor I and functional recovery from spinal cord injury under enriched housing conditions. *Eur J Neurosci* 23(4):1035-1046.
- Kornfeld S. 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 61:307-330.
- Kraemer WJ, Ratamess NA. 2005. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med* 35(4):339-361.
- Kramer AF, Erickson KI, Colcombe SJ. 2006. Exercise, cognition, and the aging brain. *J Appl Physiol* 101(4):1237-1242.
- Kruger TH, Schiffer B, Eikermann M, Haake P, Gizewski E, Schedlowski M. 2006. Serial neurochemical measurement of cerebrospinal fluid during the human sexual response cycle. *Eur J Neurosci* 24(12):3445-3452.
- Kuzuya H, Matsuura N, Sakamoto M, Makino H, Sakamoto Y, Kadowaki T, Suzuki Y, Kobayashi M, Akazawa Y, Nomura M, et al. 1993. Trial of insulinlike growth factor I therapy for patients with extreme insulin resistance syndromes. *Diabetes* 42(5):696-705.
- Lanfranco F, Gianotti L, Giordano R, Pellegrino M, Maccario M, Arvat E. 2003. Ageing, growth hormone and physical performance. *J Endocrinol Invest* 26(9):861-872.
- Lauritzen M. 2005. Reading vascular changes in brain imaging: is dendritic calcium the key? *Nat Rev Neurosci* 6(1):77-85.
- Lauritzen M, Gold L. 2003. Brain function and neurophysiological correlates of signals used in functional neuroimaging. *J Neurosci* 23(10):3972-3980.
- LeRoith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 22(1):53-74.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16(2):143-163.
- Li F, Drel VR, Szabo C, Stevens MJ, Obrosova IG. 2005. Low-dose poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy. *Diabetes* 54(5):1514-1522.
- Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AA. 2002. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res* 946(2):221-231.
- Lipton SA, Rosenberg PA. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330(9):613-622.

- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75(1):59-72.
- Liu XF, Fawcett JR, Thorne RG, Frey WH, 2nd. 2001. Non-invasive intranasal insulin-like growth factor-I reduces infarct volume and improves neurologic function in rats following middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett* 308(2):91-94.
- Lopez-Lopez C, LeRoith D, Torres-Aleman I. 2004. Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26):9833-9838.
- Lowe WL, Jr., Lasky SR, LeRoith D, Roberts CT, Jr. 1988. Distribution and regulation of rat insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids encoding alternative carboxyterminal E-peptides: evidence for differential processing and regulation in liver. *Mol Endocrinol* 2(6):528-535.
- Lowe WL, Jr., Roberts CT, Jr., Lasky SR, LeRoith D. 1987. Differential expression of alternative 5' untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24):8946-8950.
- Lupien SB, Bluhm EJ, Ishii DN. 2003. Systemic insulin-like growth factor-I administration prevents cognitive impairment in diabetic rats, and brain IGF regulates learning/memory in normal adult rats. *J Neurosci Res* 74(4):512-523.
- Maes M, Ketelslegers JM, Underwood LE. 1983. Low plasma somatomedin-C in streptozotocin-induced diabetes mellitus. Correlation with changes in somatogenic and lactogenic liver binding sites. *Diabetes* 32(11):1060-1069.
- Maes M, Underwood LE, Ketelslegers JM. 1986. Low serum somatomedin-C in insulin-dependent diabetes: evidence for a postreceptor mechanism. *Endocrinology* 118(1):377-382.
- Mahmoud GS, Grover LM. 2006. Growth hormone enhances excitatory synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampus. *J Neurophysiol* 95(5):2962-2974.
- Malcangio M, Tomlinson DR. 1998. A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. *Pain* 76(1-2):151-157.
- Marshall J, Dolan BM, Garcia EP, Sathe S, Tang X, Mao Z, Blair LA. 2003. Calcium channel and NMDA receptor activities differentially regulate nuclear C/EBPbeta levels to control neuronal survival. *Neuron* 39(4):625-639.
- Mastorakos G, Pavlatou M. 2005. Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus-pituitary-adrenal and the hypothalamus-pituitary-thyroid axes. *Horm Metab Res* 37(9):577-584.
- Michaels RL, Rothman SM. 1990. Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J Neurosci* 10(1):283-292.
- Moore SA, Peterson RG, Felten DL, O'Connor BL. 1980. A quantitative comparison of motor and sensory conduction velocities in short- and long-term streptozotocin- and alloxan-diabetic rats. *J Neurol Sci* 48(1):133-152.
- Murphy LJ. 1998. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *J Mol Endocrinol* 21(2):97-107.
- Murphy WR, Daughaday WH, Hartnett C. 1956. The effect of hypophysectomy and growth hormone on the incorporation of labeled sulfate into tibial epiphyseal and nasal cartilage of the rat. *J Lab Clin Med* 47(5):715-722.
- Mustafa A, Lannfelt L, Lilius L, Islam A, Winblad B, Adem A. 1999. Decreased plasma insulin-like growth factor-I level in familial Alzheimer's disease patients carrying the Swedish APP 670/671 mutation. *Dement Geriatr Cogn Disord* 10(6):446-451.

- Nagano I, Shiote M, Murakami T, Kamada H, Hamakawa Y, Matsubara E, Yokoyama M, Moritaz K, Shoji M, Abe K. 2005. Beneficial effects of intrathecal IGF-1 administration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 27(7):768-772.
- Nagaraja TN, Patel P, Gorski M, Gorevic PD, Patlak CS, Fenstermacher JD. 2005. In normal rat, intraventricularly administered insulin-like growth factor-1 is rapidly cleared from CSF with limited distribution into brain. *Cerebrospinal Fluid Res* 2:5.
- Niblock MM, Brunso-Bechtold JK, Riddle DR. 2000. Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J Neurosci* 20(11):4165-4176.
- Nieto-Bona MP, Garcia-Segura LM, Torres-Aleman I. 1993. Orthograde transport and release of insulin-like growth factor I from the inferior olive to the cerebellum. *J Neurosci Res* 36(5):520-527.
- Niikura T, Hashimoto Y, Okamoto T, Abe Y, Yasukawa T, Kawasumi M, Hiraki T, Kita Y, Terashita K, Kouyama K, Nishimoto I. 2001. Insulin-like growth factor I (IGF-I) protects cells from apoptosis by Alzheimer's V642I mutant amyloid precursor protein through IGF-I receptor in an IGF-binding protein-sensitive manner. *J Neurosci* 21(6):1902-1910.
- Nishijima T, Soya H. 2006. Evidence of functional hyperemia in the rat hippocampus during mild treadmill running. *Neurosci Res* 54(3):186-191.
- Núñez A, Carro E, Torres-Aleman I. 2003. Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons. *J Neurophysiol* 89(6):3008-3017.
- Nybo L, Secher NH. 2004. Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise. *Prog Neurobiol* 72(4):223-261.
- O'Donnell SL, Frederick TJ, Krady JK, Vannucci SJ, Wood TL. 2002. IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain. *Glia* 39(1):85-97.
- O'Kusky JR, Ye P, D'Ercole AJ. 2000. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J Neurosci* 20(22):8435-8442.
- Ozdinler PH, Macklis JD. 2006. IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat Neurosci* 9(11):1371-1381.
- Pan W, Kastin AJ. 2000. Interactions of IGF-1 with the blood-brain barrier in vivo and in situ. *Neuroendocrinology* 72(3):171-178.
- Pashmforoush M, Chan SJ, Steiner DF. 1996. Structure and expression of the insulin-like peptide receptor from amphioxus. *Mol Endocrinol* 10(7):857-866.
- Payne AM, Zheng Z, Messi ML, Milligan CE, Gonzalez E, Delbono O. 2006. Motor neurone targeting of IGF-1 prevents specific force decline in ageing mouse muscle. *J Physiol* 570(Pt 2):283-294.
- Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS. 1997. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 20(10):464-470.
- Pennisi PA, Kopchick JJ, Thorgeirsson S, LeRoith D, Yakar S. 2004. Role of growth hormone (GH) in liver regeneration. *Endocrinology* 145(10):4748-4755.
- Pezet S, Spyropoulos A, Williams RJ, McMahon SB. 2005. Activity-dependent phosphorylation of Akt/PKB in adult DRG neurons. *Eur J Neurosci* 21(7):1785-1797.

- Pickel VM, Garzon M, Mengual E. 2002. Electron microscopic immunolabeling of transporters and receptors identifies transmitter-specific functional sites envisioned in Cajal's neuron. *Prog Brain Res* 136:145-155.
- Pickup JC WG. 1994. *Chronic Complications of Diabetes*. London: Blackwell Science.
- Pixley SK, Dangoria NS, Odoms KK, Hastings L. 1998. Effects of insulin-like growth factor 1 on olfactory neurogenesis in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 855:244-247.
- Poe BH, Linville C, Riddle DR, Sonntag WE, Brunso-Bechtold JK. 2001. Effects of age and insulin-like growth factor-1 on neuron and synapse numbers in area CA3 of hippocampus. *Neuroscience* 107(2):231-238.
- Ramsey MM, Adams MM, Ariwodola OJ, Sonntag WE, Weiner JL. 2005. Functional characterization of des-IGF-1 action at excitatory synapses in the CA1 region of rat hippocampus. *J Neurophysiol* 94(1):247-254.
- Ramsey MM, Weiner JL, Moore TP, Carter CS, Sonntag WE. 2004. Growth hormone treatment attenuates age-related changes in hippocampal short-term plasticity and spatial learning. *Neuroscience* 129(1):119-127.
- Ranke MB. 2005. Insulin-like growth factor-I treatment of growth disorders, diabetes mellitus and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 16(4):190-197.
- Reinhardt RR, Bondy CA. 1994. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology* 135(5):1753-1761.
- Richard-Parpaillon L, Heligon C, Chesnel F, Boujard D, Philpott A. 2002. The IGF pathway regulates head formation by inhibiting Wnt signaling in *Xenopus*. *Dev Biol* 244(2):407-417.
- Rincon M, Rudin E, Barzilai N. 2005. The insulin/IGF-1 signaling in mammals and its relevance to human longevity. *Exp Gerontol* 40(11):873-877.
- Rinderknecht E, Humbel RE. 1978a. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253(8):2769-2776.
- Rinderknecht E, Humbel RE. 1978b. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 89(2):283-286.
- Roberts CT, Jr., Lasky SR, Lowe WL, Jr., Seaman WT, LeRoith D. 1987. Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary deoxyribonucleic acids: differential messenger ribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. *Mol Endocrinol* 1(3):243-248.
- Rotwein P, Pollock KM, Watson M, Milbrandt JD. 1987. Insulin-like growth factor gene expression during rat embryonic development. *Endocrinology* 121(6):2141-2144.
- Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. 2005. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev* 26(7):916-943.
- Said G. 1983. [Etiology of peripheral neuropathies]. *Presse Med* 12(11):669-671.
- Saini AK, Arun KH, Kaul CL, Sharma SS. 2004. Acute hyperglycemia attenuates nerve conduction velocity and nerve blood flow in male Sprague-Dawley rats: reversal by adenosine. *Pharmacol Res* 50(6):593-599.
- Salih DA, Tripathi G, Holding C, Szeszak TA, Gonzalez MI, Carter EJ, Cobb LJ, Eisemann JE, Pell JM. 2004. Insulin-like growth factor-binding protein 5 (Igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(12):4314-4319.
- Salmon WD, Jr., Daughaday WH. 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49(6):825-836.

- Sandberg Nordqvist AC, von Holst H, Holmin S, Sara VR, Bellander BM, Schalling M. 1996. Increase of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF binding protein-2 and -4 mRNAs following cerebral contusion. *Brain Res Mol Brain Res* 38(2):285-293.
- Schmidt RE, Dorsey DA, Beaudet LN, Plurad SB, Parvin CA, Miller MS. 1999. Insulin-like growth factor I reverses experimental diabetic autonomic neuropathy. *Am J Pathol* 155(5):1651-1660.
- Schneider-Rivas S, Rivas-Arancibia S, Vazquez-Pereyra F, Vazquez-Sandoval R, Borgonio-Perez G. 1995. Modulation of long-term memory and extinction responses induced by growth hormone (GH) and growth hormone releasing hormone (GHRH) in rats. *Life Sci* 56(22):PL433-441.
- Schneider MR, Lahm H, Wu M, Hoeflich A, Wolf E. 2000. Transgenic mouse models for studying the functions of insulin-like growth factor-binding proteins. *Faseb J* 14(5):629-640.
- Schoenle EJ, Zenobi PD, Torresani T, Werder EA, Zachmann M, Froesch ER. 1991. Recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF I) reduces hyperglycaemia in patients with extreme insulin resistance. *Diabetologia* 34(9):675-679.
- Schwarz AJ, Brasel JA, Hintz RL, Mohan S, Cooper DM. 1996. Acute effect of brief low- and high-intensity exercise on circulating insulin-like growth factor (IGF) I, II, and IGF-binding protein-3 and its proteolysis in young healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 81(10):3492-3497.
- Shan H, Messi ML, Zheng Z, Wang ZM, Delbono O. 2003. Preservation of motor neuron Ca<sup>2+</sup> channel sensitivity to insulin-like growth factor-1 in brain motor cortex from senescent rat. *J Physiol* 553(Pt 1):49-63.
- Silha JV, Murphy LJ. 2002. Insights from insulin-like growth factor binding protein transgenic mice. *Endocrinology* 143(10):3711-3714.
- Sima AA. 2004. Diabetes underlies common neurological disorders. *Ann Neurol* 56(4):459-461.
- Sima AA, Sugimoto K. 1999. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 42(7):773-788.
- Stephen J. 2003. Disorders of the Exocrine Pancreas. In: Stephen J. McPhee VRL, William F. Ganong, editor. *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*. New York: McGraw-Hill Companies.
- Ster J, Colomer C, Monzo C, Duvoid-Guillou A, Moos F, Alonso G, Hussy N. 2005. Insulin-like growth factor-1 inhibits adult supraoptic neurons via complementary modulation of mechanoreceptors and glycine receptors. *J Neurosci* 25(9):2267-2276.
- Stevens MJ, Li F, Drel VR, Abatan OI, Kim H, Burnett D, Larkin D, Obrosova IG. 2007. Nicotinamide reverses neurological and neurovascular deficits in streptozotocin diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 320(1):458-464.
- Stylianopoulou F, Herbert J, Soares MB, Efstratiadis A. 1988. Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(1):141-145.
- Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AA. 2000. Diabetic neuropathy--a continuing enigma. *Diabetes Metab Res Rev* 16(6):408-433.
- Sun LY, Evans MS, Hsieh J, Panici J, Bartke A. 2005. Increased neurogenesis in dentate gyrus of long-lived Ames dwarf mice. *Endocrinology* 146(3):1138-1144.
- Svensson J, Diez M, Engel J, Wass C, Tivesten A, Jansson JO, Isaksson O, Archer T, Hokfelt T, Ohlsson C. 2006. Endocrine, liver-derived IGF-I is of importance for spatial learning and memory in old mice. *J Endocrinol* 189(3):617-627.

- Tagawa Y, Kanold PO, Majdan M, Shatz CJ. 2005. Multiple periods of functional ocular dominance plasticity in mouse visual cortex. *Nat Neurosci* 8(3):380-388.
- Tan K, Baxter RC. 1986. Serum insulin-like growth factor I levels in adult diabetic patients: the effect of age. *J Clin Endocrinol Metab* 63(3):651-655.
- Tatar M, Bartke A, Antebi A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299(5611):1346-1351.
- Terada M, Yasuda H, Kikkawa R, Koyama N, Yokota T, Shigeta Y. 1993. Electrophysiological study of dorsal column function in streptozocin-induced diabetic rats: comparison with 2,5-hexanedione intoxication. *J Neurol Sci* 115(1):58-66.
- Terata K, Coppey LJ, Davidson EP, Dunlap JA, Gutterman DD, Yorek MA. 1999. Acetylcholine-induced arteriolar dilation is reduced in streptozotocin-induced diabetic rats with motor nerve dysfunction. *Br J Pharmacol* 128(3):837-843.
- Tham A, Nordberg A, Grissom FE, Carlsson-Skwirut C, Viitanen M, Sara VR. 1993. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with dementia of the Alzheimer type. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 5(3):165-176.
- Tian JB, Bishop GA. 2002. Stimulus-dependent activation of c-Fos in neurons and glia in the rat cerebellum. *J Chem Neuroanat* 23(3):157-170.
- Tilghman SM, Belayew A. 1982. Transcriptional control of the murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(17):5254-5257.
- Torres-Aleman I. 2000. Serum growth factors and neuroprotective surveillance: focus on IGF-1. *Mol Neurobiol* 21(3):153-160.
- Torres-Aleman I, Villalba M, Nieto-Bona MP. 1998. Insulin-like growth factor-I modulation of cerebellar cell populations is developmentally stage-dependent and mediated by specific intracellular pathways. *Neuroscience* 83(2):321-334.
- Trejo JL, Carro E, Lopez-Lopez C, Torres-Aleman I. 2004. Role of serum insulin-like growth factor I in mammalian brain aging. *Growth Horm IGF Res* 14 Suppl A:S39-43.
- Trejo JL, Carro E, Nunez A, Torres-Aleman I. 2002. Sedentary life impairs self-reparative processes in the brain: the role of serum insulin-like growth factor-I. *Rev Neurosci* 13(4):365-374.
- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21(5):1628-1634.
- Trudeau F, Gagnon S, Massicotte G. 2004. Hippocampal synaptic plasticity and glutamate receptor regulation: influences of diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 490(1-3):177-186.
- Tun PA, Nathan DM, Perlmutter LC. 1990. Cognitive and affective disorders in elderly diabetics. *Clin Geriatr Med* 6(4):731-746.
- Ueki I, Ooi GT, Tremblay ML, Hurst KR, Bach LA, Boisclair YR. 2000. Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6868-6873.
- Ueki K, Okada T, Hu J, Liew CW, Assmann A, Dahlgren GM, Peters JL, Shackman JG, Zhang M, Artner I, Satin LS, Stein R, Holzenberger M, Kennedy RT, Kahn CR, Kulkarni RN. 2006. Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic beta cells causes overt diabetes. *Nat Genet* 38(5):583-588.

- Usala AL, Madigan T, Burguera B, Sinha MK, Caro JF, Cunningham P, Powell JG, Butler PC. 1992. Brief report: treatment of insulin-resistant diabetic ketoacidosis with insulin-like growth factor I in an adolescent with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 327(12):853-857.
- Valastro B, Cossette J, Lavoie N, Gagnon S, Trudeau F, Massicotte G. 2002. Up-regulation of glutamate receptors is associated with LTP defects in the early stages of diabetes mellitus. *Diabetologia* 45(5):642-650.
- Valentinis B, Morrione A, Peruzzi F, Prisco M, Reiss K, Baserga R. 1999. Anti-apoptotic signaling of the IGF-I receptor in fibroblasts following loss of matrix adhesion. *Oncogene* 18(10):1827-1836.
- Vicario-Abejon C, Yusta-Boyo MJ, Fernandez-Moreno C, de Pablo F. 2003. Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci* 23(3):895-906.
- Vincent AM, Feldman EL. 2002. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm IGF Res* 12(4):193-197.
- Vincent AM, Mobley BC, Hiller A, Feldman EL. 2004. IGF-I prevents glutamate-induced motor neuron programmed cell death. *Neurobiol Dis* 16(2):407-416.
- Vitkovic L, Konsman JP, Bockaert J, Dantzer R, Homburger V, Jacque C. 2000. Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry* 5(6):604-615.
- Walter HJ, Berry M, Hill DJ, Cwyfan-Hughes S, Holly JM, Logan A. 1999. Distinct sites of insulin-like growth factor (IGF)-II expression and localization in lesioned rat brain: possible roles of IGF binding proteins (IGFBPs) in the mediation of IGF-II activity. *Endocrinology* 140(1):520-532.
- Wang JM, Hayashi T, Zhang WR, Sakai K, Shiro Y, Abe K. 2000. Reduction of ischemic brain injury by topical application of insulin-like growth factor-I after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 859(2):381-385.
- Wang YT, Linden DJ. 2000. Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron* 25(3):635-647.
- Weis J, Dimpfel W, Schroder JM. 1995. Nerve conduction changes and fine structural alterations of extra- and intrafusal muscle and nerve fibers in streptozotocin diabetic rats. *Muscle Nerve* 18(2):175-184.
- Welniak LA, Karas M, Yakar S, Anver MR, Murphy WJ, LeRoith D. 2004. Effects of organ-specific loss of insulin-like growth factor-I production on murine hematopoiesis. *Biol Blood Marrow Transplant* 10(1):32-39.
- Werner H, Shen-Orr Z, Rauscher FJ, 3rd, Morris JF, Roberts CT, Jr., LeRoith D. 1995. Inhibition of cellular proliferation by the Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with suppression of insulin-like growth factor I receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 15(7):3516-3522.
- Werther GA, Abate M, Hogg A, Cheesman H, Oldfield B, Hards D, Hudson P, Power B, Freed K, Herington AC. 1990. Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridization--relationship to IGF-I receptors. *Mol Endocrinol* 4(5):773-778.
- Wiest MC, Bentley N, Nicolelis MA. 2005. Heterogeneous integration of bilateral whisker signals by neurons in primary somatosensory cortex of awake rats. *J Neurophysiol* 93(5):2966-2973.
- Wilczak N, de Vos RA, De Keyser J. 2003. Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 361(9362):1007-1011.

- Wuarin L, Guertin DM, Ishii DN. 1994. Early reduction in insulin-like growth factor gene expression in diabetic nerve. *Exp Neurol* 130(1):106-114.
- Xing C, Yin Y, He X, Xie Z. 2006. Effects of insulin-like growth factor 1 on voltage-gated ion channels in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 1072(1):30-35.
- Yagihashi S, Kamijo M, Ido Y, Mirrlees DJ. 1990. Effects of long-term aldose reductase inhibition on development of experimental diabetic neuropathy. Ultrastructural and morphometric studies of sural nerve in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 39(6):690-696.
- Yakar S, Liu JL, Fernandez AM, Wu Y, Schally AV, Frystyk J, Chernausek SD, Mejia W, Le Roith D. 2001. Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes* 50(5):1110-1118.
- Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13):7324-7329.
- Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D. 2002. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 110(6):771-781.
- Yamagishi S, Matsumoto T, Yokomaku D, Hatanaka H, Shimoke K, Yamada M, Ikeuchi T. 2003. Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 119(2):184-191.
- Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R. 2003. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 69(4):229-285.
- Yuan J, Yankner BA. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407(6805):802-809.
- Zhong J, Deng J, Huang S, Yang X, Lee WH. 2004. High K<sup>+</sup> and IGF-1 protect cerebellar granule neurons via distinct signaling pathways. *J Neurosci Res* 75(6):794-806.
- Zhong J, Deng J, Phan J, Dlouhy S, Wu H, Yao W, Ye P, D'Ercole AJ, Lee WH. 2005. Insulin-like growth factor-I protects granule neurons from apoptosis and improves ataxia in weaver mice. *J Neurosci Res* 80(4):481-490.
- Zhou FC, Tao-Cheng JH, Segu L, Patel T, Wang Y. 1998. Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res* 805(1-2):241-254.
- Zlokovic BV, Jovanovic S, Miao W, Samara S, Verma S, Farrell CL. 2000. Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology* 141(4):1434-1441.