

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

"PAPEL DEL IGF-I EN LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL DEL GIRO DENTADO DE RATA POSTERIOR A UNA LESIÓN EXCITOTÓXICA"

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA: ADHEMAR JOSÉ LIQUITAYA MONTIEL

TUTORA: DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE 2012



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

I.	Resumen	. 4	
II.	Introducción	. 5	
III.	La Plasticidad Nerviosa	. 6	
IV.	El Aprendizaje y la Memoria.	. 7	
v.	Memoria contextual	. 8	
VI.	La Plasticidad Nerviosa permite la formación de la Memoria	. 9	
VII.	Plasticidad Sináptica: Potenciación y Depresión a Largo Plazo	. 9	
VIII.	Remodelación Sináptica	10	
IX.	La Neurogénesis Adulta	12	
х.	Posible papel de la neurogénesis en la reparación del sistema nervioso	13	
XI.	El Giro Dentado como modelo de estudio	14	
XII.	Ácido Kaínico como modelo de lesión excitotóxica	15	
XIII.	Moléculas que modulan mecanismos de reparación en el Sistema Nervioso	16	
XIV.	El IGF-I modula la plasticidad neuronal y de respuesta a un daño	17	
xv.	Efectos del Factor de Crecimiento similar a Insulina I (IGF-I)	18	
XVI.	Efectos de las señales de IGF-I en los mecanismos de plasticidad.	19	
XVII	Justificación	21	
XVII	I. Objetivo general	21	
XIX.	Objetivos particulares	21	
XX.	Hipótesis	22	
XXI.	Diseño Experimental	22	
XXII. Metodología			
i.	Sujetos	23	
ii.	Cirugías	23	
iii	. Campo abierto	23	

iv.	Condicionamiento Aversivo Contextual	. 24
v.	Condicionamiento aversivo	. 25
vi.	Infusión crónica de IGF-I	. 25
vii.	Tinción de Nissl	. 27
viii.	Inmunohistoquímica	. 27
ix.	Análisis del Volumen de lesión	. 28
х.	Análisis estadístico	. 28
XXIII. I	Resultados	. 29
i.	Lesión debido a la infusión unilateral de Ácido Kaínico	. 29
ii.	La lesión con ácido kaínico no modifica el aprendizaje de los sujetos	. 30
iii.	La memoria independiente del GD no cambia como resultado de la lesión	. 31
iv.	El suministro crónico del IGF-I potencia la recuperación funcional del GD.	. 32
v.	Reorganización Anatómica del Giro Dentado	. 33
XXIV.	Discusión	. 34
xxv. c	Conclusiones	. 37
XXVI.	Referencias	. 38
XXVII.	Anexo: Artículo de Investigación	.43

I. Resumen

El cerebro de animales vertebrados tiene la capacidad de responder ante un daño activando distintos procesos que pueden mediar su reparación y, posiblemente, permitir recuperar la función asociada a la zona lesionada. Dichos procesos son regulados por moléculas tales como los factores de crecimiento (FC). El factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I) modula distintas etapas del desarrollo neuronal como la proliferación, diferenciación, polaridad y el crecimiento axonal, lo que sugiere que podría regular mecanismos celulares que ocurren en respuesta a una lesión en el cerebro. En el presente trabajo evaluamos el efecto del IGF-I sobre la recuperación funcional y reorganización anatómica del giro dentado (GD) del hipocampo de ratas adultas después de producirle una lesión. Se eligió al GD porque es una estructura fundamental para la formación de la memoria contextual, lo que permitió evaluar una función específica, y es una región nerviosa altamente plástica, lo que permitió evaluar la participación del IGF-I en la modulación de mecanismos de plasticidad de respuesta a un daño. Se produjo una lesión excitotóxica en el giro dentado de ratas inyectando directamente ácido kaínico (AK) ó buffer de fosfatos (PB) como control. 4 días posteriores a la lesión se colocó a los animales en una cámara de condicionamiento (contexto específico) y se administraron descargas eléctricas con el fin de que asociaran el estímulo aversivo con el contexto; esta fase constituyó el condicionamiento aversivo contextual (CAC). Al día 5 posterior al daño se colocó nuevamente a los sujetos en el contexto previo (en ausencia del choque eléctrico) para evaluar la memoria contextual; esta memoria se refleja en la inmovilidad de los sujetos es respuesta al recuerdo de la descarga eléctrica. Al día siguiente se implantó una minibomba osmótica que liberó IGF-I de manera intracerebroventricular ó solución salina como control. Después de 7 días de tratamiento, nuevamente se evaluó la ejecución de los sujetos en la tarea de CAC. Los resultados muestran que los sujetos lesionados con AK perdieron la capacidad de recordar el contexto aversivo en la evaluación que se hizo 5 días después del daño. Sin embargo, 12 días post lesión, los sujetos que recibieron IGF-I mostraron un incremento significativo en la recuperación de la memoria contextual en comparación con los sujetos control, lo que sugiere que el IGF-I promueve la recuperación funcional posterior a una lesión del GD. Para evaluar la reorganización del GD se realizó un estudio histológico y un análisis volumétrico de esta estructura. No se observaron diferencias significativas en cuanto al volumen de la lesión. Estos resultados muestran que el IGF-I promueve la recuperación funcional del GD aun en ausencia de una reorganización estructural y sugieren la posibilidad de que otros mecanismos plásticos subyazcan al proceso. En este documento se anexa el artículo de datos originales producidos durante mi proyecto de maestría.

II. Introducción

A principios del siglo XX se pensó que el sistema nervioso central no sufría cambios durante la etapa adulta. El tratado "Degeneración y Regeneración del sistema nervioso" publicado en 1928 por Santiago Ramón y Cajal, estipuló: "La especialización funcional del cerebro impone a las neuronas dos grandes lagunas: incapacidad de proliferación e irreversibilidad de la diferenciación intraprotoplasmática. Es por esta razón que una vez terminado el desarrollo, las fuentes de crecimiento y regeneración de los axones y dendritas se secan irrevocablemente. En los cerebros adultos las vías nerviosas son algo fijo, terminado, inmutable. Todo puede morir, nada puede regenerarse. Corresponde a la ciencia del futuro cambiar, si es posible, este severo decreto".

Los estudios realizados durante 83 años subsecuentes a la teoría de Cajal han demostrado que después del nacimiento y a lo largo de la vida de un individuo, también ocurren cambios en el sistema nervioso que permiten la adecuación de este a distintas condiciones, y a ésta propiedad se le denomina "Plasticidad Nerviosa", término acuñado por Jerzy Konorsky en 1948 [1].

La plasticidad nerviosa es una propiedad de animales vertebrados y es la capacidad del sistema nervioso de sufrir modificaciones y que subyace a procesos como el aprendizaje, la memoria, la adquisición del lenguaje y la adaptación ante un daño, entre otros. Esta capacidad permite mediar la reparación de estructuras cerebrales lesionadas así como

5

promover la recuperación de las funciones asociadas a dichas zonas, tema de interés en el presente trabajo.

III. La Plasticidad Nerviosa

Durante el desarrollo embrionario del mamífero ocurren una serie de eventos desde la generación de nuevas neuronas, hasta la formación de circuitos neuronales y la afinación de los mismos. Dichos eventos perduran durante el proceso de maduración cerebral y disminuyen con el paso del tiempo. Sin embargo, ante situaciones específicas, como ocurre en un proceso de daño periférico o central, los circuitos preexistentes pueden sufrir una desestructuración inicial, seguida de un proceso de reorganización mayor.

En 1965, David Hubel y Torsten Wiesel, estudiaron el efecto de la falta de estimulación de la corteza visual en gatos recién nacidos. Observaron que tras cerrar los parpados de uno o ambos ojos de los sujetos, en un periodo de 2-3 semanas después del nacimiento, había una disminución en el número de células de la corteza visual y en el número de conexiones sinápticas, y esto era prácticamente irreversible aunque abrieran los parpados nuevamente. Determinaron que la falta de actividad de la corteza visual desencadena dichos cambios [2] y de ésta manera se comenzó a entender que el sistema nervioso central se adapta en función de su actividad después del nacimiento.

Diversas condiciones, como realizar ejercicio, ejecutar tareas cognitivas, desarrollarse en un ambiente enriquecido, e inclusive un daño en el sistema nervioso, son experiencias que modifican tanto la estructura, como la función neuronal de un individuo, lo que se traduce en cambios a nivel molecular, morfológico y fisiológico, que modifican la estabilidad, fuerza y estructura de los circuitos neuronales.

Los procesos que subyacen los cambios en el sistema nervioso central y que dan origen a la reorganización del sistema pueden ser: modificación sináptica, reparación de células dañadas, generación de nuevas células, cambio en el patrón de expresión o secreción de moléculas moduladoras, crecimiento axonal, dendrítico, ó de espinas dendríticas, angiogénesis, y re-integración de una red neuronal [3]. Estos procesos son activados por las señales de distintas moléculas tales como factores neurotróficos, neurotransmisores, e incluso citocinas. De la plasticidad nerviosa depende el funcionamiento del sistema nervioso, como la adquisición, la integración y el almacenamiento de información. Además, posterior a un evento de daño cerebral, la plasticidad nerviosa le permite al sistema nervioso regenerarse ó reorganizarse. Distintos trabajos donde se induce una lesión cerebral debido a un infarto o isquemia en capas corticales de simios, ratas ó ratones, muestran que posterior a la lesión y la consecuente pérdida de la función asociada a la zona lesionada, ocurre una reorganización en los mapas corticales de manera espacio temporal [4-5], las células remanentes en la lesión se vuelven hiperexcitables, aumenta la actividad en la penumbra y en las estructuras aledañas a la zona lesionada, y esto se puede modular con ejercicios de rehabilitación [6-8]. Esto resulta en un mecanismo compensatorio que puede promover la recuperación parcial o total de la función perdida debido al daño cerebral en función del tiempo. Debido a que en este trabajo se abordará la plasticidad del GD, una estructura fuertemente asociada a procesos de memoria, en la siguiente sección se ahondará en la descripción de este proceso cognoscitivo.

IV. El Aprendizaje y la Memoria.

Una de las funciones del sistema nervioso central es la de almacenar información durante periodos de tiempo finitos, desde segundos hasta días o meses; el proceso de adquisición de dicha información se denomina aprendizaje, y la capacidad de almacenarla y evocarla se denomina memoria.

El aprendizaje puede ser asociativo y no asociativo, el no asociativo sucede cuando un individuo es expuesto a un estímulo único, una vez o en repetidas ocasiones, y éste puede habituarse al estimulo, erradicando una respuesta inicial, o sensibilizarse, adquiriendo una

7

respuesta que al inicio no ocurría. El aprendizaje asociativo ocurre cuando un sujeto es expuesto a un estímulo que no genera una respuesta inicial particular (estímulo condicionado, p.e. luz, sonido), y a su vez a un estímulo que genera una respuesta innata (estímulo incondicionado, p.e. comida, descarga eléctrica), produciendo la asociación de ambos estímulos, y provocando que posteriormente (si es almacenado en la memoria) la respuesta innata suceda ante el estímulo condicionado, éste proceso experimental recibe el nombre de condicionamiento clásico.

La memoria puede analizarse, dependiendo del tipo de información almacenada, como reflexiva y declarativa. Es reflexiva cuando al evocar la información el individuo no necesita concientizar el proceso, p.e. actividades motoras, procedimientos y reglas gramaticales, etc. La memoria es declarativa cuando necesita de procesos como la evaluación, comparación, e inferencia de la información al momento de recordarla [9]. Una forma de memoria reflexiva es la memoria contextual y dado a que en el presente trabajo se evaluará esta memoria como el parámetro de funcionalidad, conceptualizaremos éste tipo de memoria a continuación.

V. Memoria contextual

La memoria contextual es el proceso en el cual un contexto facilita la evocación de un recuerdo, debido a que ésta información ocurrió en dicho contexto y fue asociada a él [10]. Se ha descrito que ésta memoria se puede evaluar experimentalmente en roedores a través de un condicionamiento aversivo contextual, en el cual, el sujeto se coloca en un contexto (caja de entrenamiento) y se administra un estímulo aversivo (descarga eléctrica en las patas de los sujetos), induciendo la asociación entre ambos. Cuando el sujeto se coloca nuevamente en el contexto asociado, recuerda el estímulo aversivo, lo que provoca miedo y congelamiento en el sujeto. La inmovilidad de los sujetos se puede utilizar como un parámetro para evaluar la memoria de los sujetos. Se requiere que cada sujeto se familiarice con el contexto tiempo suficiente (>2 min) para que este asocie y posteriormente recuerde sus características [11].

VI. La Plasticidad Nerviosa permite la formación de la Memoria

La formación de la memoria ocurre en etapas y ésta cambia constantemente; la memoria de largo plazo necesita cambios físicos en el cerebro, y éstos se pueden dar en distintas regiones; además la memoria declarativa y la memoria reflexiva involucran diferentes circuitos neuronales. Los cambios físicos mencionados son alusivos a la plasticidad nerviosa. Bruel-Jungerman et al. (2007), describen 4 mecanismos plásticos que han sido estudiados en relación a la formación de memorias en sus diversas etapas: La potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés), la depresión a largo plazo (LTD por sus siglas en inglés), la remodelación sináptica, y la generación de nuevas neuronas [12].

VII. Plasticidad Sináptica: Potenciación y Depresión a Largo Plazo

La potenciación a largo plazo, ha sido el mecanismo más relacionado con la formación de memorias. Consiste en el incremento en la respuesta de una neurona post-sináptica debido a la constante y repetida estimulación por parte de la neurona pre-sináptica. Por la prolongada duración de la potenciación a largo plazo (de semanas a meses) y a que ocurre de manera concomitante a la adquisición de información, éste se considera el proceso que subyace la formación de aprendizaje y memoria [12]. Además se ha observado que cuando se inhiben los mecanismos moleculares que permiten la potenciación a largo plazo, como la inhibición farmacológica o genética de canales glutamatérgicos tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), la formación de memoria es deficiente. De igual manera la activación de cinasas (PKC, PKA, TyrK, CaMKII, PI3K, MAPK/ERK) en el proceso de potenciación a largo plazo está involucrada en el aprendizaje asociativo y la formación de la memoria [13].

La depresión a largo plazo (LTD) es el mecanismo en el cual la respuesta de una neurona post-sináptica disminuye debido a la estimulación de baja frecuencia por parte de una neurona pre-sináptica a una post-sináptica activa (LTD homosináptica), ó debido a la

9

estimulación de alta frecuencia de una neurona post-sináptica inactiva (LTD heterosináptica) [14].

Éste fenómeno puede explicarse debido a la endocitosis de los receptores de neurotransmisores en la neurona post-sináptica [15]. La depresión a largo plazo está involucrada con la formación de memoria en el Hipocampo, como mostraron múltiples experimentos donde se bloqueó la LTD (ratones transgénicos: knockout de GluN2B, inhibición de calcineurina, ó inhibición de la fosfatasa de Serinas/Treoninas 2A) y se observaron deficiencias en la ejecución de tareas de memoria dependientes de hipocampo [16].

Tanto la potenciación como la depresión a largo plazo, son procesos relacionados con la funcionalidad de la memoria en el Hipocampo, y ambas son reversibles.

VIII. Remodelación Sináptica

La remodelación sináptica consiste en la formación de nuevas conexiones entre neuronas del cerebro adulto. La sinaptogénesis, que comienza en el desarrollo embrionario y continúa después del nacimiento duplicándose cada día durante los primeros días postnatales [17], puede ocurrir de manera natural en el SNC de los organismos adultos y se piensa que contribuye a la formación de memoria y al aprendizaje [18].

La sinaptogénesis permite el establecimiento de los circuitos neuronales. Poco después de que las neuronas se diferencian y extienden sus procesos axonales y dendríticos, diversos genes que codifican proteínas propias de la sinapsis se expresan, resultando en la formación, acumulación y tráfico dirigido de vesículas que transportan complejos proteicos característicos de la pre ó la post-sinapsis, según sea el caso. Los axones y dendritas hacen contacto, la expresión y localización de factores secretados, moléculas señalizadoras y moléculas de adhesión modulan la correcta conexión entre las neuronas, y el posterior reclutamiento de receptores de neurotransmisores en la post-sinapsis. Este proceso requiere de eventos coordinados entre células como la competencia, ubicación, composición y tamaño culminando en la estabilidad de las sinapsis funcionales [19].

10

En el adulto, la sinaptogénesis ocurre en respuesta a procesos de aprendizaje, pero también como una respuesta compensatoria a la denervación. Los axones rebrotan y establecen nuevas sinapsis que ocupan los espacios disponibles. La estabilidad sináptica depende de la actividad neuronal, así, se han observado incrementos en el número de espinas dendríticas y sinapsis cuando sujetos se exponen a un ambiente enriquecido, y cambios en las conexiones sinápticas en sujetos sometidos a ciertos paradigmas de memoria como el incremento en la densidad de espinas dendríticas en amígdala posterior a un condicionamiento aversivo clásico [20].

Experimentalmente, se ha observado que roedores que ejecutan diversas tareas de aprendizaje presentan cambios morfológicos en las sinapsis existentes [21]. Estos cambios pueden ser en la curvatura de la sinapsis, en el volumen de las espinas, en la longitud sináptica, la aparición de múltiples botones sinápticos en el que una pre-sinapsis terminal contacta a varias espinas post-sinápticas, entre otros [12].

El trabajo de Briones et al. (2004, 2006), Indica que una lesión en el hipocampo de ratas promueve la sinaptogénesis y plasticidad dendrítica en la zona circundante al daño, y ocurre un incremento en dichos procesos si los sujetos son expuestos a un ambiente enriquecido. Además observan como dichos cambios acompañan a la recuperación de la memoria espacial, perdida en sujetos lesionados [22-23].

En conjunto los trabajos anteriores indican que la formación de nuevas sinapsis así como la modificación dendrítica no solo son mecanismos que permiten funciones como la memoria y el aprendizaje, sino también permiten la compensación de la pérdida de dichas funciones a causa de un daño.

IX. La Neurogénesis Adulta

Como se mencionó, a principios del siglo XX, Santiago Ramón y Cajal además de los múltiples estudios morfológicos de las células del sistema nervioso, postuló que el nacimiento de nuevas neuronas no sucedía en la etapa adulta. Durante las siguientes décadas se mantuvo la creencia de que la generación de neuronas ocurría únicamente en etapas tempranas del desarrollo y que en la edad adulta las neuronas no se renovaban. Sin embargo, existe ahora clara evidencia del nacimiento de nuevas neuronas a partir de células pluripotentes en etapas postnatales tanto en roedores [24] como en aves [25] y primates [26] incluyendo al humano [27], conduciendo así los esfuerzos para comprender el posible papel de estas nuevas células en el funcionamiento del sistema nervioso central.

La neurogénesis es un proceso en el cual células precursoras cambian su expresión génica y comprometen su identidad hacia células neuronales. Se pueden diferenciar 3 etapas que preceden a una neurona madura, cada una con una identidad más comprometida que la anterior. Una célula troncal se puede auto-renovar, es altamente proliferativa y potencialmente puede diferenciarse a cualquier tipo de célula de la línea neuroectodermal; una célula progenitora está más restringida en cuanto a los tipos de células que puede originar; y una célula precursora es la etapa inmediata anterior a una célula diferenciada.

En los mamíferos adultos, el proceso de neurogénesis ocurre en zonas localizadas: la zona subventricular (ZSV) de las regiones anteriores de los ventrículos laterales [28] y en la zona subgranular del giro dentado (ZSG) [29]. Las células nuevas de la ZSV migran por medio de la vía rostral migratoria hacia el bulbo olfatorio en donde se diferencian a células glomerulares y periglomerulares [30-31], mientras que en las de la ZSG migran hacia la capa granular del propio giro dentado para formar neuronas granulares [32]. Como parte de su proceso de maduración, dichas neuronas extienden proyecciones axonales hacia la capa de células piramidales de CA3 entre los 4 y 10 días después de la división celular [33], dando así lugar a la posibilidad de que las nuevas células formen parte del circuito trisináptico hipocampal.

Tanto la ZSG, como la ZSV representan microambientes favorables para la proliferación celular, ya que cuentan con la presencia de precursores celulares, y son ricas tanto en interacciones célula-célula, como en factores de difusión (i.e factores neurotróficos) que son elementos clave para permitir la activación de las células progenitoras y su diferenciación [34-35].

Aún cuando la neurogénesis ha sido ampliamente estudiada y descrita en los años recientes, se desconoce si las nuevas células resultan funcionales. Se ha sugerido que las nuevas neuronas pueden estar involucradas en la formación de nuevas memorias y en la consolidación de las mismas [36] así como en procesos de aprendizaje. Existen varios modelos acerca del funcionamiento de las neuronas nuevas. En diversos estudios se ha reportado una relación entre el aprendizaje dependiente giro dentado y el incremento en la generación de nuevas neuronas, sometiendo a ratas a tareas cuyo aprendizaje depende de hipocampo [37-40].

Al respecto, la neurogénesis también se ha postulado como un mecanismo de neuroreparación que media tanto la reestructuración de zonas lesionadas en el cerebro, como la recuperación de funciones alteradas en respuesta a un proceso de daño [41-43].

X. Posible papel de la neurogénesis en la reparación del sistema nervioso

A partir de evidencia experimental que muestra que las neuronas nuevas pueden integrarse a circuitos cerebrales adultos [44-46] se ha planteado la posibilidad de que la neurogénesis promueva procesos de reparación posteriores a una lesión en el sistema nervioso central. Algunos modelos de lesión nerviosa en los que se ha evaluado la inducción de la neurogénesis son la epilepsia [47], la isquemia cerebral [48], la excitotoxicidad [49], y el trauma cerebral [50]. En los diferentes modelos de lesión se ha observado el aumento en la generación de nuevas neuronas en los dos nichos neurogénicos ya mencionados, la ZSV y la ZSG. Además utilizando marcadores de

maduración se ha reportado que las nuevas células se vuelven neuronas maduras, aunque varía su tiempo de supervivencia. Aunque se ha establecido que la neurogénesis se exacerba tanto en la ZSG, como en la ZSV posterior a una lesión, no está determinado hasta qué grado, las nuevas neuronas pueden incorporarse a una red neuronal y contribuir a la recuperación de la función efectuada por la zona lesionada. El estudio realizado por el grupo de Blaiss et al. (2011), sugiere que la neurogénesis juega un papel importante en la recuperación funcional del hipocampo ya que, posterior a una lesión mecánica hipocampal, la ablación específica de la proliferación de progenitores neurales impide la recuperación funcional del hipocampo (que ocurre en sujetos control sin ablación de progenitores neural) observada al evaluar tareas de memoria [51]. Sin embargo la ablación de progenitores neurales no sólo impide la neurogénesis sino también la gliogénesis, por lo que el estudio no determina la función de la neurogénesis en la reparación del hipocampo lesionado.

Así, un campo de estudio importante en el tema de la neuroreparación es la evaluación de factores que no solo potencien la neurogénesis, sino que promuevan la integración de nuevas neuronas a circuitos preestablecidos.

XI. El Giro Dentado como modelo de estudio

El hipocampo es una estructura subcortical cerebral constituida por grupos de células con características fenotípicas y funcionales particulares y se conforma de las regiones CA1, CA3 y el giro dentado (GD). El GD representa una estructura ideal para evaluar la participación de diversos procesos plásticos en la reorganización estructural y funcional posterior a una lesión debido a que:

- 1. Es responsable de una función determinada que es el procesamiento del aprendizaje y memoria, en particular la memoria contextual [52].
- En él ocurre el proceso de neurogénesis de manera constitutiva y un porcentaje de las neuronas que nacen en este nicho se incorporan sinápticamente al GD una vez que han madurado [29, 46].

3. Presenta respuestas plásticas a nivel estructural y molecular ante procesos de aprendizaje y memoria, y como respuesta a un proceso de daño [53-54].

Algunos trabajos han mostrado que el GD tiene la capacidad de reorganizarse morfológicamente después de sufrir una lesión [42-43, 55]. Así, en un modelo de ratas neonatas con el GD lesionado por una infusión de ácido kaínico se observó que la capa celular se reorganiza morfológicamente debido a la incorporación de neuronas nuevas [41]. Además trabajos recientes del laboratorio, en el que se desarrolló la presente tesis, muestran que el GD de la rata joven es una estructura plástica en tanto que puede sufrir una reorganización estructural posterior a una lesión focal que conlleva al restablecimiento de su morfología original [43] y más aun, que dicha reestructuración correlaciona temporalmente con la recuperación conductual y sináptica asociada al GD [55]. Estos datos sugieren que la reestructuración natural de la zona lesionada es un mecanismo plástico que permite recuperar la funcionalidad perdida debido al daño.

XII. Ácido Kaínico como modelo de lesión excitotóxica

A diferencia de modelos de lesión como la epilepsia, el trauma cerebral, y la isquemia, donde la muerte celular es masiva y no localizada, la excitotoxicidad inducida por la inyección intracerebral de Ácido Kaínico, permite tener un modelo donde la lesión es principalmente en el giro dentado y menor en las zonas aledañas.

El Ácido Kaínico (*AK, monohidrato del ácido acético2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidinil*) es un derivado del ácido glutámico, agonista de los receptores tipo AMPA/Kainato que permite la entrada masiva del ion Ca²⁺ por lo que es excitotóxico para las células del hipocampo [56-57].

La administración sistémica de AK en roedores incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, altera funciones mitocondriales e induce muerte celular por vía excitotóxica y apoptótica, particularmente de las neuronas del CA1 y CA3 del hipocampo

15

[58]. Diversos estudios han demostrado que la administración intracerebral de ácido kaínico en el Giro Dentado de ratas adultas induce muerte neuronal por exictotoxicidad [43], y en ratas neonatas, la muerte es de tipo apoptótica [41].

XIII. Moléculas que modulan mecanismos de reparación en el Sistema Nervioso

Los diversos mecanismos de plasticidad neuronal, incluyendo la neurogénesis, están mediados por moléculas tales como factores neurotróficos, neurotrofinas y neurotransmisores, entre otros [59]. En el hipocampo adulto el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) contribuye a la supervivencia de las nuevas neuronas [60]. El VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) está involucrado en la vasculogénesis y la angiogénesis, y estimula tanto la producción de neuronas nuevas como su proliferación [61], mientras que la Eritropoyetina (EPO) estimula la eritropoyesis bajo condiciones de hipoxia, y se le confiere la capacidad de incrementar la neurogénesis en hipocampo y de modular la plasticidad neuronal y conectividad sináptica [62]. En cuanto a la recuperación funcional, el grupo de Nakafuku [63] encontró que tras una lesión isquémica en la región CA1 del hipocampo de ratas adultas, la combinación de los factores EGF y FGF-2 potenciaban la neurogénesis de las células de la ZSG. También observaron que la lesión isquémica producía deficiencias en el proceso de memoria espacial y que la recuperación de esta función correlacionaba con la maduración de nuevas neuronas en el GD, potenciada por la infusión de los factores mencionados. En otro trabajo, se evaluó la cantidad de neuronas nuevas maduras (BrdU+/NeuN+) en un modelo de lesión isquémica en hipocampo de rata por la infusión intracerebroventricular del IGF-I (Insulin-like Growth Factor I) y de GDNF (Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor) de manera independiente. Ambos factores exacerbaron la neurogénesis que ocurre naturalmente en respuesta a una lesión [64]. Si bien estas observaciones indican que la participación de dichos factores tróficos administrados de manera exógena incrementa la neurogénesis, no prueban que este fenómeno esté relacionado con la recuperación de una función perdida por el daño.

16

En la siguiente sección se profundizará en el IGF-I ya que es el factor que evaluaremos en el presente estudio debido a su participación en múltiples procesos plásticos tanto durante el desarrollo, como en etapa postnatal y adulta.

XIV. El IGF-I modula la plasticidad neuronal y de respuesta a un daño

El IGF-I es un péptido inductor del crecimiento, miembro de una familia de hormonas tipo insulina relacionado íntimamente a la insulina en cuanto a secuencia y actividad biológica; durante el desarrollo embrionario, el IGF-I promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia celular [65].

En mamíferos, el IGF-I se produce por todos los órganos del cuerpo sin embargo, a diferencia de lo que ocurre durante el desarrollo en donde se produce de igual manera en cerebro que en hígado, en adultos es el hígado quien lo produce principalmente y se transporta a través del sistema circulatorio hasta el cerebro [66].

Estudios a lo largo de la última década relacionan al IGF-I con la generación de nuevas neuronas. Así, en un estudio *in vivo*, en el que se utilizaron ratones transgénicos que sobre expresan el factor se observó un aumento en la densidad neuronal en el giro dentado y en la formación de sinapsis en diferentes etapas postnatales [67]. El grupo de Eriksson estudió el papel del IGF-I en la neurogénesis inyectándolo de manera sistémica en ratas adultas y reportó un incremento específico en la proliferación y diferenciación neuronal en la capa granular del GD de los sujetos a los que se les inyectó el factor [68]. Así mismo Lai et al. (2000), realizaron un estudio donde reportan que ratas de edad avanzada tienen una expresión disminuida de el mRNA de IGF-I lo cual llama la atención pues se ha observado que conforme se incrementa la edad, la neurogénesis disminuye, sugiriendo una correlación entre el decremento del factor de crecimiento y de la neurogénesis en la etapa adulta [69]. Además en un modelo de lesión isquémica en hipocampo de ratas, se observó que la inhibición de IGF-I mediante un anticuerpo que lo bloquea, produce un

decremento en el número de nuevas neuronas inducidas por la lesión [70], lo que sugiere al IGF-I como un modulador en respuesta a un daño cerebral. En otro modelo de lesión, un daño citotóxico ocasionado por la infusión en el hipocampo de colchicina, se observó un incremento en la expresión del RNA mensajero de IGF-I al mismo tiempo que la reestructuración del GD en ratas adultas [71]. Así, debido a que la expresión de IGF-I aumenta como consecuencia de un proceso de daño y a que su administración exógena correlaciona con la neurogénesis, resulta razonable sugerir que los efectos de este factor están relacionados no solo con la protección si no con eventos de reparación nerviosa. Sin embargo, aun no se ha evaluado el efecto del factor sobre la recuperación funcional en ratas adultas y su posible relación con la re-estructuración morfológica de la zona dañada.

XV. Efectos del Factor de Crecimiento similar a Insulina I (IGF-I)

El IGF-I en adulto se puede producir en todas las células del organismo, y de manera prominente en las células hepáticas. El factor secretado se traslada por la circulación para llegar al tejido blanco y es acarreado por proteínas de unión específicas denominadas IGFBP's. Se conocen 6 proteínas pertenecientes a la familia de las IGFBP's (IGFBP1-6), éstas no solo permiten la estabilidad del IGF-I sino también regulan su degradación y el paso de éste a través de la barrera hematoencefálica lo cual puede promover los efectos del factor en el sistema nervioso central [72]. Tanto el IGF-I como su receptor se expresan en diversas estructuras del cerebro en el adulto, incluyendo el hipocampo [73-74]. Sin embargo, aunque la expresión de IGF-I disminuye con la edad, la expresión de su receptor (IGF-IR) no es dependiente del envejecimiento, lo cual mantiene el potencial de respuesta del Sistema Nervioso ante dicho factor ya sea sistémico, exógeno, o secretado por astrocitos. El IGF-IR es una proteína de membrana y está formada por dos heterodímeros cada uno a su vez constituido por una subunidad α que es extracelular y se une al IGF-I y una β que es intracelular [75] y tiene actividad de cinasa de tirosina [76]. Este receptor se une con alta afinidad al IGF-I y con menor al IGF-II y a la insulina [77]. Cuando el IGF-I se

une a su receptor, se forma el heterotetrámero y activa a las subunidades β fosforilándolas en tres residuos de tirosina, lo que produce la posible activación de dos vías de señalización, la vía PI3k/AKT y la vía MAPK, involucradas en los diversos procesos mencionados previamente.

XVI. Efectos de las señales de IGF-I en los mecanismos de plasticidad.

Si bien las vías de señalización PI3K y MAPK median los diversos efectos del IGF-I en el sistema nervioso, distintos resultados sugieren una mayor contribución por parte de la vía PI3K en la regulación de los procesos de plasticidad inducidos por el IGF-I, en particular sobre la modulación de diversas etapas de la diferenciación e integración neuronal.

El grupo de Otaegi (2006) mostró en cultivos de células precursoras neurales obtenidos de ratones knockout para IGF-I que las señales de este factor, a través de la activación de la vía PI3K, regulan la proliferación y diferenciación neuronal. También en este estudio se emplearon cultivos de células de ratón tipo silvestre que sobre expresan la proteína PTEN (inhibidor de la vía PI3K), y cultivos incubados con LY294002 (inhibidor farmacológico de PI3K) y se observó que tanto la proliferación celular, como la diferenciación se bloqueaba cuando no había IGF-I basal y cuando se inhibía la vía de señalización PI3K. Los autores reportaron además que aumentaba la muerte celular y que estos fenómenos no dependían de la vía MAPK, ya que al evaluar a ERK1 no se encontraron cambios en su activación en el cultivo de células provenientes de los knockout para IGF-I [78].

Una vez diferenciadas, la sobrevivencia de las neuronas también depende de las señales de IGF-I a través de la vía PI3K. Zheng, et al. (2002) mostraron en cultivos de neuronas hipocampales de rata que la activación de AKT inhibe al factor de transcripción pro-apoptótico FKHRL1, promoviendo así la sobrevivencia neuronal. Además este evento no depende de la vía MAPK, ya que al utilizar un inhibidor farmacológico específico para MEK (PD98059) no se observaron cambios en la sobrevivencia [79].Posterior al comienzo de la diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario, las proyecciones de las células

19

nerviosas comienzan a extenderse y las dendritas se diferencian del axón estableciendo así la polaridad de las neuritas. El grupo de Quiroga ha evaluado la participación del IGF-I en éste proceso, y reportó que la señalización de éste factor a través del IGF-IR es indispensable para que se determine la polaridad de neuronas hipocampales de rata, concluyendo además que ante la inhibición del IGF-IR con un RNA de interferencia (y la consecuente falta de polaridad) PI3K activa se localiza en el soma a diferencia del control positivo para IGF-IR, donde PI3K activa se localiza a lo largo del axón, principalmente en la terminal [80]. Este mismo grupo determinó que el crecimiento de la membrana axonal dependía directamente de la activación de la vía PI3K/AKT por el IGF-I utilizando inhibidores farmacológicos de PI3K (wortmanina y LY294002) [81].

En conjunto, estos trabajos muestran como el IGF-I y la señalización por la vía PI3K/AKT, pero no por la vía MAPK modula las diferentes etapas de la maduración neuronal *in vitro:* proliferación, diferenciación, determinación de la polaridad neuronal, crecimiento axónico y sobrevivencia neuronal, así como la neurogénesis*in vivo*, que como he mencionado, se induce por distintas condiciones en el adulto. La neurogénesis inducida por ejercicio en ratas adultas está regulada en parte por el IGF-I, ya que al bloquear su función en ratas ejercitadas ésta disminuye al nivel de ratas sedentarias [82] y de manera interesante el grupo de Bruel-Jungerman realizó experimentos similares en los que inhibían específicamente la actividad de PI3K administrando LY294002 en ratas ejercitadas y encontraron un decremento en la neurogénesis respecto a las ratas sin el inhibidor, además observaron que no había cambios en la fosforilación de ERK [83]. Estos experimentos junto con los realizados *in vitro* indican que el IGF-I está mediando la proliferación, diferenciación y maduración neuronal a través de la vía PI3K/AKT y no mediante la vía MAPK.

Por lo anterior y debido a que el Giro Dentado del hipocampo de rata es un nicho neurogénico, cuya función está fuertemente asociada a la modulación de los procesos de memoria y aprendizaje, decidimos utilizarlo como modelo para evaluar la neurogénesis como un mecanismo de plasticidad que pudiera mediar la recuperación de funciones alteradas por una lesión focal. En particular, en este proyecto se evaluó la pérdida de la

20

memoria contextual (propia del GD) como resultado de una lesión excitotóxica focal y la posible reorganización de la misma como consecuencia de la infusión de IGF-I.

XVII. Justificación

Debido a que el IGF-I modula distintos procesos de plasticidad nerviosa, entre ellos la proliferación, el establecimiento de polaridad y la maduración neuronal, en el presente trabajo se decidió evaluar el papel el factor como mediador de la recuperación funcional del Giro Dentado posterior a una lesión a esta estructura y el posible restablecimiento de la morfología de dicha estructura.

XVIII. Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración crónica intracerebroventricular (ICV) del Factor de Crecimiento tipo Insulina I (IGF-I) en la recuperación funcional del Giro Dentado posterior a un proceso de lesión excitotóxica y la repercusión que dicho factor pueda tener sobre el restablecimiento morfológico del mismo.

XIX. Objetivos particulares

Evaluar la recuperación funcional de la memoria aversiva contextual, alterada a partir la lesión focal del GD, mediante técnicas de evaluación conductual en ausencia y presencia de IGF-I administrado por medio de mini bombas osmóticas (de manera crónica e ICV).

Analizar la repercusión de la administración de IGF-I en la integridad morfológica del giro dentado posterior a la lesión focal.

XX. Hipótesis

Debido a las diversas funciones atribuidas al IGF-I como regulador de la diferenciación, proliferación y la promoción de la supervivencia neuronal, aunado a su participación en la modulación de la plasticidad neuronal y a la participación del IGF-I R en la determinación de la polaridad neuronal, se propone que el IGF-I potenciará la recuperación funcional del Giro Dentado y la regeneración de la capa granular de este posterior a una lesión excitotóxica.

XXI. Diseño Experimental



Figura 1. Cronograma de metodología conductual. Arriba se muestran los procedimientos experimentales para la evaluación funcional del giro dentado; abajo se muestran los días que corresponden a cada procedimiento. CAC condicionamiento aversivo contextual.

XXII. Metodología

i. Sujetos

Se emplearon 38 ratas adultas machos de la cepa Wistar, de aproximadamente 3 meses de edad, y con peso 250 a 350g, sometidos a un ciclo invertido de 12 h luz/12 h oscuridad con acceso libre a comida y agua.

ii. Cirugías

Los animales se anestesiaron con 2% Isofluorano en una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ y se montaron en un aparato estereotáxico (Stoelting Co). A los sujetos experimentales se les infundió unilateralmente en el giro dentado (GD) 1 µl de una solución con 0.75nmoles de Ácido Kaínico (AK) (Sigma Aldrich, Chemie) disuelto en amortiguador de fosfatos (PB) 10mM a una velocidad de 1µl/min; a los sujetos control se les infundió 1µl de amortiguador de fosfatos (PB) 10mM. La infusión se realizó con base a las coordenadas: AP -3.8, ML -2.4 y DV -3.5 a partir de bregma (Paxinos y Watson, 1986) por medio de una jeringa Hamilton de 10µl controlada por un inyector automático (Stoelting Co). Para preparar el AK, éste se disolvió en 50µl de NaOH 1N y PB 10mM (950µl) con un pH de 7.2; el pH de la solución se fijó con HCl 1N a 7.0-7.5.Una vez recuperadas de la cirugía, los sujetos regresaron a sus cajas habitación y al día siguiente se inició el procedimiento conductual.

iii. Campo abierto

Debido a que las tareas en la que se evaluó la funcionalidad del GD implican ausencia de movimiento en los sujetos, se empleó la tarea de campo abierto como control, ya que evalúa conducta motora e interés por explorar. Para ello, se colocó a los sujetos en el centro de una caja negra (80cm largo X 80cm ancho X 30cm alto) dividida en 4 cuadrantes (20X20 cm) y el experimentador registró cuantos cuadrantes visitaba durante 4 min. Debido a que la conducta de exploración es innata en los roedores, esta tarea permite asegurar que la ausencia de movimiento en las evaluaciones de memoria no se debe a un déficit motor o de motivación.

iv. Condicionamiento Aversivo Contextual

Para evaluar el éxito de la lesión, se entrenó a los sujetos en la tarea de aversión contextual (CAC), propia del GD, para ello usamos una cámara de condicionamiento (San Diego Instruments, 25cm largo X 25cm ancho X 25cm alto) dentro de un cuarto oscuro aislado de ruidos para minimizar los estímulos externos. La cámara contiene un arreglo de rayos infrarojos (16X16) 2 cm arriba del suelo que permite registrar el movimiento del sujeto por medio de la interrupción de los rayos. La caja contiene además un dispositivo generador de sonido (estímulo neutro) y uno generador de choques eléctricos (estímulo aversivo) a través del piso metálico. Éste sistema está conectado y dirigido por una computadora a través del programa *Freeze Monitor* (San Diego Instruments).

Cada sujeto se colocó en la caja de entrenamiento y se evaluó su movimiento en intervalos de 5 seg. Durante los primeros 2 min se evaluó el movimiento basal del sujeto, posteriormente se produjo un sonido (80 dB, 2Khz) durante 20 seg, los últimos 2 seg se administró una descarga eléctrica (1mA) y se evaluó el movimiento durante 2 min Este proceso, que constituye la fase de *condicionamiento* se repitió 5 veces durante una sesión que duró 21 min.

24 hrs después se evaluó la memoria aversiva cotextual (MAC): Se colocó a cada sujeto en el contexto de condicionamiento durante 3 min. y se evaluó el tiempo que el sujeto permaneció inmóvil en ausencia de sonido y choque. La inmovilidad constituye la respuesta incondicionada y refleja la memoria del sujeto al contexto aversivo. Los sujetos con el GD lesionado no recuerdan el contexto como aversivo y presentan más movimiento que los sujetos con el GD intacto. Cabe mencionar que solo aquellos sujetos sujetos infundidos

24

con AK que presentaron pérdida de la MAC (n=20) se incluyeron para la posterior evaluación de la recuperación funcional.

Los resultados están reportados como el porcentaje de tiempo en el que los sujetos permanecieron inmóviles respecto al tiempo total de las tareas.

v. Condicionamiento aversivo

Con el objeto de valorar la especificidad de la lesión al GD en tareas de memoria, se llevó a cabo la evaluación de la memoria aversiva en todos los sujetos. Esta tarea depende en particular de la amígdala. Dos horas después de la evaluación de la MAC, se introdujo al sujeto en la misma caja de condicionamiento, aunque modificada sustancialmente ya que las paredes de acrílico se forraron por fuera con un patrón visual de barras blancas y negras, el piso de barras metálicas se cambió por uno de acrílico blanco, se introdujo una separación dentro de la caja lo que resulta en que esta adquiriera una conformación triangular y se introdujo una bola de algodón con esencia de cereza. En el nuevo contexto se registró el movimiento del sujeto durante 2 min. y posteriormente se presentó el sonido (80dB, 2KHz) durante 20 segundos, esta vez sin el estímulo aversivo. Se evaluó el movimiento del sujeto durante los 2 min siguientes a la presentación del sonido y el procedimiento se repitió una vez más. Dado que la ejecución en esta tarea no depende del GD, se esperaba que los sujetos lesionados recordaran el estímulo sonoro asociado al estímulo aversivo y por tanto desplegaran la conducta de inmovilidad.

vi. Infusión crónica de IGF-I

Para administrar un polipéptido en el Sistema Nervioso Central tuvimos que considerar diversos factores que modulan la eficiencia con la que éste llega a las células blanco.

La inyección sistémica de una hormona, como el IGF-I, tiene varias limitantes a considerar:

1. La concentración inicial del IGF-I disminuye al inyectarse directamente al torrente sanguíneo y más aún si es de manera intra-peritoneal.

 Al ser una molécula de 7 kDa la molécula no difunde libremente a través de la barrera hemato-encefálica, al contrario, el transporte es finamente regulado y en consecuencia hay un segundo decremento en la concentración.

Debido a esto decidimos infundir directamente el IGF-I de manera intracerebroventricular (i.c.v.), por medio de minibomas osmóticas, que además liberaron la hormona de manera crónica por 7 días, lo que permitió evaluar la funcionalidad continua del IGF-I sobre las células del GD (nuevas o remanentes) en diferentes etapas de un proceso de reparación.

Para determinar la cantidad de IGF-I colocado en las bombas realicé una búsqueda en la literatura donde se hubiera realizado la infusión crónica i.c.v. del IGF-I y se observara un efecto de éste en la plasticidad neuronal, y encontramos reiteradamente la cantidad infundida de 50ng/hr [84-87], por lo que utilizamos ésta dosis en nuestros experimentos.

Así, la infusión del IGF-I se llevó a cabo mediante minibombas osmóticas (Alzet, 2001) que contenían 233±10 μl de una solución con 50ng de IGF-I (recombinant IGF-I; Sigma Aldrich, Chemie) diluido en solución salina (0.9%NaCl). Las minibombas se implantaron de manera subcutánea en el lomo de los sujetos y se conectaron a la cánula de infusión cerebral por medio de un catéter de 5 cm. La cánula de infusión se colocó en el ventrículo lateral izquierdo, con base a las coordenadas: AP -0.8, DV -3.5, Lat. -1.4 a partir de bregma. El grupo control lo constituyó sujetos lesionados con AK a los que se les colocó, 12 días posteriores a la lesión, una minibomba que contenía solución salina (0.9%NaCl). 7 días posteriores al implante, las bombas se removieron y se llevó a cabo el procedimiento de condicionamiento y la evaluación de la recuperación funcional de la MAC, así como la valoración de la memoria aversiva que consistieron en el protocolo descrito previamente. Una vez concluida la evaluación conductual, se sacrificó a los sujetos y algunos animales se perfundieron para procesar el tejido con tinción de Nissl (n=4), e inmunohistoquímica contra el actor nuclear NeuN, mientras que otros cerebros (n=3) se extrajeron para realizar la cuantificación de proteínas por medio de electroforesis.

vii. Tinción de Nissl

Para evaluar la integridad anatómica del GD en los diferentes grupos, posterior al día 12 post-lesión se les inyectó a los sujetos 1 ml de pentobarbital sódico y seperfundieroncon 300 ml de solución salina (0.9% NaCl) y 300 ml de para-formaldehído (0.4% PFA). El cerebro se extrajo y se colocó por 24 hrs. en 0.4% PFA y después en PB 0.1 M con sacarosa $(C_{12}H_{22}O_{11}$ 15%, 24 hrs, 30% 48 hrs aprox.). Se hicieron cortes coronales de los cerebros perfundidos de 30 µm de grosor en un criostato (Leica) a -20°C. Se colocaron en un portaobjetos gelatinizado y se realizó la deshidratación del tejido colocándolos en etanol al 70% (2 min), 90% (2 min) y 100% (2 min), posteriormente se introdujo a los cortes en una solución de 0.1 % violeta de cresilo (2-4 min) y por último en Xileno 100%.

viii. Inmunohistoquímica

Secciones seriadas de cerebro de 30 µm de grosor se lavaron en PBS-Triton (0.3% Triton) 3 veces por 10 minutos y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas en solución de bloqueo con 3% de suero de caballo (1:25; Vector Laboratories) y 3% de suero de albumnia bovino (BSA) (Sigma Aldrich) diluidos en 0.3% PBS-T (Bio-Rad). Después se incubaron a 4°C toda la noche con anti-NeuN de ratón (1:400, Sigma) diluido en solución de bloqueo. Los cortes se lavaron 3 veces por 10 minutos con PBS y después se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo Alexa Fluor 488 anti-ratón (Invitrogen), diluido en solución de bloqueo. Las secciones se montaron en portaobjetos de vidrio y se cubrieron con cubreobjetos adherido con medio de montaje 1, 4-diazabicyclo octane solution (DABCO, Sigma). Los cortes utilizados como control tuvieron el mismo tratamiento sin añadir anticuerpo primario.

ix. Análisis del Volumen de lesión

Todas las secciones NeuN+ que contenían regiones carentes de células en el giro dentado se usaron para calcular el volumen de la lesión. Se utilizaron secciones (30 µm de grosor) separadas por 120 µm. Las series se capturaron utilizando una cámara digital (Carl Zeiss, AxioCam MRc) adaptada a un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss, Axioskop 40). El área de la lesión en cada sección procesada para NeuN+ se estimó utilizando el software Image-Pro 3D Suite (media Cybernetics inc.) y el volumen total de la lesión fue calculado a través de la siguiente ecuación:

$$Vol = \sum_{i=1}^{n} [(As)(T) + (As)(K)]$$

Vol: volumen; n: número total de cortes; As: Área de lesión en una sección NeuN+; T: grosor de la sección; K: Grosor de separación.Los estimados se realizaron para cada sujeto y se calculó la media ± ES. Las diferencias estadísticas se analizaron utilizando la prueba t de student no pareada.

x. Análisis estadístico

El análisis de los datos así como la representación en gráficas se realizaron con la herramienta computacional *GraphPad Prism 5.00.288* (GraphPad Software, Inc.).

XXIII. Resultados

i. Lesión debido a la infusión unilateral de Ácido Kaínico.

El daño al Giro Dentado fue provocado por la infusión de 0.75 nmoles de Ácido Kaínico, el daño se puede observar por medio de la histología de cortes coronales de 30 micras de cerebro teñidos con violeta de cresilo. En la figura 2 se muestra el adelgazamiento de la capa granular del GD, la ausencia de células propias del GD en la región lateral y una desaparición casi total del *hilus*. Después de 12 días de infringir el daño excitotóxico en el giro dentado, tanto los cerebros de los sujetos control tratados con salina (AK12d), como los tratados con IGF-I (AK12d + IGF-I) aún presentan una capa granular desestructurada, así como la desaparición total del *hilus* debido a la muerte neuronal por la infusión de ácido kaínico (Fig. 2).



Figura 2. Estudio histológico del sitio de lesión 12 días posteriores a la infusión de ácido kaínico. Micrografias representativas de tinción de Nissl capturadas con una magnificación de 4x, muestran la lesión a niveles anterior (A y B) y posterior (C y D) de sujetos lesionados que recibieron la infusión de solución salina (A y C) e IGF-I (B y D); barra de escala: 0.5mm. Los cuadros muestran la magnificación 32X de las regiones en marcos negros; barra de escala: 0.2mm.

ii. La lesión con ácido kaínico no modifica el aprendizaje de los sujetos.

En el condicionamiento aversivo contextual, los distintos grupos no mostraron diferencias significativas entre sí en el proceso de condicionamiento sonido-choque eléctrico como se muestra en la Figura 3B. Previo al primer choque eléctrico (pretono) todos los sujetos presentaron inmovilidad significativamente similar en el tiempo total de evaluación (Fig. 3A), sin embargo éste se incrementó progresivamente con cada choque eléctrico en todos los grupos. Esto muestra que la lesión al GD no afecta el proceso de aprendizaje de asociación entre el sonido y el estímulo aversivo (Fig. 3B).



Figura 3. A) Porcentaje de tiempo de inmovilidad de los distintos grupos previo a la primera descarga eléctrica en la sesión de adquisición. B) Porcentaje de tiempo de inmovilidad durante la sesión de condicionamiento. El porcentaje de inmovilidad no resultó significativamente diferente entre los grupos; el tamaño de la muestra se presenta entre paréntesis (ANOVA de una vía, p<0.01).

iii. La memoria independiente del GD no cambia como resultado de la lesión

Como se mencionó, en este trabajo se empleó una tarea independiente del GD a manera de control con el objeto de evaluar la especificidad de la lesión y de analizar si la administración crónica de IGF-I ejercía algún efecto sobre la memoria aversiva o sobre la respuesta de congelamiento natural de los sujetos. La tarea control que se empleó fue una de condicionamiento aversivo en la que se apareó un sonido a un choque eléctrico. Como se muestra en la figura 4 A, todos los grupos mostraron inmovilidad ante la presentación del sonido en ausencia de choque; no se observaron diferencias significativas entre la ejecución de esta tarea en el grupo con lesión sham (sham12d), el grupo lesionado con ácido kaínico (AK12d) y el grupo lesionado tratado con IGF-I (AK12d + IGF-I). De igual manera, para asegurar que la inmovilidad de los sujetos se debía a la asociación con el estímulo aversivo y no a un déficit motor, se evaluó a los sujetos de los diferentes grupos en la tarea campo abierto (Fig. 4B) y se encontró que no había diferencias significativas entre los distintos grupos y por tanto el congelamiento de los sujetos reflejaba su capacidad de recordar el estímulo aversivo.



Figura 4. Evaluación de la memoria aversiva (independiente de giro dentado) y de la capacidad motora .A) No hay diferencia significativa entre la ejecución de los sujetos lesionados con ácido kaínico y el grupo con lesión sham, y tampoco con los sujetos lesionados tratados con IGF-I. B) La ejecución en la tarea de campo abierto no difiere entre los grupos evaluados y lo mismo ocurre en la capacidad de cada sujeto para moverse. Las barras muestran la media ± E.S. Análisis con ANOVA una vía.

iv. El suministro crónico del IGF-I potencia la recuperación funcional del GD.

La memoria contextual se evaluó midiendo el congelamiento de los sujetos en el contexto previamente asociado al estímulo aversivo. El grupo lesionado con ácido kaínico, 5 días posteriores a la lesión (AK5d), presentó significativamente menor inmovilidad respecto al grupo sham5d el cual no tiene lesionado el GD (p<0.05), sugiriendo que los sujetos no recuerdan el contexto asociado al estímulo aversivo (fig. 5A). De manera similar el grupo lesionado con AK tratado con salina (AK12d) muestra un déficit significativo en la memoria contextual respecto al grupo no lesionado (sham12d), (p<0.05). Esto indica que 12 días posteriores a la lesión en el GD, los sujetos lesionados son deficientes en la ejecución de la tarea dependiente de esta memoria a diferencia de los sujetos sham que al presentar mayor congelamiento reflejan una mayor capacidad de evocar el recuerdo asociado al contexto (fig. 5B). Sin embargo, el grupo lesionado con ácido kaínico y al cual se le administró IGF-I (AK12d+IGF-I) mostró un incremento significativo de inmovilidad con respecto al grupo lesionado y tratado con salina (AK12d) (p<0.001), y no mostró diferencias significativas con respecto al grupo no lesionado (sham12d).



В

Α

Figura 5. Evaluación de la memoria dependiente de GD. A) La memoria contextual se afecta después de la lesión excitotóxica (AK5d) en el GD. B) En los sujetos lesionados que recibieron IGF-I (AK12d+IGF-I) se observa una recuperación significativa en la memoria contextual con respecto a los que recibieron infusión de salina 0.9% (AK12d). Las barras muestran la media ± E.S. Se utilizó la prueba ANOVA de una vía (*p<0.05, *** p<0.001).

v. Reorganización Anatómica del Giro Dentado

Con el objeto de analizar la posible correlación entre recuperación funcional y reorganización estructural, se realizó un análisis inmunohistoquímico contra neuronas maduras en la capa granular del GD y se evaluó el volumen de la lesión. La figura 6 muestra que la integridad de la capa granular de animales lesionados y tratados con salina como control (Fig. 6A) ó con IGF-I (Fig. 6B) es similar. El volumen de la lesión, evaluado en secciones inmunoprocesadas para el marcador de neuronas maduras NeuN, no presenta diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. 6C), sin embargo hay tendencia en presentar un decremento del volumen de la lesión en los sujetos tratados con IGF-I comparados con los sujetos control.



Figura 6. Inmunohistoquímica de NeuN. A y B muestran secciones coronales del giro dentado representativas del sitio de lesión en coordenadas antero-posteriores comparables (arriba: anterior, centro: medial, abajo: posterior) de un sujeto tratado con salina (A) y un sujeto tratado con IGF-I (B). C) Media ± ES del volumen de lesión. Barra de escala, 200µm.

XXIV. Discusión

En el presente trabajo se evaluó el efecto del IGF-I en la reparación del sistema nervioso posterior a una lesión excitotóxica. El interés por este factor surgió de los descubrimientos reportados por otros laboratorios en modelos *in vitro* e *in vivo*, descritos a lo largo de este trabajo, que sugieren al IGF-I como una molécula importante en la regulación de procesos que subyacen la plasticidad nerviosa. Resultados previos del laboratorio muestran que el GD se reorganiza de manera natural 25 días posteriores a realizar una lesión excitotóxica y esto correlaciona con la recuperación de la función de dicha estructura [55]. Así, utilizando el mismo modelo y después de administrar el IGF-I, reportamos que el fenómeno de recuperación funcional del GD se acelera por la administración crónica de este factor ya que lo observamos 12 días post-lesión. En cuanto a la reorganización anatómica del giro dentado que ocurre naturalmente 25 días posteriores a la lesión, se reportó que esta reorganización se debe a la presencia de neuronas maduras (NeuN+). De la misma manera, en el presente trabajo analizamos el efecto del tratamiento de IGF-I sobre el restablecimiento anatómico del giro dentado estimando el volumen de la lesión en cortes de cerebro inmunoprocesados con el marcador NeuN. Los resultados no muestran disminución significativa del volumen de lesión. Sin embargo observamos una tendencia a que el volumen de la zona lesionada sea menor en los sujetos tratados con IGF-I, posiblemente por la mayor presencia de neuronas maduras en dichos sujetos, lo que sugiere que el restablecimiento anatómico parcial del GD podría ser suficiente para mediar la recuperación de la memoria contextual.

Aunque no evaluamos otros mecanismos que pudieran subyacer la recuperación funcional acelerada por el IGF-I, pensamos que distintos procesos pueden mediar este fenómeno. Consideramos que las células remanentes a la lesión así como el GD contra-lateral podrían compensar la pérdida de función respondiendo a las señales del IGF-I. El factor podría modular la formación de nuevas conexiones neuronales entre las neuronas remanentes a través de la generación de espinas dendríticas o promover el crecimiento del axón, procesos inducidos por el IGF-I *in vivo* e *in vitro* respectivamente [81-82, 88]. Además, reportes indican que el IGF-I induce la expresión de la subunidad NR2B del receptor de

NMDA que a su vez favorece la formación y estabilidad de las sinapsis [89-90]. En conjunto, esto sugiere a la sinaptogénesis como un mecanismo que podría mediar el fenómeno de recuperación aquí reportado.

Otro mecanismo que podría mediar la recuperación funcional es la neurogénesis, que aunque no se ha probado como mecanismo de neuroreparación, existen evidencias para considerarlo como tal. El grupo de Nakatomi observó, en un modelo de lesión isquémica en rata, que tras la infusión de factores de crecimiento (FGF-2 y EGF) ocurre un incremento en la neurogénesis y esto correlacionó con una mejor ejecución de tareas de memoria espacial. En otro estudio el grupo de Kernie sugirió que la proliferación de progenitores neurales puede mediar la recuperación funcional posterior a un evento de daño en un modelo de lesión hipocampal [51, 91].

Ambos grupos plantearon que la neurogénesis está directamente involucrada con la recuperación de la memoria espacial en roedores con lesiones en hipocampo. Sin embargo el trabajo de Nakatomi únicamente estableció una correlación entre la neurogénesis y la recuperación funcional [63], y el grupo de Kernie no evaluó la neurogénesis como tal sino la proliferación de progenitores neurales que pueden dar origen a neuronas y glía; además no encontró cambios en la memoria contextual habiendo lesionado el giro dentado [63, 91]. Esto último no concuerda con los datos mostrados en este trabajo, donde claramente una lesión al Giro Dentado provoca deficiencias en la memoria contextual.

Resultados previos del laboratorio mostraron que la reestructuración morfológica correlaciona con la recuperación funcional 25 días post-lesión y además dicha reestructuración está dada por neuronas maduras (positivos para marcadores de neuronas maduras, NeuN). Previo a esto (evaluando al día 10 post-lesión) ocurre un incremento en el número de neuronas jóvenes positivas para Dcx [55].

Sin embargo los procesos necesarios para la generación de nuevas neuronas, desde la proliferación de las células progenitoras hasta la integración de la neurona a un circuito

35

neuronal funcional, tardan en ocurrir entre 3 y 4 semanas [92], lo que correlaciona con la reorganización morfológica que ocurre de manera natural posterior a la lesión con ácido kaínico, pero no así con la recuperación a los 12 días propiciada por la administración de IGF-I. Esto último va de acuerdo con la propuesta de Wieloch y Nikolich acerca de que la reparación basal del sistema nervioso sucede antes de que las nuevas neuronas puedan terminar su maduración, y que posiblemente las neuronas aun inmaduras induzcan la reparación del cerebro a través de la liberación de factores tróficos y no por su integración [3].

Uno de los efectos más estudiados del IGF-I es la protección de distintos tipos de células impidiendo su apoptosis ó promoviendo la supervivencia. En el sistema nervioso central, diversos reportes indican que tanto el factor neurotrófico, como su receptor IGF-IR, e incluso la vía de señalización que activa, PI3K, promueven la neuroprotección en diferentes tipos de daño cerebral [93-94]. Debido a esto se diseño el protocolo experimental de tal manera que podemos descartar un efecto de protección sobre las neuronas en proceso de muerte celular. Al colocar la minibomba en el día 5 posterior a la lesión, se buscó que el IGF-I actuara cuando el efecto del ácido kaínico hubiera terminado de inducir la muerte de las neuronas afectadas. Debido a esto no se observó un efecto de protección y supervivencia de las neuronas dañadas, ocasionado por el IGF-I, sino que se logró determinar únicamente el rol del factor en la recuperación de la función del Giro Dentado una vez abatida por la lesión excitotóxica.

XXV. Conclusiones

La administración crónica del IGF-I promueve la recuperación de la memoria contextual 12 días posteriores a la lesión excitotóxica en el giro dentado del hipocampo, acelerando el proceso que ocurre de manera natural en 25 días.

Dicha recuperación es mediada posiblemente por la reorganización parcial del giro dentado, sin embargo es necesario incrementar el tamaño de la muestra para confirmarlo.

El tratamiento con IGF-I no modifica la capacidad de los roedores de asociar contextoestímulo aversivo, ni su capacidad motriz.

XXVI. Referencias

- 1. Livingston, R.B., *Brain Mechanisms in conditioning and learning.* Neurosciences Research Program, 1966. **4**(3): p. 235-347.
- 2. Wiesel, T.N. and D.H. Hubel, *Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens.* J Neurophysiol, 1965. **28**(6): p. 1029-40.
- 3. Wieloch, T. and K. Nikolich, *Mechanisms of neural plasticity following brain injury*. Curr Opin Neurobiol, 2006. **16**(3): p. 258-64.
- 4. Zepeda, A., et al., *Reorganization of visual cortical maps after focal ischemic lesions.* J Cereb Blood Flow Metab, 2003. **23**(7): p. 811-20.
- 5. Zepeda, A., et al., Functional reorganization of visual cortex maps after ischemic lesions is accompanied by changes in expression of cytoskeletal proteins and NMDA and GABA(A) receptor subunits. J Neurosci, 2004. **24**(8): p. 1812-21.
- 6. Nudo, R.J., *Mechanisms for recovery of motor function following cortical damage.* Curr Opin Neurobiol, 2006. **16**(6): p. 638-44.
- 7. Hosp, J.A. and A.R. Luft, *Cortical Plasticity during Motor Learning and Recovery after Ischemic Stroke.* Neural Plast. **2011**: p. 871296.
- 8. Nudo, R.J., et al., *Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct.* Science, 1996. **272**(5269): p. 1791-4.
- 9. Kandel, E.R., J.H. Schwartz, and T.M. Jessell, eds. *Principles of Neural Science*. Fourth Edition ed. 2000, **McGraw-Hill**: New York. 1414.
- 10. Maren, S. and W. Holt, *The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning*. Behav Brain Res, 2000. **110**(1-2): p. 97-108.
- 11. Fanselow, M.S., *Conditioned and unconditional components of post-shock freezing*. Pavlov J Biol Sci, 1980. **15**(4): p. 177-82.
- 12. Bruel-Jungerman, E., S. Davis, and S. Laroche, *Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four.* Neuroscientist, 2007. **13**(5): p. 492-505.
- 13. Serrano, P.A., et al., *Protein kinase inhibitors disrupt memory formation in two chick brain regions.* Pharmacol Biochem Behav, 1995. **52**(3): p. 547-54.
- 14. Bear, M.F. and W.C. Abraham, *Long-term depression in hippocampus*. Annu Rev Neurosci, 1996. **19**: p. 437-62.
- 15. Malinow, R. and R.C. Malenka, *AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity*. Annu Rev Neurosci, 2002. **25**: p. 103-26.
- 16. Collingridge, G.L., et al., *Long-term depression in the CNS.* Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(7): p. 459-73.
- 17. Crain, B., et al., *A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat.* Brain Res, 1973. **63**: p. 195-204.
- 18. Gogolla, N., I. Galimberti, and P. Caroni, *Structural plasticity of axon terminals in the adult.* Curr Opin Neurobiol, 2007. **17**(5): p. 516-24.
- 19. Waites, C.L., A.M. Craig, and C.C. Garner, *Mechanisms of vertebrate synaptogenesis*. Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 251-74.
- 20. Radley, J.J., et al., *Associative Pavlovian conditioning leads to an increase in spinophilinimmunoreactive dendritic spines in the lateral amygdala.* Eur J Neurosci, 2006. **24**(3): p. 876-84.
- 21. Rusakov, D.A., et al., *Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus*. Neuroscience, 1997. **80**(1): p. 69-77.

- 22. Briones, T.L., et al., *Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning.* Exp Neurol, 2006. **198**(2): p. 530-8.
- 23. Briones, T.L., et al., *Behaviorally-induced ultrastructural plasticity in the hippocampal region after cerebral ischemia.* Brain Res, 2004. **997**(2): p. 137-46.
- 24. Altman, J. and G.D. Das, Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol, 1965. **124**(3): p. 319-35.
- 25. Goldman, S.A. and F. Nottebohm, *Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(8): p. 2390-4.
- 26. Gould, E., et al., *Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3168-71.
- 27. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1313-7.
- 28. Lois, C. and A. Alvarez-Buylla, *Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain.* Science, 1994. **264**(5162): p. 1145-8.
- 29. Kuhn, H.G., H. Dickinson-Anson, and F.H. Gage, *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation.* J Neurosci, 1996. **16**(6): p. 2027-33.
- 30. Gates, M.A., et al., *Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres.* J Comp Neurol, 1995. **361**(2): p. 249-66.
- 31. Rousselot, P., C. Lois, and A. Alvarez-Buylla, *Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice.* J Comp Neurol, 1995. **351**(1): p. 51-61.
- 32. Miller, M.W. and R.S. Nowakowski, *Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system.* Brain Res, 1988. **457**(1): p. 44-52.
- 33. Hastings, N.B. and E. Gould, *Rapid extension of axons into the CA3 region by adultgenerated granule cells.* J Comp Neurol, 1999. **413**(1): p. 146-54.
- 34. Ehninger, D. and G. Kempermann, *Neurogenesis in the adult hippocampus*. Cell Tissue Res, 2008. **331**(1): p. 243-50.
- 35. Riquelme, P.A., E. Drapeau, and F. Doetsch, *Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008. **363**(1489): p. 123-37.
- 36. Kitamura, T., et al., *Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory*. Cell, 2009. **139**(4): p. 814-27.
- 37. Gould, E., et al., *Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation.* Nat Neurosci, 1999. **2**(3): p. 260-5.
- 38. Kempermann, G. and F.H. Gage, *Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task.* Eur J Neurosci, 2002. **16**(1): p. 129-36.
- 39. Shors, T.J., et al., *Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories.* Nature, 2001. **410**(6826): p. 372-6.
- 40. Hernandez-Rabaza, V., et al., *Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts* contextual learning but spares spatial working memory, long-term conditional rule retention and spatial reversal. Neuroscience, 2009. **159**(1): p. 59-68.
- 41. Dong, H., et al., *Hippocampal neurogenesis follows kainic acid-induced apoptosis in neonatal rats.* J Neurosci, 2003. **23**(5): p. 1742-9.

- 42. Ogita, K., et al., *Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model.* J Neurosci Res, 2005. **82**(5): p. 609-21.
- 43. Hernandez-Ortega, K., P. Ferrera, and C. Arias, *Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage*. J Neurosci Res, 2007. **85**(8): p. 1744-51.
- 44. Ramirez-Amaya, V., et al., *Integration of new neurons into functional neural networks*. J Neurosci, 2006. **26**(47): p. 12237-41.
- 45. Toni, N., et al., *Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells.* Nat Neurosci, 2008. **11**(8): p. 901-7.
- 46. van Praag, H., et al., *Functional neurogenesis in the adult hippocampus*. Nature, 2002. **415**(6875): p. 1030-4.
- 47. Scharfman, H.E., J.H. Goodman, and A.L. Sollas, *Granule-like neurons at the hilar/CA3* border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. J Neurosci, 2000. **20**(16): p. 6144-58.
- 48. Lichtenwalner, R.J. and J.M. Parent, *Adult neurogenesis and the ischemic forebrain.* J Cereb Blood Flow Metab, 2006. **26**(1): p. 1-20.
- 49. Pang, J.C., et al., *Mutation analysis of DMBT1 in glioblastoma, medulloblastoma and oligodendroglial tumors.* Int J Cancer, 2003. **105**(1): p. 76-81.
- 50. Sun, D., et al., Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery. Exp Neurol, 2007. **204**(1): p. 264-72.
- 51. Blaiss, C.A., et al., *Temporally specified genetic ablation of neurogenesis impairs cognitive recovery after traumatic brain injury*. J Neurosci, 2011. **31**(13): p. 4906-16.
- 52. Hernandez-Rabaza, V., et al., *The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward.* Neurobiol Learn Mem, 2008. **90**(3): p. 553-9.
- 53. Lopez-Fernandez, M.A., et al., *Upregulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the dorsal hippocampus after contextual fear conditioning is involved in long-term memory formation.* J Neurosci, 2007. **27**(17): p. 4552-61.
- Collazos-Castro, J.E. and M. Nieto-Sampedro, *Developmental and reactive growth of dentate gyrus afferents: cellular and molecular interactions.* Restor Neurol Neurosci, 2001. 19(3-4): p. 169-87.
- 55. Zepeda, A., et al., *Functional recovery of the dentate gyrus after a focal lesion is accompanied by structural reorganization in the adult rat.* Brain Struct Funct, 2012.
- 56. Pinheiro, P. and C. Mulle, *Kainate receptors*. Cell Tissue Res, 2006. **326**(2): p. 457-82.
- 57. Zaczek, R. and J.T. Coyle, *Excitatory amino acid analogues: neurotoxicity and seizures*. Neuropharmacology, 1982. **21**(1): p. 15-26.
- 58. Nadler, J.V., B.W. Perry, and C.W. Cotman, *Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells.* Nature, 1978. **271**(5646): p. 676-7.
- 59. Lee, E. and H. Son, *Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors.* BMB Rep, 2009. **42**(5): p. 239-44.
- 60. Sairanen, M., et al., Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. J Neurosci, 2005. **25**(5): p. 1089-94.
- 61. Jin, K., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11946-50.

- 62. Ransome, M.I. and A.M. Turnley, *Systemically delivered Erythropoietin transiently enhances adult hippocampal neurogenesis.* J Neurochem, 2007. **102**(6): p. 1953-65.
- 63. Nakatomi, H., et al., *Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors.* Cell, 2002. **110**(4): p. 429-41.
- 64. Dempsey, R.J., et al., *Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF.* J Neurochem, 2003. **87**(3): p. 586-97.
- 65. Russo, V.C., et al., *The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain.* Endocr Rev, 2005. **26**(7): p. 916-43.
- 66. Yakar, S., et al., *Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7324-9.
- 67. O'Kusky, J.R., P. Ye, and A.J. D'Ercole, *Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis* and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. J Neurosci, 2000. **20**(22): p. 8435-42.
- 68. Aberg, M.A., et al., *Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus.* J Neurosci, 2000. **20**(8): p. 2896-903.
- 69. Lai, M., et al., *Reduced expression of insulin-like growth factor 1 messenger RNA in the hippocampus of aged rats.* Neurosci Lett, 2000. **288**(1): p. 66-70.
- 70. Yan, Y.P., et al., *Insulin-like growth factor-1 is an endogenous mediator of focal ischemiainduced neural progenitor proliferation.* Eur J Neurosci, 2006. **24**(1): p. 45-54.
- 71. Breese, C.R., et al., *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, 1996. **369**(3): p. 388-404.
- 72. Nishijima, T., et al., *Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS.* Neuron, 2010. **67**(5): p. 834-46.
- 73. Rotwein, P., et al., *Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(1): p. 265-9.
- 74. Werther, G.A., et al., *Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridization--relationship to IGF-I receptors.* Mol Endocrinol, 1990. **4**(5): p. 773-8.
- 75. Siddle, K., *The insulin receptor and type I IGF receptor: comparison of structure and function.* Prog Growth Factor Res, 1992. **4**(4): p. 301-20.
- 76. Gual, P., et al., *A conformational change in the beta-subunit of the insulin-like growth factor I receptor identified by antipeptide antibodies.* Endocrinology, 1995. **136**(12): p. 5298-304.
- 77. Aleman, A. and I. Torres-Aleman, *Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan.* Prog Neurobiol, 2009. **89**(3): p. 256-65.
- 78. Otaegi, G., et al., Modulation of the PI 3-kinase-Akt signalling pathway by IGF-I and PTEN regulates the differentiation of neural stem/precursor cells. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 13): p. 2739-48.
- 79. Zheng, W.H., S. Kar, and R. Quirion, *Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHRL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons.* Mol Pharmacol, 2002. **62**(2): p. 225-33.
- 80. Sosa, L., et al., *IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity.* Nat Neurosci, 2006. **9**(8): p. 993-5.
- 81. Laurino, L., et al., *PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 16): p. 3653-62.

- 82. Glasper, E.R., et al., *Blockade of insulin-like growth factor-I has complex effects on structural plasticity in the hippocampus.* Hippocampus, 2010. **20**(6): p. 706-12.
- 83. Bruel-Jungerman, E., et al., *Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus.* PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7901.
- 84. Azcoitia, I., A. Sierra, and L.M. Garcia-Segura, *Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling.* J Neurosci Res, 1999. **58**(6): p. 815-22.
- 85. Lynch, C.D., et al., *Insulin-like growth factor-1 selectively increases glucose utilization in brains of aged animals.* Endocrinology, 2001. **142**(1): p. 506-9.
- Lichtenwalner, R.J., et al., Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. Neuroscience, 2001. 107(4): p. 603-13.
- 87. Darnaudery, M., et al., *Insulin-like growth factor 1 reduces age-related disorders induced by prenatal stress in female rats.* Neurobiol Aging, 2006. **27**(1): p. 119-27.
- 88. Glasper, E.R., et al., *Blockade of insulin-like growth factor-I has complex effects on structural plasticity in the hippocampus.* Hippocampus. **20**(6): p. 706-12.
- Le Greves, M., P. Le Greves, and F. Nyberg, Age-related effects of IGF-1 on the NMDA-, GHand IGF-1-receptor mRNA transcripts in the rat hippocampus. Brain Res Bull, 2005. 65(5): p. 369-74.
- 90. Gambrill, A.C. and A. Barria, *NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(14): p. 5855-60.
- 91. Blaiss, C.A., et al., *Temporally specified genetic ablation of neurogenesis impairs cognitive recovery after traumatic brain injury*. J Neurosci. **31**(13): p. 4906-16.
- 92. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system*. Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 223-50.
- 93. Gualco, E., et al., *IGF-IR-dependent expression of Survivin is required for T-antigenmediated protection from apoptosis and proliferation of neural progenitors.* Cell Death Differ, 2010. **17**(3): p. 439-51.
- 94. Liu, W., J.A. D'Ercole, and P. Ye, Blunting type 1 insulin-like growth factor receptor expression exacerbates neuronal apoptosis following hypoxic/ischemic injury. BMC Neurosci, 2011. **12**: p. 64.

Insulin Growth Factor-1 Promotes Functional Recovery after a Focal Lesion in the Dentate Gyrus

Running title: IGF-1 Promotes Functional Recovery

Adhemar Liquitaya-Montiel, Andrea Aguilar-Arredondo, Clorinda Arias and Angélica Zepeda*

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

*Corresponding author: Angélica Zepeda, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. AP 70-228, 04510 México, DF, México. Tel.: +52 55 56229215; fax: +52 55 56229182. e-mail address: azepeda@biomedicas.unam.mx

ABSTRACT

The adult brain is plastic and able to reorganize structurally and functionally after damage. Growth factors are key molecules underlying the recovery process and among trophic molecules, Insulin-Like Growth Factor -I (IGF-I) is of particular interest given that it modulates neuronal and glial responses in the hippocampus including neurogenesis, which has been proposed as a mechanism of neurorepair. In this study we analyzed the effect of intracerebroventricular chronic infusion of IGF-I on functional recovery and morphological restoration after the induction of an excitotoxic lesion in the dentate gyrus (DG) of young-adult rats. Our results show that the lesion impairs contextual fear memory which is a DG dependent task, but not cued fear memory or performance in the open field motor task, which are independent of the DG integrity. Chronic administration of IGF-I, but not vehicle, promotes functional recovery to control levels in injured subjects. Analysis in NeuN immunoprocessed tissue revealed that the lesion volume was not different between groups and that the DG was not evidently restructured in the IGF-I treated group. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) analysis revealed an increased astrocytic response in the injured region in both groups and Doublecortin (DCX) analysis showed a similar increase in number of newly born neurons in both groups. However, a remarkable increase in young neurons dendritic arborization was observed in the IGF-I treated group. These results provide evidence for IGF-I as a molecule mediating functional and cellular plasticity during a reorganization process after damage to a neurogenic niche.

KEYWORDS: plasticity; neurogenesis; hippocampus; brain damage; growth factors.

Introduction

The adult brain is a plastic organ able to alter its structure and function in an activity-dependent manner in response to experience as well as after injury. Plasticity underlies the potential for neurorepair in mammals and allows functional and structural recovery in several brain regions after damage. Brain lesions lead to neuronal death and to the loss or alteration of functions associated to the damaged structure, thus leading to motor, sensorial or cognitive impairments. Several processes such as the development of new neural networks as a result of axonal and dendritic sprouting^{1, 2} and variations in neurotransmitters and their receptors expression patterns^{3, 4} have been associated to functional recovery. However, in view of the neurogenic capacity of the subventricular zone⁵ and the dentate gyrus (DG) of the hippocampus^{6, 7} in the adult mammalian brain, neurogenesis has also gained attention as a possible mechanism mediating functional recovery.

The hippocampus is a highly plastic region involved in memory formation and the DG in particular comprises one of the two neurogenic niches in the adult brain. This structure is also key in the processing of contextual fear memory⁸, thus it represents a unique region for analyzing cellular events associated to structural and functional recovery after injury and for evaluating the impact of factors known to promote plastic responses. It is well known that growth factors modulate several processes in the nervous system including cell fate, development of neural circuits, brain growth, cellular differentiation and regeneration⁹.

Insulin-like growth factor I (IGF-I) is an insulin-like peptide involved in the activation of numerous cell processes underlying brain plasticity¹⁰. IGF-I promotes neural proliferation *in vitro* and *in vivo*¹¹⁻¹³, and also induces neural precursor differentiation to neurons *in vitro* and *in vivo*^{12, 14}. *In vitro* studies have shown that IGF-I and its receptor IGF-IR play a fundamental role in the establishment of neuronal polarity and axonal growth, both critical steps in neuronal maturation¹⁵. In addition, *in vivo* studies show that neuronal proliferation, differentiation and dendritic spine outgrowth enhanced by physical exercise rely on IGF-I signals, suggesting an important role of this molecule in adaptive brain plasticity¹⁶. These pleiotropic actions of IGF-1 are mediated by the activation of the two major signaling cascades, the phosphatidylinositol-3 (PI3) kinase/Akt and the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, resulting from the IGF-IR signaling complex formation that is well documented in neural cells.

In the field of neurorepair, it has been shown that IGF-I is upregulated in the adult brain after hippocampal deafferentation and its expression correlates in a temporal fashion with axonal sprouting¹⁷. These data suggest that IGF-I could be a key modulator of brain plasticity mechanisms that, as previously mentioned, could yield functional brain repair.

In a previous study we have shown that the DG reorganizes structurally after an excitotoxic focal lesion and that such reorganization is accompanied by behavioral and synaptic recovery in the young-adult rat¹⁸. Both, structural and functional recovery became evident at 25 days after the lesion, while at 10 days post lesion morphological disorganization and memory impairment prevailed. In the present study we aimed at evaluating if the *in vivo* chronic infusion of IGF-I accelerated the recovery of contextual memory formation after a DG excitotoxic lesion, and analyzed if an increased neurogenic response in this structure was associated with a better functional outcome.

Materials and Methods

Animals

Young-adults male Wistar rats (250-300 g) were maintained on a 12:12 h inverted dark: light cycle and housed 3-4 per cage. Animals were tested only during the dark phase of the cycle. Food and water were provided *ad libitum*. Animals were handled in accordance with local government rules and with approval of the Animal Care Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas. Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of subjects used. During the whole experimental procedure 4 rats per cage were housed in a laboratory environment with free access to water and food.

Surgery

For all the experiments, animals were anesthetized with 5 % isoflurane in a mixture of 95 % O_2 and 5 % CO_2 and placed in a stereotaxic system (Stoelting, Wood Dale, III) and a 1.5-2 cm incision was made in the skin to expose the skull. Muscles were retracted and a hole was drilled in the skull using the following coordinates based on bregma (in millimeters): AP -3.8, ML -2.4¹⁹. The excitotoxic lesion was induced by a unilateral

injection of 1 µl (0.75nM) of kainic acid (KA; Sigma-Aldrich, Chemie, St. Louis, MO) at a rate of 1µl/min in the right DG (coordinates: AP -3.8; ML -2.4; V: -3.6). KA was dissolved in 1M NaOH and the solution was brought to the desired volume with 10mM phosphate buffer (pH 7.4). KA was infused using a micro syringe mounted on a microinjection pump (Stoelting, Co., WoodDale, IL). Control animals received 1 µl/min of 10mM phosphate buffer. The skin was then sutured, anesthesia was discontinued, and animals were returned to their acrylic cages until the time of perfusion. During the first hours after the experiment and for the days that followed, the rats were observed until the day of perfusion. All subjects displayed partial seizures (i.e wet-rat shakes; ~3 every 10 min) during the first hour after KA infusion, but no tonic-clonic seizures were observed at any time point.

On the next day of the surgery and for the following two days, animals were handled and manipulated by the experimenter (in preparation for behavioral procedures). On day 4 and 5 after the lesion animals were conditioned and evaluated in behavioral tests (see below). On day 6 after KA lesion, an osmotic minipump (Alzet-2001; approximate capacity 233 μ l, flow rate 1 μ l/hour; 7 days duration; Durect Corp., Cupertino, CA) was implanted subcutaneously in the neck/shoulder region and the minipump was connected to a 28-gauge steel cannula (Alzet-2004 brain infusion kit; Durect Corp., Cupertino, CA) which was implanted into the left lateral ventricle (coordinates: AP -0.8, ML +1.4; V -4.5). Animals received either vehicle (0.9% NaCl) or recombinant human IGF-I (50ng/ μ l, Sigma) delivered at a rate of 1 μ l/hr for 7 days.

Thus, the experiment consisted on the following groups: **Sham 12d**: animals with sham lesion injury and behavioral evaluation 12 days after surgery; **KA12d**: animals with kainic acid lesion and an osmotic minipump releasing 0.9% NaCl (vehicle solution) for 7 days; **KA12d+IGF-I**: animals with kainic acid lesion and an osmotic minipump releasing IGF-I for 7 days.

Behavioral procedures

Apparatus

Open field arena

For the open field motor activity task, an 80 cm long x 80 cm wide x 30 cm high black floor and wall acrylic arena was used. The arena was divided in 20 cm x 20 cm squares for quantifiable locomotion recording.

Contextual fear-conditioning chamber

For the contextual fear-conditioning task, a conditioning chamber 25 cm long x 25 cm width x 20 cm height was used (San Diego Instruments, San Diego, CA, USA). The walls and the roof consisted of transparent acrylic and the removable floor consisted of 23 stainless steel rods. The chamber was equipped with a matrix of 32 infrared beams at the level of the floor. Movements inside the chamber were registered by the interruption of a beam and the information was sent to a computer for further analysis. The roof of the chamber was equipped with a speaker producing an 80 dB and 2 kHz sound.

Altered context chamber

The fear-conditioning chamber was used with radical context modifications: the floor was covered with a white acrylic platform, the walls were covered on the outside with a black–white stripe pattern, an acrylic insert was vertically placed inside the chamber so it was divided in two triangular compartments, and a cherry scented ball of cotton was placed below the acrylic floor.

Behavioral testing

Animals were tested during the dark cycle, the conditioning and test room was dark and no visual cues were available. One day after KA or PB infusion and for the next 2 days, animals were handled and manipulated. On the fourth day after infusion, contextual fear conditioning procedures started.

Contextual fear conditioning and memory (CFCM) and Cued fear memory

Contextual memories are modulated mainly by the hippocampal $DG^{8,20,21}$. Briefly, a tone (conditioned stimulus) is paired to an electric shock (unconditioned stimulus) in a given context. As a consequence of the conditioning process, subjects develop a conditioned response of freezing, which reflects aversion and is defined as "total absence of movement except for those generated by breathing"²⁰. The task was performed in the fear conditioning chamber previously described in the *Apparatus* section.

The task consisted of 3 steps: 1) contextual fear conditioning; 2) contextual fear memory evaluation 24 hr after conditioning and; 3) cued fear memory evaluation 2 hours after contextual fear memory evaluation (see below). For contextual fear conditioning, subjects were individually trained by placing them in the conditioning chamber where they were allowed to explore for 2 min (pretone) before the first pairing of tone-

shock was delivered. The tone was 20 sec duration and co-terminated with a 2 sec, 1 mA foot-shock. Movement was recorded for the following 4 min and 4 consecutive tone-shock pairings were administered. The total duration of the training session was 22 min. 24 hr later, subjects were evaluated for aversive contextual memory: animals were placed individually in the conditioning context (no tone or shock were presented) and freezing was scored for the entire 5 min session. Subjects were then returned to their home cages. After each session, the chamber was wiped with cleaning solution (10% Dextran, 10% ethanol and 80% water).

Two hours after evaluation in the aversive context, subjects were evaluated for cued fear memory, which mainly depends on the basolateral amygdala²². Each animal was placed in the altered context chamber and baseline movement was recorded for 2 min. The tone used in the contextual fear memory protocol (20 sec duration) was presented 120 and 260 sec after the session had started. No shock was administered and movements were recorded for the following 3 min.

Each animal was trained and evaluated twice in both tasks: the first time (5 days after KA or PB infusion) to analyze if the lesion produced an alteration in the contextual fear memory and the second time (12 days after lesion and 7 days after IGF-I or saline infusion) to evaluate the effect of IGF-I administration.

Open field test

One hour after contextual fear memory was evaluated, general motor performance was analyzed. Animals were individually placed in one corner of the open field arena as previously described; the arena was divided into 16 squares marked by white lines. Number of crossings was scored for 5 min. A time line for the experimental procedure is depicted in Fig. 1.

Perfusion and histological procedures

All chemicals were purchased from Baker (Austin, Tx) unless otherwise stated. After motor performance evaluation was completed (12 days after KA/PB infusion) animals received an i.p. overdose of sodium pentobarbital (1ml) and were then transcardially perfused with 300 ml of saline solution (0.9% NaCl), followed by 250 ml of 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4. After perfusion, the brain was removed, postfixed during 24 hrs at 4°C and successively transferred to 15% and 30% sucrose for cryoprotection. 30

µm coronal brain sections were obtained using a cryostat (Leica Microsystems). Sections were placed in gelatin-coated slides for Nissl staining or stored at 4°C in 24 well plates (Corning, NY) containing a cryoprotection solution (25% ethylene glycol, 25% glycerol, 50% PB 0.2 M pH 7.4) until ready to be processed for immunohistochemical procedures.

Nissl Staining

Every third section throughout the hippocampus was mounted on gelatin-coated slides. Sections were rehydrated in distilled water for 2 minutes and gradually dehydrated in ethanol progressive concentrations baths (75%, 95% and 100%) for 2 minutes each. Slides were submerged in a 0.1% cresyl violet solution until the desired staining was achieved and were successively dehydrated in ethanol baths. Each slide was then given a two minutes bath in xylene and coverslipped for light microscopy.

Immunohistochemistry

Brain sections stored in cryoprotection solution were washed in PBS-Triton (0.3% Triton) 3 times for 10 min. All sections were incubated at room temperature for 2 h in blocking solution containing 3% normal horse serum (1:25; Vector Laboratories, Burlingame, CA) and 3% BSA (Sigma Aldrich, St Louis Mo, USA) diluted in 0.3 % PBS-T (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). They were then incubated at 4°C overnight in rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:500, DAKO, Glostrup, Denmark), and in mouse anti-NeuN (1:400, Sigma, St Luois, MO, USA) or goat anti-doublecortin (DCX) (1:250, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted in blocking solution. Sections were washed three times for 10 min with PBS and then incubated for 2 h at room temperature with the following secondary antibodies: Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse (1:500), Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit (1:400) and Alexa Fluor 488 donkey anti-goat (1:400, Invitrogen, Carslband, CA, USA) diluted in blocking solution. Sections processed for DCX were counterstained with radiant red diluted in PBS (1:100, Bio-Rad, Hercules, CA) for 10 min. After 3 washes of 10 min, sections were mounted on glass slides and covered with the anti-fading medium; 1, 4-diazabicyclo octane solution (DABCO, Sigma, St. Louis, MO). Control sections were treated equally, but no primary antibody was added.

Image analysis

Images were captured and analyzed using a Zeiss LSM5 confocal microscope (Oberkochen, Germany). Analysis was performed in sections where the lesion appeared (4-5 sections separated by 120µm) within coordinates AP -3.14 and -4.30 mm according to Paxinos and Watson (1998) and in the case of controls in the corresponding sections in the AP plane. Each section contained information from a 5 µm optical section in the axial plane. Four fields per section at a 40X magnification within the granular layer were randomly analyzed for the different cell markers. Images were exported to Image-Pro 3D Suite (Media Cybernetics Inc). For DCX analysis, number of cells was counted in four different regions (554 mm² each) per section and differences between groups were analyzed following an unpaired t-test. For GFAP analysis, densitometry was calculated from four different regions (554 mm² each) form each section. The signal was extracted from each micrograph and a gray scale image followed by a black and white mask was generated. Density of immunopositive GFAP cells/processes was calculated and differences between groups were analyzed.

Lesion volume analysis

All NeuN+ sections containing a region devoid of cells in the DG were used to calculate the volume of the lesion. Sections were 30 µm thick and were separated by 120 µm. Serial sections were captured with a digital camera (Carl Zeiss AxioCam MRc, Oberkochen, Germany) attached to an epifluorescent Axioskop 40 Carl Zeiss microscope. The area of the lesion in each section immunohistochemically processed for NeuN was measured using Image-Pro 3D Suite (Media Cybernetics Inc.) and the total lesion volume (*Vol*) was calculated as follows:

 $Vol = \Sigma^{n} [(As)(T) + (As)(K)]_{i}$

Where As = area of lesion in one NeuN section, T = thickness of Nissl sections, K = tissue separating adjacent Nissl sections, and n = number of sections that contain the lesion.

These measurements were performed for every subject, and the mean \pm SE was calculated. Statistical differences were analyzed using an unpaired t-test.

Results

Excitotoxic focal lesion in the dentate gyrus

The excitotoxic lesion was successfully induced with 0.75nM, was detected in the dorsal layer, crest and ventral layer of the DG and was evident from AP coordinates -3.2 to -4.8. The lesion area as assessed through Nissl staining is shown in Fig. 2. Coronal sections show that KA infusion induced a well-delimited region where the affected portion of the granular layer appeared thinner than the rest of the DG, but in some regions the lesion site appeared as an area completely devoid of cells. The lesion remained evident after 12 days post lesion in the saline (Fig. 2A, C) as well as in the IGF-I (Fig. 2B, D) treated groups.

IGF-I administration promotes dentate gyrus functional recovery after injury

To study the impact of ICV chronic IGF-I administration on functional recovery after a dentate gyrus lesion, we evaluated all groups in the contextual fear memory task and in the cued fear memory and open field as control tasks. Contextual fear memory depends on the hippocampus and particularly on the DG²³ whereas cued memory is known to rely on the amygdala.

On day 4 and 5 after the Sham/KA lesion, animals were conditioned and evaluated in the three tasks in order to address if the lesion had been successfully induced. Animals that received a KA, but not a PB infusion showed a decreased percentage in freezing in the contextual fear memory task; only subjects injected with KA which displayed a deficit in this task and saline injected which had no deficit were considered for the rest of the experiment. 11 and 12 days after the lesion (7 days of chronic saline or IGF-I infusion) animals were again conditioned and evaluated in the contextual fear memory task. Figure 3A shows that during the pretone (2 min lapse before the first presentation of tone–shock pairing) KA12d and KA12d+IGF-I groups displayed an exploration behavior similar to the control group (Sham12d), showing a low percentage of freezing. However as shown in Figure 3B, freezing gradually increased after each pairing in all groups during the conditioning session, thus all groups were successfully conditioned. No significant differences in freezing were observed among groups (one-way ANOVA). 24 h after the conditioning session, animals were evaluated for cued fear memory and 2 h later they were evaluated for cued fear memory in an altered context. Figure 3C shows that cued fear memory was preserved in all groups as percentage of freezing time was not

different among them (One-way ANOVA). In regard to contextual fear memory performance, which was evaluated 12 days after KA lesion and 7 days after IGF-I or vehicle administration, we observed that the KA12d group spent significantly less time freezing in the aversive context than Sham12d, (One-way ANOVA). Thus, at this time point, memory showed to be still impaired in the vehicle treated group. However, the KA12d +IGF-I group showed a significant increase in freezing time during the contextual fear memory evaluation as compared to KA12d (One-way ANOVA) thus showing that memory recovered to control levels.

To confirm that freezing behavior was not caused by motor alterations or by the lack of interest in exploring the environment, we tested the animals in the open field test. Figure 3E shows no significant differences in the number of visited quadrants in the open field test among groups along 4 min of evaluation, thereby confirming that freezing was dependent on the aversive association with context and not on motor impairment or emotional distress.

Neuronal anatomic reorganization

We have previously shown that functional recovery after DG injury occurs naturally at 25 days post lesion and that it correlates in time with the anatomical reorganization of the structure. Thus, we now analyzed if the functional recovery observed at 12 days post lesion in the IGF-I treated group correlated in time with the morphological reorganization of the damaged DG. Figure 4 shows that the integrity of the granular layer from a subject which received chronic infusion of saline (Fig. 4A) or IGF-I (Fig. 4B) was similar. The volume of the lesion as assessed in NeuN immunoprocessed sections did not reveal significant differences between groups (Fig. 4C). However, there was a clear trend for the lesion volume of the IGF-I treated group to be smaller than the one of the vehicle treated group.

Glial astrocytic response to injury

We evaluated if IGF-1 administration modified the gliotic response after injury by analyzing glial density in the injured DG. In both cases, iso and anisomorphic astrocytes were present and as shown in Fig 5 glial density was similar in the saline (Fig. 5A) and the IGF-I (Fig. 5B) treated groups. We observed that the glial reactivity in both groups was more prominent in the dorsal and ventral regions lining the damaged granular

layer and that the density of reactive astrocytes did not increase within the injured layer even when it was clearly thinned or devoid of cells (see arrows in Fig. 5).

Neuronal proliferation in the injured DG

In order to analyze the potential effect of IGF-I as a molecule promoting neurogenesis, we compared the number of DCX+ cells in the IGF-I and vehicle treated groups. The statistical analysis did not reveal a difference in the number of DCX+ cells between groups (Fig 6). However, a qualitative evaluation showed an increased expression of DCX+ neurites in the IGF-I as compared to the vehicle treated group (Fig. 6, see arrows); in both lesioned groups DCX was highly expressed (Fig. 6A,B) as compared to the sham animals (data not shown).

Discussion

In the present study we evaluated the effect of IGF-I chronic administration on functional recovery and morphological restoration of the DG, a neurogenic region involved in complex cognitive functions. We hereby report that a lesion to this structure leads to cell loss accompanied by the impairment in contextual fear memory performance. Infusion of IGF-I for 7 days after an excitotoxic lesion, significantly diminishes the cognitive impairment without inducing a significant morphological restoration of the DG. We have previously shown that natural functional recovery of contextual fear memory (i.e without delivery of exogenous molecules) occurs until 25 days post-lesion¹⁸ and the present results demonstrate that IGF-I exerts an accelerating effect in the process of memory recovery after a DG lesion. In such work, recovery was accompanied by the reorganization of the damaged DG as observed by the absence of regions devoid of neurons and the presence of NeuN+ cells throughout the complete DG. Thus, a rationale for the present work was to analyze if IGF-I could exacerbate neuronal proliferation or maturation of newly born cells after a lesion to the adult DG, accelerate the rate of integration into the immediately adjacent granule cell layer and in this way, contribute to memory recovery. We observed however, that functional recovery occurred without a major morphological reorganization of the DG as analyzed through NeuN immunohistochemistry.

Several studies have shown a positive correlation between IGF-I and cognitive performance²⁴ and have proposed a potential therapeutic benefit of IGF-I in several neurodegenerative conditions. The neuroprotective

effect of IGF-I has been tested through its administration in animals with hippocampal injury, such as ischemia²⁵ and temporal lobe epilepsy²⁶ and it has been proposed that the peptide decreases brain damage through a multiple pro-survival effects acting on neurons, glia and/or endothelial cells²⁷. In the present work IGF-I infusion started 5 days after injury, thus the effects exerted by the peptide initiated in a time window in which main secondary damage processes had elapsed. To our knowledge, the role of IGF-I not as a neuroprotective molecule, but as a neurorepair factor had not been previously addressed and our results suggest its neurotrophic potential for diminishing the cognitive impairment even when the main cell death processes after injury had occurred.

We found that 12 days after the lesion, the extent of granule cell layer damage differed among subjects suggesting differences in individual vulnerability to KA. Interestingly, we observed that the lesion volume in the IGF-I treated group tend to be lower than in the saline treated group although given the variance of the lesion within this group the comparison between IGF-I and vehicle treated animals did not yield statistical significance.

In vivo studies have shown that exogenous administration of IGF-I induces neuronal progenitor cell proliferation in the DG as well as an increase in cell differentiation to neurons¹², and *in vitro* studies show that IGF-I is also fundamental to promote neuron maturation through its effects in the establishment of neuronal polarity¹⁵. Our results show that DCX is increased in both lesioned groups as compared to the sham animals. Although we did not detect differences in the number of DCX+ cells between lesioned groups, IGF-I promoted a pattern of complex neurite arborization in the new DCX positive neurons, which could be an indicative of rapid young cell maturation. Under pathological conditions, microglia releases IGFs, while astrocytic response after DG injury and that IGF-1 delivery did not exert an effect in the gliotic response in terms of density. However, it is recognized that astrocytic type may have beneficial or detrimental effects on the recovery of the injured tissue²⁹. In this study we did not analyze if the astrocytic phenotype was modified by IGF-I, but the molecule delivered exogenously could have found a target in proliferating astrocytes, thus promoting several plastic responses³⁰.

In the present work we did not address the effects of IGF-I in remaining non lesioned cells. It has been previously reported that IGF-I could modulate cognitive processes such as memory, as its decrease produces disrupted long term potentiation²⁴ a mechanism associated with memory formation. Thus, IGF-I may be exerting its functions on cells that survived the lesion therefore promoting the reorganization of the altered circuits. In this regard, IGF-I could have also had an effect in the remaining non damaged neurons through the regulation of synaptic plasticity, synapse density and neurotransmission. It has been reported that after hippocampal ischemic damage CA3 and CA2 layers display an increased synaptogenesis concomitant to functional recovery³¹. In this sense it is known that IGF-I stimulates axonal growth in hippocampal cultured neurons through signals triggered trough IGF-IR activation^{32, 33} and increases dendritic spine density in DG granule cells *in vivo*¹⁶. Insulin-like peptides modulate GABA_A³⁴ as well as NMDA receptor number³⁵ and incubation of hippocampal neurons with IGF-I increases the frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents³⁶. Thus it is feasible that after a lesion, IGF-I modulates synaptic integration and strength, a well accepted mechanism of plasticity underlying circuit remodeling in several conditions including brain damage³⁷.

In conclusion our findings provide evidence that IGF-I promotes plasticity in the adult hippocampus after damage and enhances memory recovery after DG lesion indicating that the delivery of this growth factor could be a therapeutic tool used as a strategy for enhance brain repair in adult life.

Acknowledgments

Author's contributions: ALM performed experiments, analyzed data and wrote paper; AAA performed experiments and analyzed data; CA designed study and wrote paper; AZ designed study, analyzed data and wrote paper.

Authors thank Patricia Ferrera and Miguel Tapia for technical assistance. This work was supported by grants from CONACyT 176589; PAPIIT, UNAM IA 200312.

List of abbreviations

Contextual fear conditioning and memory	CFCM
Contextual fear memory	CFM
Dentate Gyrus	DG
Doublecortin	DCX
Glial Fibrillary Acidic Protein	GFAP
Insulin-Like Growth Factor- I	IGF-I
Intracerebroventricular	ICV
KA	Kainic Acid
KA12d	Animals with kainic acid lesion.
	Osmotic minipump releasing 0.9%
	NaCl implanted at 5 days post-
	lesion (minipump duration: 7
	days). Behavioral evaluation
	performed at 12 days post-lesion.
KA12d + IGF-I	Animals with kainic acid lesion.
	Osmotic minipump releasing IGF-I
	implanted at 5 days post-lesion
	(minipump duration: 7 days).
	Behavioral evaluation performed at
	12 days post-lesion.

Sham 12d

NeuN

Animals with sham lesion injury and

behavioral evaluation 12 days after surgery

References

- [1] Carmichael, S.T.; Wei, L.; Rovainen, C.M.; Woolsey, T.A. New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. *Neurobiol. Dis.*, **2001**, *8*(5), 910-922.
- [2] Deller, T.; Frotscher, M. Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Prog. Neurobiol.*, **1997**, *53*(6), 687-727.
- [3] Bidmon, H.J.; Jancsik, V.; Schleicher, A.; Hagemann, G.; Witte, O.W.; Woodhams, P.; Zilles, K. Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience*, **1998**, 82(2), 397-420.
- [4] Zepeda, A.; Sengpiel, F.; Guagnelli, M.A.; Vaca, L.; Arias, C. Functional reorganization of visual cortex maps after ischemic lesions is accompanied by changes in expression of cytoskeletal proteins and NMDA and GABA(A) receptor subunits. *J. Neurosci.*, **2004**, *24*(8), 1812-1821.
- [5] Lois, C.; Alvarez-Buylla, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1993**, *90*(5), 2074-2077.
- [6] Kaplan, M.S.; Hinds, J.W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, **1977**, *197*(4308), 1092-1094.
- [7] Kuhn, H.G.; Dickinson-Anson, H.; Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci*, **1996**, *16*(6), 2027-2033.
- [8] Lee, I.; Kesner, R.P. Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus*, **2004**, *14*(3), 301-310.
- [9] McAllister, A.K.; Katz, L.C.; Lo, D.C. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, **1999**, 22, 295-318.
- [10] Fernandez, A.M.; Torres-Aleman, I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2012** *13*(4), 225-239.
- [11] Vicario-Abejon, C.; Yusta-Boyo, M.J.; Fernandez-Moreno, C.; de Pablo, F. 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.*, **2003**, *23*(3), 895-906.
- [12] Aberg, M.A.; Aberg, N.D.; Hedbacker, H.; Oscarsson, J.; Eriksson, P.S. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, **2000**, 20(8), 2896-2903.
- [13] Kouroupi, G.; Lavdas, A.A.; Gaitanou, M.; Thomaidou, D.; Stylianopoulou, F.; Matsas, R. Lentivirus-mediated expression of insulin-like growth factor-I promotes neural stem/precursor cell proliferation and enhances their potential to generate neurons. J. Neurochem., 2010, 115(2), 460-474.
- [14] Arsenijevic, Y.; Weiss, S.; Schneider, B.; Aebischer, P. Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. *J. Neurosci.*, **2001**, *21*(18), 7194-7202.
- [15] Sosa, L.; Dupraz, S.; Laurino, L.; Bollati, F.; Bisbal, M.; Caceres, A.; Pfenninger, K.H.; Quiroga, S. IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat. Neurosci.*, 2006, 9(8), 993-995.
- [16] Glasper, E.R.; Llorens-Martin, M.V.; Leuner, B.; Gould, E.; Trejo, J.L. Blockade of insulin-like growth factor-I has complex effects on structural plasticity in the hippocampus. *Hippocampus*, **2010**, 20(6), 706-712.
- [17] Guthrie, K.M.; Nguyen, T.; Gall, C.M. Insulin-like growth factor-1 mRNA is increased in deafferented hippocampus: spatiotemporal correspondence of a trophic event with axon sprouting. *J. Comp. Neurol.*, **1995**, *352*(1), 147-160.

- [18] Zepeda, A.; Aguilar-Arredondo, A.; Michel, G.; Ramos-Languren, L.E.; Escobar, M.L.; Arias, C. *Brain Struct Funct.*, **2012**, DOI 10.1007/s00429-012-0407-4
- [19] Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th edition ed. Academic Press: California, USA, **1998**.
- [20] Phillips, R.G.; LeDoux, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, **1992**, *106*(2), 274-285.
- [21] Saxe, M.D.; Battaglia, F.; Wang, J.W.; Malleret, G.; David, D.J.; Monckton, J.E.; Garcia, A.D.; Sofroniew, M.V.; Kandel, E.R.; Santarelli, L.; Hen, R.; Drew, M.R. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006, 103(46), 17501-17506.
- [22] LeDoux, J.E.; Cicchetti, P.; Xagoraris, A.; Romanski, L.M., J. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *Neurosci.* **1990**, *10*(4), 1062-1069.
- [23] Hernandez-Rabaza, V.; Hontecillas-Prieto, L.; Velazquez-Sanchez, C.; Ferragud, A.; Perez-Villaba, A.; Arcusa, A.; Barcia, J.A.; Trejo, J.L.; Canales, J.J. The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward . *Neurobiol. Learn. Mem.*, **2008**, *90*(3), 553-559.
- [24] Trejo, J.L.; Piriz, J.; Llorens-Martin, M.V.; Fernandez, A.M.; Bolos, M.; LeRoith, D.; Nunez, A.; Torres-Aleman, I. Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its procognitive effects. *Mol. Psychiatry*, 2007, 12(12), 1118-1128.
- [25] Lin, S.; Fan, L.W.; Rhodes, P.G.; Cai, Z. Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxicischemic brain injury in neonatal rats. *Exp. Neurol.*, **2009**, *217*(2), 361-370.
- [26] Miltiadous, P.; Stamatakis, A.; Koutsoudaki, P.N.; Tiniakos, D.G.; Stylianopoulou, F. IGF-I ameliorates hippocampal neurodegeneration and protects against cognitive deficits in an animal model of temporal lobe epilepsy. *Exp. Neurol.*, *231*(2), 223-235.
- [27] Aberg, N.D.; Brywe, K.G.; Isgaard, J. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal*, **2006**, *6*, 53-80.
- [28] Walter, H.J.; Berry, M.; Hill, D.J.; Logan, A. Spatial and temporal changes in the insulin-like growth factor (IGF) axis indicate autocrine/paracrine actions of IGF-I within wounds of the rat brain. *Endocrinology*, **1997**, *138*(7), 3024-3034.
- [29] Zamanian, J.L.; Xu, L.; Foo, L.C.; Nouri, N.; Zhou, L.; Giffard, R.G.; Barres, B.A. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci.*, **2012**, *32*(18), 6391-6410.
- [30] Song, H.; Stevens, C.F.; Gage, F.H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, **2002**, *417*(6884), 39-44.
- [31] Briones, T.L.; Suh, E.; Jozsa, L.; Woods, J. Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning. *Exp. Neurol.*, **2006**, *198*(2), 530-538.
- [32] Laurino, L.; Wang, X.X.; de la Houssaye, B.A.; Sosa, L.; Dupraz, S.; Caceres, A.; Pfenninger, K.H.; Quiroga, S. PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J. Cell Sci.*, **2005**, *118*(Pt 16), 3653-3662.
- [33] Pfenninger, K.H.; Laurino, L.; Peretti, D.; Wang, X.; Rosso, S.; Morfini, G.; Caceres, A.; Quiroga S. Regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J. Cell Sci.*, **2003**, *116*(Pt 7), 1209-1217.
- [34] Wan, Q.; Xiong, Z.G.; Man, H.Y.; Ackerley, C.A.; Braunton, J.; Lu, W.Y.; Becker, L.E.; MacDonald, J.F.; Wang, Y.T. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin *Nature*, **1997**, *388*(6643), 686-690.
- [35] Skeberdis, V.A.; Lan, J.; Zheng, X.; Zukin, R.S.; Bennett, M.V. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, 98(6), 3561-3566.
- [36] Xing, C.; Yin, Y.; Chang, R.; Gong, X.; He, X.; Xie, Z. Effects of insulin-like growth factor 1 on synaptic excitability in cultured rat hippocampal neurons. *Exp. Neurol.*, **2007**, *205*(1), 222-229.
- [37] Eysel, U.T.; Schweigart, G. Increased receptive field size in the surround of chronic lesions in the adult cat visual cortex. *Cereb Cortex*, **1999**, *9*(2), 101-109.



Fig 2







w crossed duadrants w crossed duadrants w o crossed duadrants w o







Fig 4



Fig 5

Fig 6

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Schematic representation of experimental procedures. On top of the time line experimental procedures are depicted; on bottom, days corresponding to each procedure. CFC contextual fear conditioning, CFM contextual fear memory and CuFM cued fear memory.

Fig. 2 Histological verification of the lesion site at 12 days post-lesion. Nissl staining representative micrographs captured at a 4X magnification. Micrographs show the lesion at anterior and posterior levels from injured subjects that received saline infusion (A, C) and IGF-I (B, D); scale bar: 0.5 mm. Insets show a 32X magnification of the regions shown in black frames; scale bar, 0.2 mm.

Fig. 3 Chronic infusion of IGF-I promotes contextual fear memory recovery. A) Freezing percent of time spent during the pretone period (120 s). All groups display a similar low freezing percentage of time in the conditioning context before the administration of tone–shock pairings. B) Percentage of time spent freezing during the conditioning session. Freezing time increases in all groups according to the presentation of tone–shock pairings; number of animals used (n) is depicted in parenthesis. C) Evaluation of freezing in the cued fear memory task. All groups display a similar percentage of time spent freezing. D) Freezing time spent in the contextual fear memory task. Freezing time is significantly decreased in the lesion group (KA12d) as compared to the sham group (*p<0.05) and freezing time is significantly increased in the lesion group which received chronic infusion of IGF-I (KA12d+IGF-I) as compared to the one that received a chronic vehicle infusion (KA12d) (***p<0.001). E) Performance in the open field task is not different among groups. Data represent mean \pm SE.

Figure 4. NeuN immunohistochemistry. Coronal sections representative of the lesion site at comparable anterorposterior coordinates show a similar region devoid of neurons in the DG of a saline treated (A) and an IGF-I treated subject (B). (C) Mean \pm SE of the volume of the lesion. Scale bar, 200µm

Fig. 5. GFAP immunohistochemistry. A coronal section representative area from a lesioned animal that received vehicle (A-C) or IGF-I (D-F) infusion is shown. NeuN in green (A, D); GFAP in red (B,E); merge (C,F). Arrows point at the damaged granular layer. G) Densitometric analysis of the GFAP signal in the lesioned granular layer; data represent mean \pm SE Scale bar, 100µm

Fig. 6. Doublecortin immunopositive cells. Representative sections showing DCX (green) and nuclei (red) from lesioned animals that received A) vehicle or; B) IGF-I infusion. C) Mean \pm SE of number of DCX immunopositive nuclei. Notice the increased expression of DCX in neurites from the IGF-I treated subject (arrows) and the lack of nuclei in the ventral layer of the DG (arrowheads). Scale bar, 100 μ m.

25