

Tesina de Grado
Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Córdoba



*Rol del IGF-1 en la formación de
una traza de memoria de miedo*

Tesinista: Leandro Gabriel Champarini

Directora: Dra. Claudia Beatriz Hereñú

Codirector: Dr. Gastón Diego Calfa

Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad
Nacional de Córdoba, Argentina. IFEC-CONICET





Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Rol de IGF-1 en la formación de una traza de memoria de miedo

Tesinista

Leandro Gabriel Champarini

Firma:

Director

Dra. Claudia Beatriz Hereñú

Firma:

Codirector

Dr. Gastón Diego Calfa

Firma:

Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad
Nacional de Córdoba, Argentina. IFEC-CONICET

“Rol de IGF-1 en la formación de la traza de una memoria de miedo”

Tribunal examinador:

Dra. Andrea B. Cragolini

Firma:.....

Dr. Daniel A. García

Firma:.....

Dr. Gustavo C. Baiardi

Firma:.....

Calificación:.....

Fecha:.....

Dedicado a mis amigas,
a Gonzalo,
a mis hermanos Facundo, Octavio y Mariano,
a mis padres Elisa y Luis.

Índice

Introducción.....	1
Memoria de miedo.....	2
Condicionamiento contextual de miedo.....	3
Circuitos cerebrales que participan en la formación de la memoria de miedo	4
Amígdala.....	5
Hipocampo.....	7
Espinas dendríticas.....	8
Factor de crecimiento insulino-simil 1 (IGF-1).....	11
Síntesis y distribución de IGF-1.....	12
Vías de señalización de IGF-I.....	13
Propiedades del IGF-1 en el sistema nervioso central.....	15
Potenciales mecanismos de acción.....	16
Objetivos e Hipótesis.....	18
Materiales y Métodos.....	19
Animales.....	20
Terapia Génica con IGF-1.....	20
Test de Conducta.....	21
Inmunohistoquímica.....	22
Western-Blot.....	22
Análisis de Espinas Dendríticas.....	22
Análisis estadístico.....	24
Resultados.....	25
Conclusión y discusión.....	35
Bibliografía.....	39

Introducción

MEMORIA DE MIEDO

Las especies utilizan distintas estrategias de vida para adaptarse a las demandas ambientales. En los animales, una de las principales demandas es evitar la depredación, y a la vez, cubrir necesidades biológicas esenciales como la alimentación. En consecuencia, la selección natural llevó a la formación de un sistema nervioso que optimizó un conjunto de mecanismos de supervivencia. Estos mecanismos están respaldados por diferentes circuitos neurales y su activación da lugar a respuestas comportamentales defensivas que son la fuente de diferentes estados: el miedo, la ansiedad y el pánico (Perusini & Fanselow, 2015). Estos términos están asociados a relaciones de causa y efecto. La causa está dada por la proximidad, certeza o probabilidad de la amenaza. El efecto es el conjunto de comportamientos que ocurren en cada estado.

Una determinada experiencia aversiva conlleva a una respuesta de miedo específica, la cual influencia el comportamiento y la fisiología del organismo. Esta respuesta defensiva es innata y especie-específica. Si bien este comportamiento se observa inmediatamente luego del evento traumático, puede persistir en el tiempo, incluso durante toda la vida del organismo. En este caso el aprendizaje se da mediante la asociación entre el ambiente y la amenaza que representa el estímulo aversivo, resultando en un mecanismo que protegerá al individuo cuando se presente una situación igual o similar. Es así que el miedo es crítico para la supervivencia de los animales (Byrne, Rajbhandari, et al., 2017).

En el ser humano, se han descripto diferentes patologías asociadas a déficits en la regulación de los mecanismos neuronales que participan en la formación de una memoria de miedo. Dentro de estos desórdenes se encuentran el síndrome de estrés post traumático, síndrome de ansiedad generalizada y ataques de pánico, entre otros. Comprender las bases de los procesos neurológicos involucrados en estas enfermedades es una de las principales metas de la neurociencia en la actualidad.

CONDICIONAMIENTO CONTEXTUAL DE MIEDO

Uno de los modelos utilizados para estudiar la formación de este tipo de memorias es el condicionamiento de miedo Pavloviano. La utilización del condicionamiento de miedo como modelo experimental está basada en el supuesto de que el miedo es un sistema motivacional defensivo que evolucionó a los fines de optimizar la supervivencia frente a amenazas ambientales. Cuando un animal es expuesto a un evento traumático, del cual no puede escapar, se induce la formación de un estado emocional negativo que activa circuitos neuronales dando lugar a comportamientos defensivos (Gastón Calfa et al., 2006; Isoardi et al., 2007; Manzanares et al., 2005; Martijena et al., 2002; Perusini & Fanselow, 2015). La activación de este sistema produce cambios altamente predecibles en el comportamiento y la fisiología, siendo, la magnitud de estos cambios proporcional al nivel de miedo que experimenta el organismo (Cushman & Fanselow, 2010).

En el condicionamiento de miedo Pavloviano, un estímulo neutral es acoplado a un estímulo aversivo para provocar una respuesta defensiva. El estímulo neutral es denominado estímulo condicionado (EC) y el estímulo aversivo, estímulo incondicionado (EI). Como resultado de este entrenamiento, el estímulo neutral adquiere la característica de ser percibido como aversivo y puede, por sí solo, generar una respuesta defensiva denominada respuesta condicionada.

En modelos de roedores dichas respuestas incluyen: comportamiento de inmovilización o *freezing*, alteraciones de la actividad del sistema nervioso autónomo, liberación de hormonas relacionadas al estrés, analgesia y facilitación de reflejos (Ehrlich et al., 2009).

En el condicionamiento de miedo *contextual*, los animales asocian el estímulo aversivo, al contexto en el que se presenta el EI. Así, el contexto de condicionamiento (EC) puede generar una respuesta condicionada de miedo. En este caso el animal asocia el EI a un contexto específico (EC) (Fig. 1).

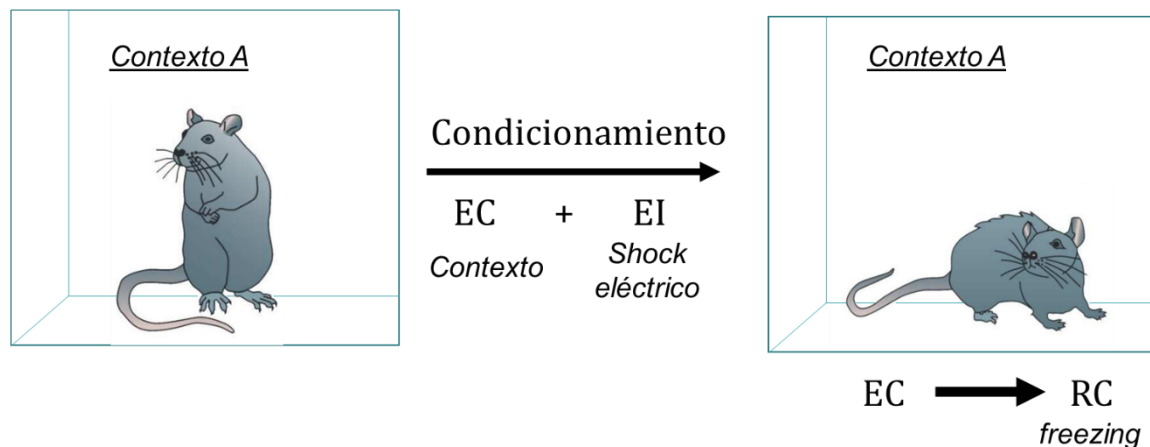


Fig. 1. Esquema representativo del protocolo de experimentación utilizado en el condicionamiento de miedo contextual.

El contexto puede ser definido como el marco multisensorial en donde ocurren los procesos cognitivos. Generalmente se considera estable, aunque puede poseer fluctuaciones y cambios de elementos discretos (Chaaya et al., 2018).

CIRCUITOS CEREBRALES QUE PARTICIPAN EN LA FORMACIÓN DE LA MEMORIA DE MIEDO

Existen dos estructuras del encéfalo que han sido identificadas como las regiones esenciales para la adquisición y consolidación de la memoria de miedo contextual: el hipocampo y el complejo basolateral de la amígdala.

Se propone que el hipocampo combina los elementos individuales que hacen al contexto y forma una representación unitaria del mismo. La información de esta representación es enviada a la amígdala, que simultáneamente recibe proyecciones somatosensitivas del estímulo incondicionado. Así la representación del contexto y estímulo

aversivo convergen en la amígdala, dando lugar a la respuesta defensiva. Este modelo simplificado fue propuesto por Jerry Rudy y Michael Fanselow (Fanselow, 2010) (Fig. 2).

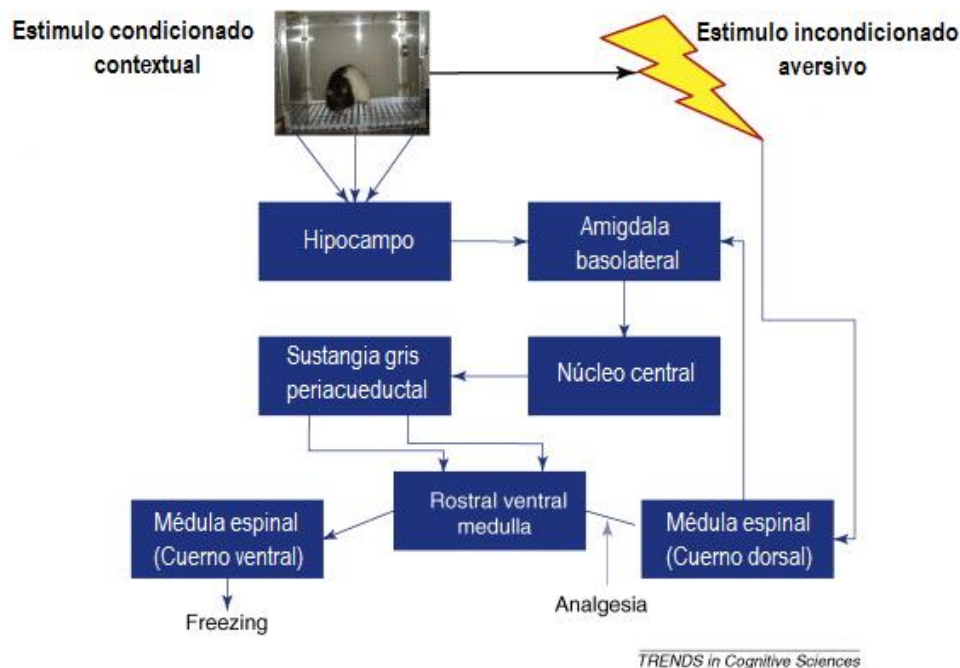


Fig. 2. Modelo del circuito de la formación de una memoria contextual de miedo propuesto por Rudy y Fanselow. (Modificado de Fanselow, 2010).

AMIGDALA

La amígdala es una de las estructuras clave para la adquisición de memorias de miedo (Fanselow & Poulos, 2005; J. LeDoux, 2000; Maren, 2001). Además, posee una función moduladora del aprendizaje, a través de la modulación de la acción en diferentes estructuras como la corteza y el hipocampo (McGaugh, 2004).

La amígdala está formada por subnúcleos anatómica y funcionalmente diferentes: el núcleo central (CEA), el núcleo lateral (LA) y el núcleo basal (BA). Estos dos últimos forman conjuntamente el complejo basolateral de la amígdala (BLA) (Fig. 3).

BLA es una estructura con una composición similar a la de la corteza compuesta en su mayoría de neuronas glutamatérgicas y en menor proporción interneuronas GABAérgicas (Fig. 3B). La porción lateral de la amígdala (LA), es el sitio de mayor entrada de información sensorial a la amígdala y recibe la mayor cantidad de aferentes somatosensoriales de diversas áreas. La porción basal recibe menos información directa de

áreas sensoriales, pero está conectada recíprocamente con otras regiones cerebrales como la corteza prefrontal y el hipocampo ventral.

BLA posee proyecciones hacia CEA. CEA contiene neuronas GABAérgicas en mayor proporción. Este núcleo es considerado la vía eferente más importante en cuanto a la expresión de respuestas emocionales. Posee conexiones desde la subdivisión medial del mismo hacia el tronco

cerebral, controlando respuestas conductuales y fisiológicas específicas (Fig. 3A). Rodeando BLA se encuentran pequeños grupos de neuronas GABAérgicas,

denominadas masas celulares intercalares

(ITC). Un grupo medio de ITC modula la interacción entre BLA y CEA.

Circuitos en BLA

Las vías desde BLA proyectan hacia las células intercalares que luego conectan con CEA. La excitación de las interneuronas inhibitorias conduce a la inhibición de la actividad de salida, mientras que su inhibición da lugar a un aumento de dicha actividad. En consecuencia, la expresión de respuestas comportamentales puede ser observada cuando las células intercalares inhiben a las neuronas inhibitorias presentes en CEA, perdiendo esta su control inhibitorio y resultando en un incremento en la excitabilidad de las neuronas glutamatérgicas (Isoardi et al., 2007) permitiendo la salida de la información desde el complejo (J. E. LeDoux, 2007).

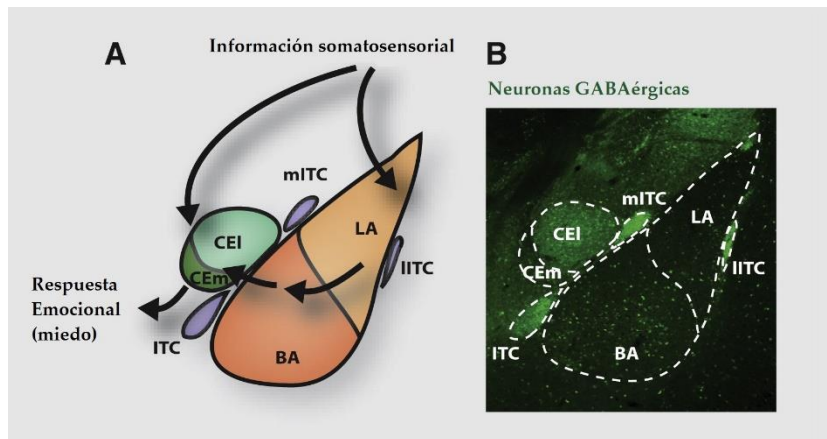


Fig. 3. Organización general de la amígdala. LA= Núcleo lateral BA= Núcleo Basal CEI y CEm= Núcleo Central. (Modificado de Ehrlich et al., 2009)

HIPOCAMPO

La amígdala posee conexiones con diferentes regiones del cerebro. A través de dichas conexiones es que la amígdala modula el componente emocional de las funciones cognitivas que se llevan a cabo en dichas regiones, como son los procesos de aprendizaje y memoria (McGaugh, 2004; McGaugh et al., 2002). Diferentes estudios sugieren que BLA interactúa, de forma directa e indirecta, con el hipocampo durante el proceso de consolidación de la memoria, modulando la actividad y plasticidad de diferentes regiones del mismo (Malin & McGaugh, 2006; Packard et al., 1994; Roozendaal et al., 1999).

Una de las funciones cognitivas atribuidas al hipocampo es la adquisición de mapas cognitivos espaciales, es decir, representaciones mentales del contexto físico en donde se encuentra el organismo (Goodman et al., 2017). Específicamente el hipocampo dorsal (HD) cumple un rol esencial en la representación contextual luego de un condicionamiento de miedo (Fanselow & Dong, 2010; Kim & Fanselow, 1992; Maren & Fanselow, 1997; Phillips & LeDoux, 1992).

Así, la evidencia sugiere que la modulación emocional de la memoria puede ser parcialmente atribuida a las vías aferentes y eferentes de BLA que inducen la plasticidad sináptica en áreas del circuito que se involucra en la formación de la memoria. La plasticidad sináptica se entiende como la reorganización de una sinapsis, acompañada por cambios morfológicos, funcionales y organizacionales en respuesta a un estímulo interno o externo persistente (Dyer et al., 2016).

ESPINAS DENDRÍTICAS

La mayoría de las sinapsis excitatorias del cerebro ocurren en las espinas dendríticas (Bourne & Harris, 2007). Las espinas dendríticas son pequeñas estructuras postsinápticas sobresalientes en la superficie de las dendritas (Fig. 4). Morfológicamente están compuestas por una cabeza y un cuello que conecta a la cabeza con la superficie dendrítica. En la cabeza se encuentra la densidad postsináptica (PSD) la cual posee receptores, canales y sistemas de señalización involucrados en la transmisión sináptica, así como proteínas involucradas en la plasticidad sináptica. Las espinas establecen el contacto sináptico con las terminales del axón y tienen como principal función la compartimentalización e integración de las señales locales (Valencia Segura et al., 2018; Yuste, 2013).

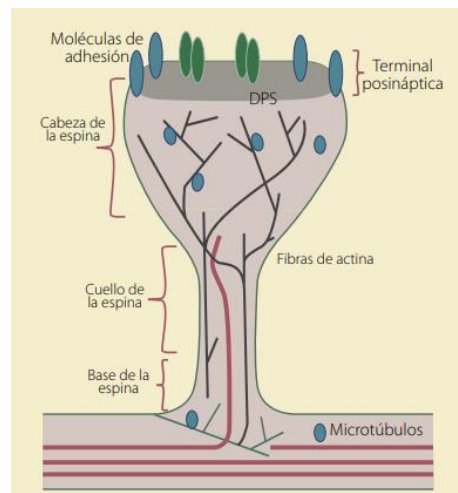


Fig. 4. Representación esquemática de una espina dendrítica en donde se esquematizan los elementos más representativos de su citoesqueleto. (Modificado de Segura et. al, 2017)

Esta estructura es mantenida por una red de citoesqueleto de actina, la cual funciona como una estructura de soporte para el posicionamiento estable de canales, proteínas de adhesión y estructuras como endosomas y densidades postsinápticas (Spence & Soderling, 2015).

Las espinas dendríticas pueden permanecer estables desde meses hasta años (Grutzendler et al., 2002; Trachtenberg et al., 2002), lo cual sería importante para la estabilidad de los circuitos neuronales. Aun así, pueden sufrir cambios morfológicos, de hecho, la plasticidad estructural de las espinas dendríticas está correlacionada con la plasticidad de circuitos neuronales durante el aprendizaje (Li et al., 2017; G. Yang et al., 2014; Guang Yang et al., 2009).

La potenciación a largo plazo (LTP) es una mejora perdurable de la transmisión sináptica como consecuencia de un estímulo o una tarea de aprendizaje. El efecto opuesto que lleva a una disminución de la fuerza sináptica es denominado depresión a largo plazo

(LTD). Ambos procesos de potenciación y depresión están asociados con aumento y disminución del tamaño de espinas dendríticas, respectivamente. Estos cambios de plasticidad estructural son propuestos como la base de la reorganización de circuitos a largo plazo durante el aprendizaje y la memoria (Kasai et al., 2010). En consecuencia, se asume que alteraciones dinámicas a corto plazo en la fuerza sináptica conducen a cambios morfológicos estables a largo plazo, denominados traza de una memoria (Byrne, Ammassari-Teule, et al., 2017).

La forma de las espinas dendríticas es importante para su función como compartimiento eléctrico o bioquímico de la sinapsis (Tsay & Yuste, 2004). Una característica interesante es la posibilidad de clasificar a las espinas según su morfología (Fig. 5):

1. Tipo I: Espinas pequeñas (“Stubby”): son espinas con cabeza grande y no poseen cuello visible. También son consideradas formas maduras.
2. Tipo II: Espinas con forma de hongo (“Mushroom”): esta clase de espinas poseen una gran cabeza y un cuello delgado y son ricas en F-actina y G-actina. Son consideradas formas maduras (Harris, 1999; Kasai et al., 2003; Segal & Andersen, 2000).
3. Tipo III: Espinas delgadas (“Thin”): son espinas con forma de filopodio, muy delgadas y sin cabeza visible.

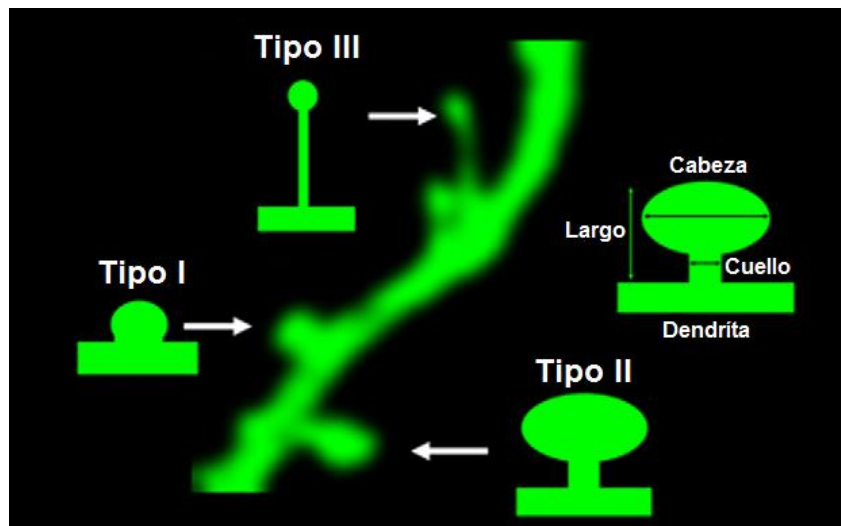


Fig. 5. Clasificación morfológica de las espinas dendríticas (Modificado de Chapleau et al., 2008).

La plasticidad estructural de las espinas también está acompañada por una reorganización molecular. A demás del rearrreglo del citoesqueleto de actina, se observan cambios en el tamaño de la densidad postsináptica y el número de receptores de glutamato (Bosch et al., 2014; Meyer et al., 2014).

En modelos experimentales, luego de la inducción de LTP en el hipocampo se ha observado un aumento en el volumen de la cabeza de espinas (Bourne & Harris, 2007). La evidencia sugiere que las espinas maduras poseen un rol esencial en los procesos de formación de la memoria. Esta conclusión proviene de diferentes características de las espinas maduras:

- poseen mayor densidad postsináptica, lo cual le permite anclar mayores receptores AMPA, haciendo que estas sinapsis sean funcionalmente más eficientes;
- poseen mayor retículo endoplásmico liso, lo que les concede la posibilidad de poder regular de forma más eficiente los niveles de Ca^{+2} localmente;
- poseen mayor cantidad de polirribosomas para síntesis local de proteínas;
- poseen procesos astrogiales peri sinápticos, los cuales pueden proveer estabilización sináptica y regulan los niveles de glutamato.

Factor de crecimiento insulino-simil 1 (IGF-1)

Los factores neurotróficos son moléculas, generalmente polipéptidos (neurotrofinas), que participan en diferentes procesos del sistema nervioso central y periférico. Poseen un rol muy importante en el desarrollo, donde regulan la diferenciación de las células madre-neuronales. Además, actúan en el sistema nervioso adulto, donde participan en la supervivencia neuronal, plasticidad sináptica y en procesos de aprendizaje y memoria. Por otra parte, en diferentes alteraciones neurodegenerativas como Alzheimer y Huntington se han descrito alteraciones en los niveles de neurotrofinas, así como también en desordenes psiquiátricos como depresión, ansiedad y abuso de sustancias (Platholi & Lee, 2018).

Diferentes hormonas y péptidos, relacionados en la homeostasis de la glucosa, tienen un gran impacto en la actividad neuronal (Mainardi et al., 2015). De hecho, estudios demuestran que moléculas tales como la insulina, el péptido glucagón-símil I, la grelina y el factor de crecimiento insulino-simil 1 (IGF-1), poseen ciertos efectos en la función hipocampal.

El IGF-1 es un péptido endógeno de cadena simple, que pertenece a una familia de péptidos estructuralmente relacionados con la insulina (Figura 6). Estas moléculas cumplen un rol importante tanto a nivel celular y tisular, en la regulación de la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, como en determinados aspectos del desarrollo y el crecimiento corporal.

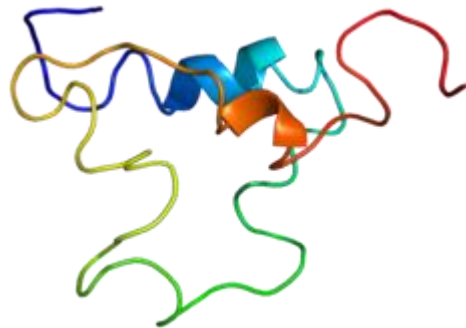


Fig. 6. Representación de la estructura molecular del factor de crecimiento insulino-simil I.

La familia de los IGFs incluye los polipéptidos IGF-1 e IGF-2. Estos ligandos poseen receptores específicos, IGF-1R e IGF-2R, respectivamente. También se han caracterizado seis proteínas de unión al factor de crecimiento, IGFBPs (del inglés: *IGF Binding Proteins*), además de proteasas de IGFBPs, que permiten la liberación de los IGFs.

Síntesis y distribución de IGF-1

El IGF-1 es principalmente sintetizado en el hígado. (Fig. 7) Esta síntesis está principalmente regulada por la hormona somatotropina (GH). La glándula pituitaria produce GH, que es transportada a diferentes tejidos incluyendo el hígado, principal blanco de esta hormona. La unión de GH a sus receptores en el hígado promueve la síntesis de IGF-1 mediante la estimulación de la transcripción del gen que codifica para este factor de crecimiento.

Una vez sintetizado, el IGF-1 circula por el torrente sanguíneo unido a IGFBP, la cual prolonga su vida media y transporta al factor hasta la superficie de sus células blanco (Abdel-Wahab et al., 2015). Además de la síntesis periférica también existe una síntesis

local de IGF-1 en el sistema nervioso central. Dicha producción se ejerce principalmente por las células micro gliales en su estadio M2 (Labandeira-Garcia et al., 2017). La expresión de ARNm de IGF-1 en el cerebro es relativamente baja en comparación con la de su receptor IGF1R lo que resalta la importancia del IGF-1 producido periféricamente (Dyer et al., 2016). Las células epiteliales del plexo coroideo y las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales expresan los niveles más altos de IGF1R en el cerebro. La presencia de estos receptores permite la entrada de IGF-1 desde la circulación sistémica al encéfalo mediante transcitosis (Fernandez & Torres-Alemán, 2012).

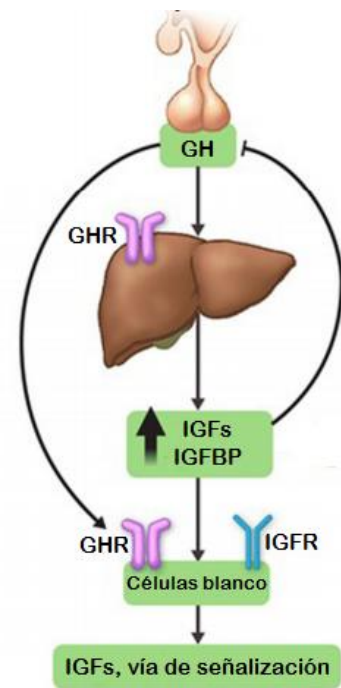


Fig. 7. Síntesis de IGF-I.

Vías de señalización de IGF-I

El receptor IGF1R es una proteína heterotetramérica constituida por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β intracelulares, unidas por puentes disulfuro (LeRoith et al., 1995).

Durante el desarrollo, los receptores IGF-1 se encuentran ampliamente distribuidos en corteza, hipocampo, cerebelo, hipotálamo, tronco encefálico y médula. Dicha expresión disminuye luego del nacimiento. En el cerebro adulto, los receptores son expresados principalmente en neuronas en áreas similares a las embriológicas, con mayores niveles de expresión en vasos y plexo coroideo (Fernandez & Torres-Alemán, 2012; Popken et al., 2004). Aunque los receptores de péptidos insulino-simil muestran una cierta inespecificidad en términos de sus ligandos, su activación siempre resulta en las mismas cascadas específicas de señalización intracelular. Un ejemplo bien estudiado, es que la unión de IGF-2 al receptor IGF-1R conduce a actividades similares a las provocadas por IGF-1 en el cerebro (Fernandez & Torres-Alemán, 2012).

La unión de IGF-1 a su receptor causa la autofosforilación de las subunidades β intracelulares, lo que provoca la activación enzimática y subsecuente fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1) en múltiples residuos de tirosina. Estos sitios fosforilados funcionan como sitios de anclaje para numerosas proteínas de señalización intracelular (Dyer et al., 2016) (Fig. 8). La activación de IGF-1R desencadena la vía de señalización de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3Kinase-Akt), la cual promueve el crecimiento y la maduración celular. IRS1 se une a PI3K que fosforila PIP2 a PIP3. PIP3 se une a dos proteínas quinasas: Akt y PDK1, provocando la activación de Akt, la cual actúa a nivel de numerosas proteínas de la célula para promover el crecimiento y la supervivencia celular. Los sustratos blanco de Akt incluye al complejo sensible a rapamicina (mTOR), el cual estimula la producción de ribosomas y la síntesis proteica (Burgos & Cant, 2010). Otro sustrato es la proteína pro-apoptótica BAD, que es inhibida por la fosforilación de Akt (Kiley et al., 2003). Otro de los efectos de la fosforilación del receptor de IGF-1 es la inhibición por fosforilación de la glicógeno sintasa pro-apoptótica 3β (GSK3 β), la cual está asociada con aumento del almacenamiento de glicógeno en neuronas de proyección en el cerebro

postnatal y con la reducción de la hiperfosforilación de la proteína tau, lo que causa muerte neuronal (Deak & Sonntag, 2012).

Además de la vía PI3K, IGF1R también activa la vía de las MAP quinasas. El receptor fosforila la proteína Sch, la cual recluta al complejo GRB2/SOS, activando el complejo Ras y así dando lugar a esta vía de señalización, relacionada con el crecimiento dependiente de transcripción y mitogénesis.

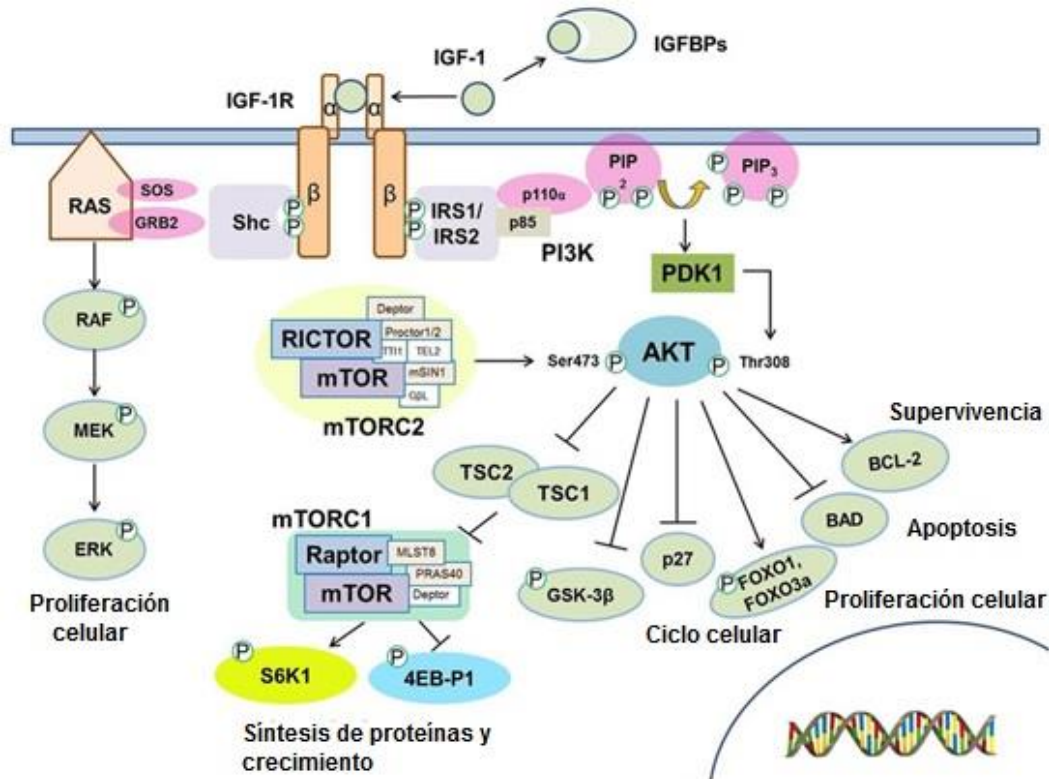


Fig. 8. Vías de señalización de IGF-1. (Modificado de Jung & Suh, 2014).

El rol de la vía ERK/MAPK en procesos cognitivos y de formación de la memoria

Se ha demostrado que la activación de la vía de señalización de las quinasas reguladas por señalización extracelular (ERKs), miembros de la familia de las MAP quinasas, poseen un rol importante en la plasticidad sináptica y procesos de formación de la memoria, y tareas de aprendizaje en diferentes áreas cerebrales (Giovannini, 2006).

De hecho, la vía de señalización ERK/MAPK posee un rol mayor en la emergencia de memorias de miedo y en los cambios plásticos en BLA asociados con el aprendizaje de

miedo (Maldonado et al., 2011). Se piensa que estas vías de señalización intracelular transducen los cambios dependientes de actividad, característicos de formas más cortas de plasticidad sináptica, en cambios estructurales y funcionales a largo plazo mediante la participación de activadores de la transcripción en el núcleo (Schafe et al., 1999).

Propiedades del IGF-1 en el sistema nervioso central

Neurogénesis

El hipocampo es una de las pocas áreas en donde la neurogénesis persiste durante la adultez. En los mamíferos, la zona subventricular y subgranular representan los dos nichos de neurogénesis en el cerebro adulto (Braun & Jessberger, 2014). Existe evidencia de que, en el hipocampo, neuronas recién generadas se integran a circuitos existentes, jugando un rol importante en procesos de memoria y aprendizaje (Mainardi et al., 2015).

Estudios llevados a cabo en modelos *in vitro* e *in vivo* sugieren que el IGF-1 promueve la neurogénesis hipocampal, al afectar la proliferación, diferenciación y supervivencia de células madre neuronales (Aberg et al., 2003; Brooker et al., 2000).

Sinaptogénesis y plasticidad sináptica

La mayoría de las sinapsis excitatorias se llevan a cabo en las dendritas, es así que la plasticidad sináptica es un fenómeno intrínsecamente dendrítico (Maheux et al., 2016). Dichos cambios plásticos se cree que son fundamentales para realizar varias funciones cerebrales, como el refinamiento de las conexiones durante el desarrollo, el aprendizaje y la memoria.

Se han utilizado diferentes modelos experimentales a los fines de dilucidar el potencial efecto del IGF-1 en procesos plásticos del sistema nervioso. En experimentos realizados en tejidos corticales se observó que el tratamiento con IGF-1 estimula la plasticidad estructural (Corvin et al., 2012). En experiencias *in vivo* en ratones knock-out para IGF-1 se observó que estos poseían un número reducido de espinas dendríticas en neuronas de la corteza y dendritas más cortas (Camarero et al., 2001; Cheng et al., 2003). También se ha observado que el tratamiento con suero anti IGF-1 en hipocampo adulto, impide el incremento en el número de espinas dendríticas en CA1, producido por la

actividad física (Glasper et al., 2009). Además, luego de la infusión intracerebroventricular de IGF-1 se comprobó un incremento del tamaño y el número de complejos de espinas de botón múltiple, así como también un aumento en la densidad postsináptica en el área CA1 del hipocampo (Shi et al., 2005).

Por último, estudios electrofisiológicos también proveen evidencia del efecto neuroplástico del IGF-1. La aplicación aguda de IGF-1 induce un aumento de la transmisión sináptica excitatoria de hasta un 40% en la región CA1 del hipocampo. Además, ratones mutantes que expresan niveles bajos de IGF-1 demostraron una completa falta de LTP en el hipocampo (Xing et al., 2006).

Cambios comportamentales

En cuanto a los efectos relacionados a funciones relacionadas con el cerebro, se han descrito algunos cambios en procesos de aprendizaje y memoria luego del tratamiento con IGF-1.

En ratones knock-out para IGF-1, se observó un déficit en el aprendizaje y la retención de la memoria en el test de Morris (laberinto acuático). Este fenómeno se observó desde los 2 meses de edad, persistiendo hasta los 18 meses (Svensson et al., 2006; Trejo et al., 2007). También se observó que en tratamiento con suero anti IGF-1 afectaba el aprendizaje de una tarea de evitación pasiva (Lupien et al., 2003).

Potenciales mecanismos de acción

Existen numerosos mecanismos propuestos a través de los cuales IGF-1 podría ejercer su efecto sobre la neuroplasticidad (Fig. 9). Mientras diferentes estudios abordan dichos procesos individualmente, sería correcto pensar que IGF-1 ejerce su acción a través de la combinación de los mismos. Cada uno de estos eventos estaría también sujeto a una especificidad espacial y temporal a los fines de incrementar la eficacia sináptica y la comunicación neuronal (Dyer et al., 2016).

Receptores glutamato

La modulación de la presencia de receptores de glutamato y la composición de las subunidades de los mismos es clave en la determinación del efecto de IGF-1 en la neuroplasticidad. A través de la activación de la vía PI3K, IGF-1 podría mejorar la incorporación de receptores glutamato en la espina dendrítica (Deak & Sonntag, 2012)

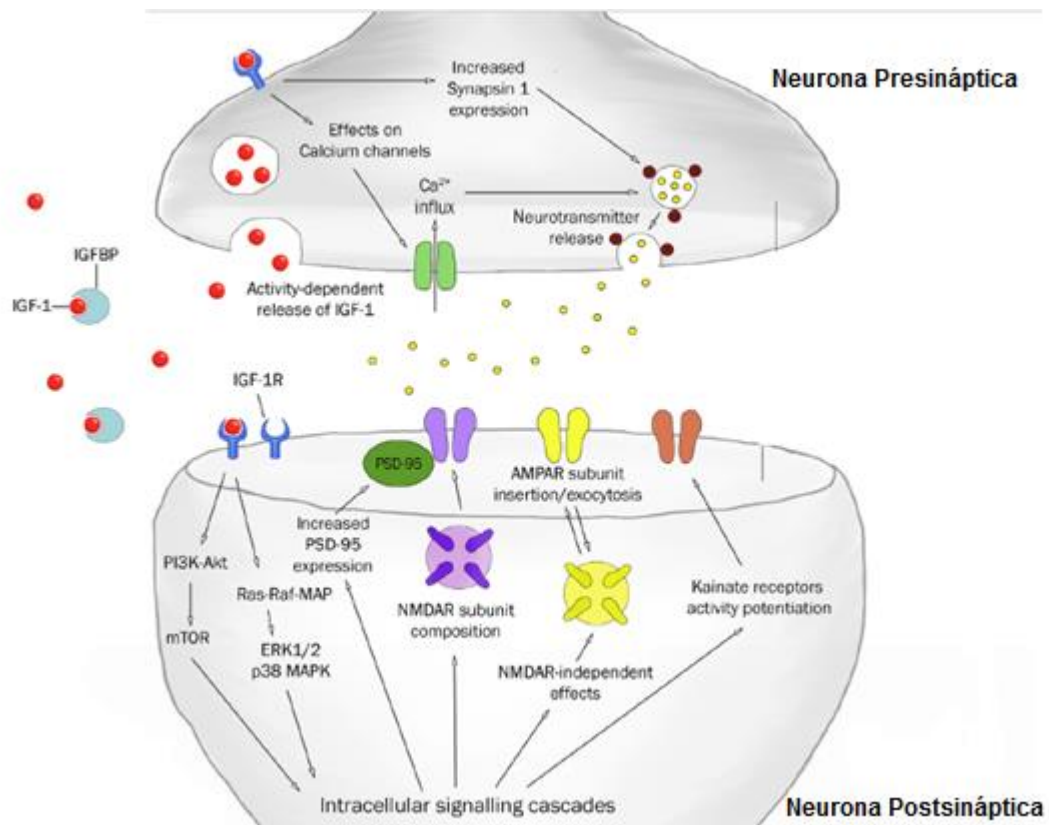


Fig. 9 Potenciales mecanismos de acción de IGF-1. (Modificado de Dyer, 2016)

El balance entre las distintas subunidades NR2B/NR2A (que conforman el receptor NMDA) refleja el potencial de plasticidad sináptica encontrándose modulado positivamente por IGF1 (Le Grevès et al., 2005).

Canales de Calcio

Otra forma que posee IGF-1 de actuar sobre la neuroplasticidad de las sinapsis glutamatérgicas es a través de la regulación de las corrientes de calcio. La activación de su receptor logra la fosforilación de canales dependientes de voltaje, incrementando el flujo de calcio hacia el medio intracelular y la consecuente liberación de neurotransmisores (Deak & Sonntag, 2012).

Movilización de vesículas

La elevación de concentración de calcio acciona la maquinaria para la exocitosis. Esta consiste en sensores de calcio (sinaptotagminas), proteínas del complejo SNARE (sinaptobrevina/VAMP, syntaxina1 y SNAP-25) y otras proteínas de unión que son esenciales para la correcta fusión de vesículas sinápticas en la zona activa. IGF-1 aumenta los niveles de expresión de syntaxina1 contribuyendo a la liberación de neurotransmisores (Corvin et al., 2012).

Hipótesis

IGF-1 en BLA se involucraría en el cambio plástico estructural de hipocampo dorsal como fenómeno neurobiológico preciso de la formación de la traza de memoria.

Objetivo General

Evaluar el rol de IGF-1 como modulador sináptico en BLA sobre la plasticidad estructural hipocampal, subyacente a la formación de la traza de memoria.

Objetivos Específicos

Objetivo Específico 1. Evaluar la participación de IGF-1 en la formación de una traza de memoria.

Objetivo Específico 2. Evaluar los niveles de ERK 1/2 (vía de segundos mensajeros de la activación del receptor de IGF-1) en BLA, antes del condicionamiento contextual.

Objetivo Específico 3. Evaluar si los cambios plásticos estructurales en HD los cuales serían promovidos la acción neurotrófica de IGF1, son los responsables de la formación de la traza de memoria.

Materiales y Métodos

Animales

Ratas macho adultas (Wistar) fueron alojadas en cajas estándares de plástico con comida y agua ad libitum y fueron utilizadas a partir del segundo mes de vida (200-230 g de peso). En todos los experimentos con animales se siguieron las pautas provistas por el Comité CICUAL de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (protocolos aprobados Exp. 0030807/2018 Res. 1221 y Exp. 0000314/2017 Res. 1195).

Vectores adenovirales utilizados

RAAd-IGF-1. Vector recombinante adenoviral portador del cDNA para ratIGF-1 El transgén se encuentra bajo el control del promotor de citomegalovirus murino (mCMV).

Vector control: RAAd-DsRed. Adenovector que expresa el gen de la proteína fluorescente roja DsRed2 de *Discosoma sp* (promotor mCMV).

Ambos vectores fueron construidos por el método de los dos plásmidos (Microbix), amplificados en la línea celular embrionarias de riñón humano (HEK293), purificados en gradientes de CsCl, dializados y finalmente titulados por el método de dilución en placas (experiencia previa del grupo de trabajo Hereñú et al., 2006, 2007, 2009; Mitschelen et al., 2011; Nishida et al., 2011; Sanchez et al., 2008).

Terapia Génica con IGF-1

Para realizar la cirugía estereotáxica los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina (55mg/Kg, intraperitoneal) / xilazina (11mg/Kg, intraperitoneal). Luego fueron posicionados en un aparato estereotáxico. Una cánula de infusión guía (30G, longitud de 12mm) se conectó a través de una vía de polietileno a una micro jeringa de 10ml (Hamilton) montada en una bomba de micro infusión. La cánula se posicionó en las coordenadas pertinentes para poder inyectar en amígdala basolateral: **Antero-Posterior:** -2.8 mm **Medio-Lateral:** ± 4.8 mm y **Dorso-Ventral:** -8.4 mm; -8 mm. Se infundieron 0.75 μ l por hemisferio, de una solución que contenía los vectores virales **RAAd-DsRed** (1×10^{13} pfu/ μ l) o **RAAd-IGF-1** (1×10^{13} pfu/ μ l).

Conducta Condicionamiento en Contexto A (7 días posteriores a la cirugía)

Este experimento se realizó dentro de una sala de conducta, acústicamente aislada. La cámara de condicionamiento, de 20x23x40cm, está formada por paredes de acrílico blancas, una tapa transparente, un piso de barras de metal de 4mm de grosor y separadas entre sí por 1.5cm. La misma está dividida en izquierda y derecha (IZQ y DER) por un panel de acrílico negro. Luego de armar la cámara, se conecta la fuente por donde es transmitida la corriente a la rejilla de metal.

En el curso del experimento, una vez dentro de la cámara de condicionamiento, el animal permaneció 3 minutos en un período de aclimatación (período pre-shock). Luego se aplicó un estímulo de 0.5 mA durante 3 segundos y el animal continuó 50 segundos más en la cámara (período post-shock).

Durante ambos períodos, pre- y post-shock, se midió en el tiempo de "*freezing*", considerado como la condición en que el animal se encuentra inmóvil, con sus cuatro patas en el suelo y la cabeza hacia adelante.

Test 1 en Contexto A (24 h posteriores al condicionamiento)

Los animales fueron expuestos al contexto en donde recibieron el estímulo (cámara de condicionamiento), respetando el lado (IZQ o DER) en el que recibieron el condicionamiento y durante un período de 5 minutos se midió el tiempo de *freezing*.

Test 2 en Contexto A (7 días posteriores al Test 1)

Los animales fueron expuestos al contexto en donde recibieron el estímulo (cámara de condicionamiento), respetando el lado (IZQ o DER) en el que recibieron el condicionamiento y durante un período de 5 minutos se midió el tiempo de *freezing*.

Test de la Plancha Caliente

Para la evaluación de nocicepción, los animales fueron expuestos a una plancha con una temperatura de 54°C, y se medirá en el tiempo que tardan en reaccionar, levantando alguno de los miembros anteriores, durante un período de 90 segundos.

Test 1 y 2 en un contexto nuevo (Contexto B)

Para evaluar si la respuesta conductual estaba asociada a un contexto específico, se realizaron los test 1 y 2 en un contexto diferente (Contexto B) al del condicionamiento (Contexto A). El contexto B consiste en dos cajas de madera enfrentadas, de color negro, con un piso de goma y una tapa transparente. Los animales fueron colocados dentro de la caja, respetando el lado (IZQ o DER) en el que recibieron el condicionamiento y se midió en tiempo de *freezing* durante un período de 5 minutos.

Inmunohistoquímica

La evaluación estereológica de las estructuras de interés se realizó utilizando una variante simplificada del método del fraccionador óptico. En cada animal, uno de cada 6 cortes contiguos (40 μ m) fue seleccionado para obtener un grupo de secciones seriadas no-contiguas, las que fueron procesadas por IHQ usando anticuerpos comerciales contra IGF-1 (Anti-IGF-1 Antibody, clone Sm1.2). Se utilizó Vectastain Universal ABC kit como sistema de detección (Vector Labs, Burlingame, CA) y la 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB; Sigma, St. Louis, MO) como cromógeno. Imágenes de los cortes fueron obtenidas utilizando un microscopio Leica DM 4000 B asociado a un software y una cámara digital Leica DFC. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa "Image Composite Editor".

Western-Blot

Seis días posteriores a la cirugía, los animales fueron sacrificados. Se les extrajo el cerebro y este fue colocado en una matriz acrílica, rodeada por hielo. Se realizaron cortes coronales de 2 mm en la zona de la amígdala y esta fue extraída con un sacabocado. Las estructuras provenientes de ambos hemisferios fueron disgregadas en homogeneizadores conteniendo RIPA y sus correspondientes inhibidores de proteasas (Ortovanadato, PMSF y NP40) a 4° C. Luego las muestras fueron sonicadas y centrifugadas, y se midió el volumen final del sobrenadante. Para la cuantificación de proteínas se usó la técnica de Bradford. 35 mg de la muestra fueron colocados en cada uno de los carriles de un gel SDS-PAGE al 4% y

la corrida se realizó en un gel SDS-PAGE al 10%. Luego la muestra fue transferida a una membrana de fluoruro de polivinilideno. La membrana se bloqueó con leche al 5 % diluida en buffer TTBS por 1 h a temperatura ambiente y luego incubadas durante toda la noche a 41 °C con un anticuerpo primario anti-ERK1/2MAPK fosforilada (rabbit, 1:1000; Cell Signaling Technologies). Al día siguiente fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado a peroxidasa (1:1000, CellSignaling), por 2 h a temperatura ambiente y revelados usando quimioluminiscencia en placas.

La membrana fue recuperada* para, posteriormente, hacer el revelado de ERK1/2 total. Se incubó durante toda la noche a 41 °C con anticuerpo primario anti-ERK1/2MAPK (mouse, 1:2500; Cell Signaling Technologies). Al día siguiente fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a peroxidasa (1:2500, CellSignaling), por 2 h a temperatura ambiente y revelados usando quimioluminiscencia en placas.

La señal de las placas fue cuantificada usando los programas “Adobe Photoshop CC” e “ImageJ”.

*la recuperación de la membrana se realizó mediante un lavado con metanol por 5 minutos a temperatura ambiente.

Espinas Dendríticas

Animales administrados con la terapia adenoviral en BLA, fueron sacrificados 1 día posterior a la evocación de la traza de la memoria. Luego del sacrificio y la extracción de cerebro se obtuvieron rebanadas de 200 μm de cortes coronales de hipocampo dorsal. Las muestras se preservaron en una solución PFA 50% y PBS 50%. En rebanadas fijadas se procedió a administrar un colorante fluorescente (DiI, Probe, Eugene, OR) en regiones apicales del árbol dendrítico (Región hipocampal CA1). Posteriormente se colocó la rebanada en una solución conteniendo PFA 4% para su fijación durante 12 h. Luego se montó en porta objetos y fue visualizada por medio de un microscopio confocal (Olympus IX81). Secciones ópticas en el eje Z fueron adquiridas a pasos de 0.1 μm . El software “ImageJ” fue utilizado para el posterior análisis.

Densidad de espinas: Las mismas fueron identificadas como protrusiones pequeñas que se extienden no más de $3\mu\text{m}$ desde la dendrita pariente. Solamente espinas que aparecieron en forma continua con la dendrita fueron cuantificadas. El largo de la dendrita fue medido y el número de espinas fue normalizado por $10\mu\text{m}$ de dendrita.

Morfología de espinas: Las mismas fueron clasificadas en tres categorías: Tipo I o espinas cortas (denominadas en la literatura de habla inglesa como “stubby”) las cuales carecen en cierta medida de cuello; Tipo II o espinas que se asemejan a hongos (“mushrooms”) las cuales presentan una cabeza amplia, con un cuello corto y angosto; y Tipo III que son espinas finas, largas y cabeza pequeña (Calfa et al., 2012; Tyler & Pozzo-Miller, 2003). Espinas individuales fueron incluidas en cada categoría, basado en la relación específica de L/d_{cu} y d_{ca}/d_{cu} , en donde L es el largo de la espina desde la base de la dendrita hasta la punta de la misma, d_{cu} es el diámetro máximo del cuello, y d_{ca} es el diámetro máximo de la cabeza.

Análisis estadístico

Los datos comportamentales fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido de tests a posteriori apropiados y pruebas T de Student. El análisis de datos de espinas dendríticas y Western-Blot se realizó mediante pruebas T de Student. Se utilizó el programa Prism GraphPad 6 para el análisis estadístico.

Resultados

Objetivo Específico 1. Evaluar la participación de IGF-1 en la expresión de una traza de memoria.

Experimento 1. Sobreexpresión de IGF-1 en BLA

Para poder visualizar la sobreexpresión de IGF-1 en la zona de la amígdala, se tomaron imágenes de cortes coronales, los cuales fueron previamente procesados con inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-IGF-1.

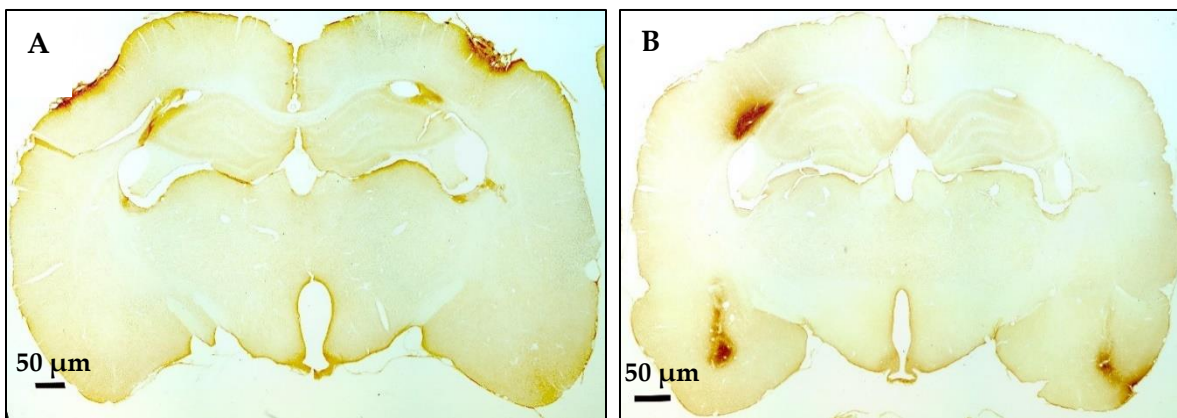


Figura 10. Inmunohistoquímica para IGF-1. A. Corte coronal de cerebro de rata tratada con RAD-DsRed. B. Corte coronal de rata tratada con RAD-IGF-1.

Con un aumento de 2,5x (Fig. 10), se observa en ambos cortes la diferencia de expresión en la zona del complejo basolateral de la amígdala (ubicación estereotóxica de BLA: **Antero-Posterior:** -2.8 mm **Medio-Lateral:** ± 4.8 mm y **Dorso-Ventral:** -8.4 mm; -8 mm). La sobreexpresión exógena de IGF-1 se observa marcadamente en las ratas tratadas con RADIGF-1, no así en el grupo tratado con RAD-DsRed. En ambos cortes se observa también en la zona de entrada de la cirugía, una fuerte expresión de IGF-1. Esto podría deberse a la respuesta inmunitaria de la microglía presente en la zona de la lesión. Las células de la microglía han sido descritas como las principales responsables de la síntesis local de IGF-1 en el sistema nervioso central (detalles en introducción).

Para un mayor detalle de la zona de interés, BLA, se muestran imágenes a mayor aumento (20x) (Fig. 11). Las dos imágenes superiores muestran un corte obtenido de un animal tratado con RAd-DsRed y en las dos imágenes inferiores un corte de un animal tratado con RAdIGF-1.

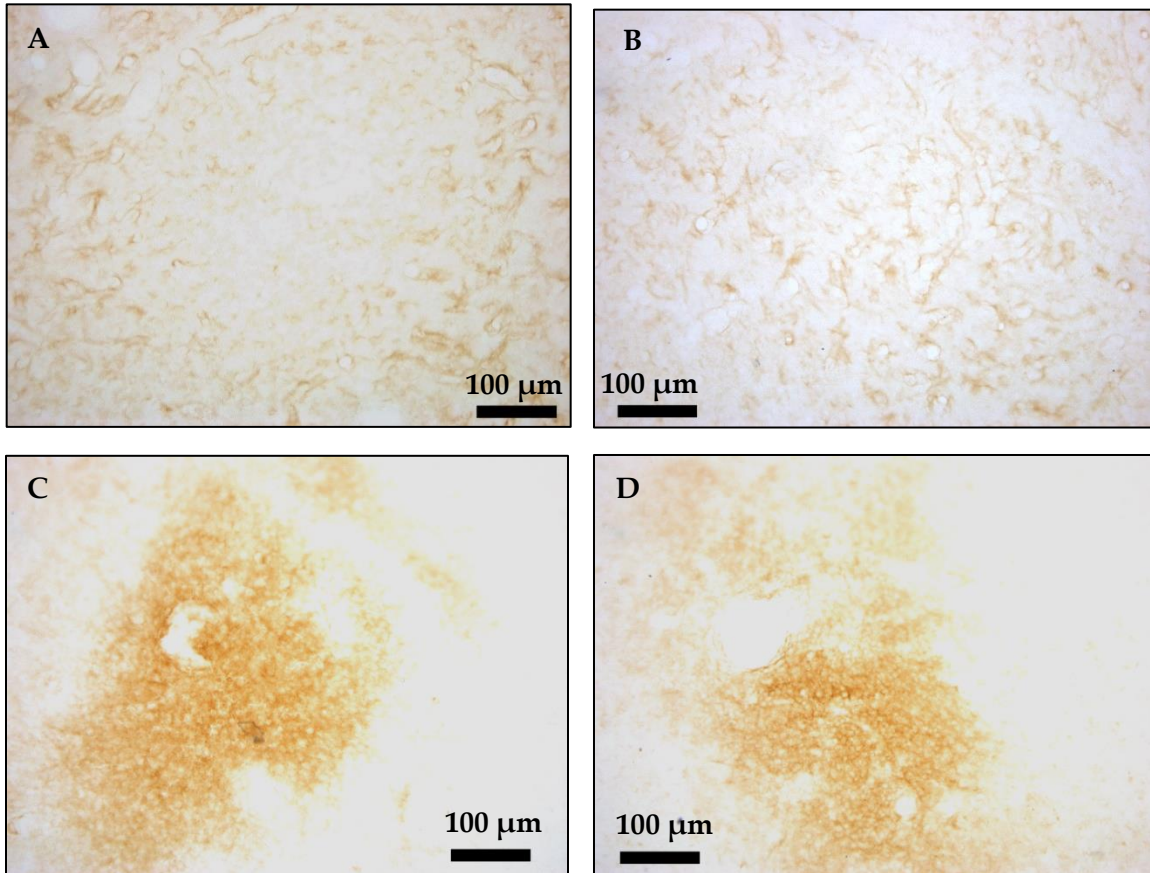


Figura 11. Inmunohistoquímica para IGF-1. Complejo basolateral de la amígdala (20X). A y B. Hemisferio Izquierdo (A) y Derecho (B) RAd-DsRed. C y D. Hemisferio Izquierdo (C) y Derecho (D) RAdIGF-1.

Experimento 2: Evaluación de la traza de memoria

Para la evaluación conductual de la formación de la traza de memoria, un grupo de 18 animales fue aleatoriamente asignado a dos grupos experimentales: un grupo recibió la terapia con RAd-IGF-1 y el restante fue inoculado con RAd-DsRed.

Condicionamiento Contexto A

Ambos grupos de animales fueron colocados en la cámara de condicionamiento siete días posteriores a la cirugía, en donde recibieron el estímulo condicionado (EI). El ANOVA a dos vías para el porcentaje de freezing a tiempos pre- y post-EI arrojó un efecto significativo del condicionamiento independientemente del tratamiento ($F_{(1, 34)} = 89,75$; $p < 0,0001$). En la Fig. 13 A se observan los resultados obtenidos para el condicionamiento en el contexto A.

Test 1

El día posterior al condicionamiento, cuando las ratas fueron expuestas nuevamente a la caja de condicionamiento durante 5 minutos, los animales tratados con RAdIGF-1 presentaron un nivel elevado de tiempo de freezing con respecto a los animales tratados con RAd-DsRed. El grupo con el tratamiento de IGF-1 obtuvo una media de 49,83% mientras que el grupo control una media de 32,69%. T-test: $t = 5,067$; $p < 0,0001$. (Fig. 13 B).

Test 2

7 días posteriores al condicionamiento, se observaron resultados similares, en donde el grupo tratado con RAdIGF-1 presentó un mayor porcentaje de tiempo de freezing que el grupo control. Aunque en este test la diferencia fue menor, el grupo tratado con RAdIGF-1 obtuvo una media de 49,23% y el grupo control de 36,05%. T-test: $t = 3,335$; $p = 0,0039$ (Fig. 13 C).

Test de la plancha caliente

En cuanto a la evaluación nociceptiva, ambos grupos de animales percibieron el estímulo a tiempos similares. T-test: $t = 0,02$; $p = 0,98$. (Fig. 13 D).

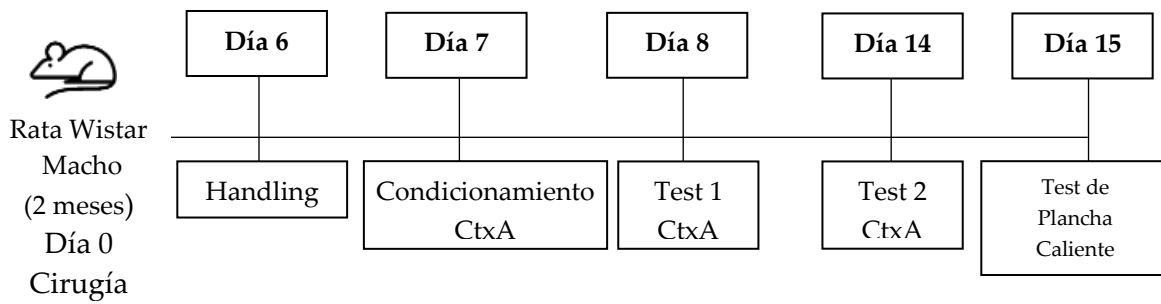


Fig. 12. Esquema del protocolo experimental para el análisis de la traza de memoria en el contexto A.

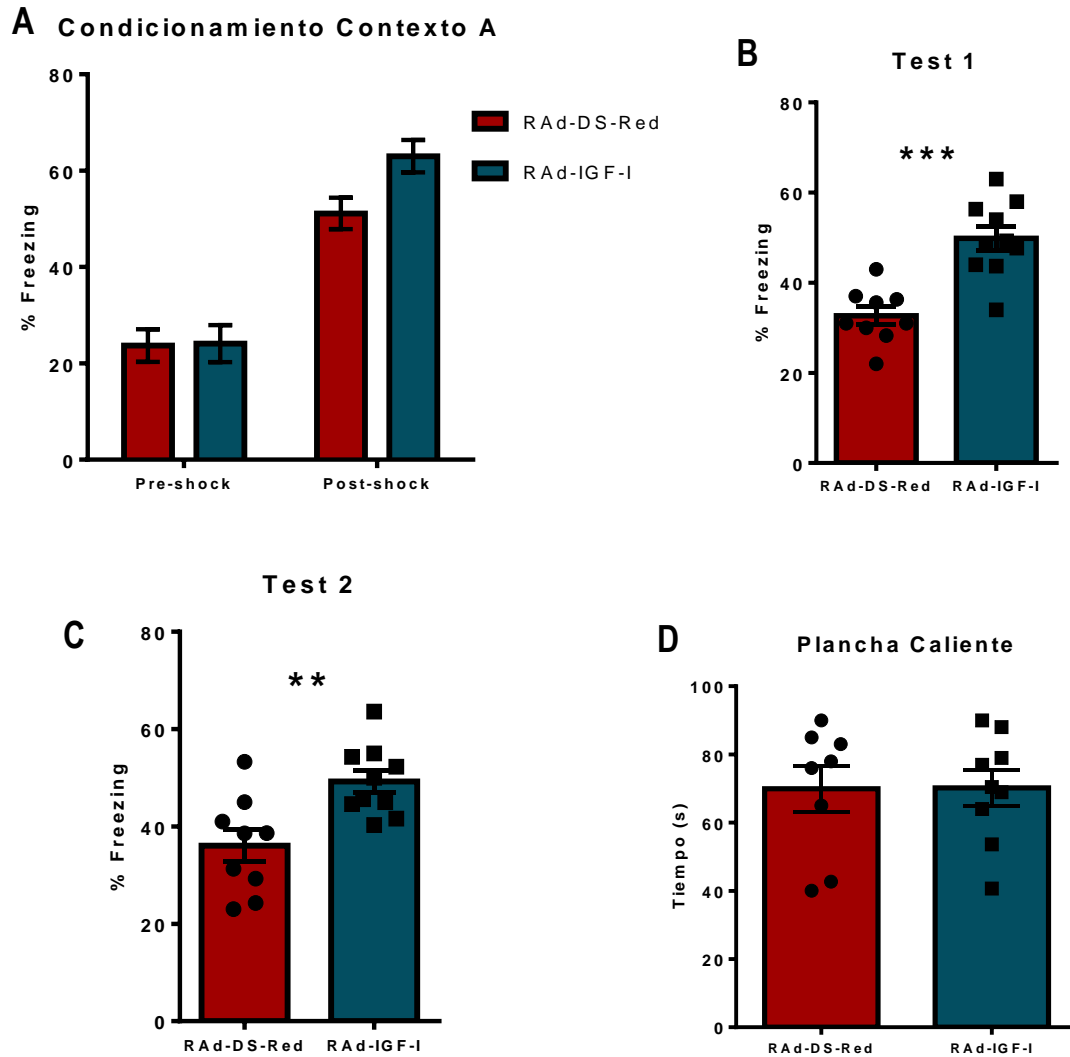


Figura 13. **A) Condicionamiento en contexto A:** Pre Shock: porcentaje de tiempo de freezing antes del estímulo. Post Shock: porcentaje de tiempo de freezing después del estímulo. ANOVA a dos vías. ($F_{(1, 34)} = 2,684$ $p = 0,11$). **B) Test 1:** Evaluación de la memoria contextual de miedo 24 h después del entrenamiento. ($t = 5,067$; $p < 0,0001$). **C) Test 2:** Evaluación de la memoria contextual de miedo 14 días después del entrenamiento ($t = 3,335$; $p = 0,0039$) **D) Evaluación nociceptiva en plancha caliente:** ($t = 0,02$; $p = 0,98$). Los datos están representados por la media \pm SEM. (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,0001$; $n = 8-9$).

Experimento 3: Evaluación de la traza de memoria en un contexto diferente.

Con el fin de evaluar la asociación entre la respuesta y un contexto específico se realizó el mismo protocolo de condicionamiento detallado anteriormente. Al igual que los animales utilizados para ser testeados en el mismo contexto, ambos grupos de animales fueron colocados en la cámara de condicionamiento siete días posteriores a la cirugía, en donde recibieron el estímulo condicionado (EI). El ANOVA a dos vías para el porcentaje de freezing a tiempos pre- y post-EI arrojó un efecto significativo del condicionamiento independientemente del tratamiento ($F_{(1, 24)} = 23,26$; $P < 0,0001$). En la Fig. 14 A se observan los resultados obtenidos para el condicionamiento en el contexto A.

Test 1 en contexto B

Como se esperaba el porcentaje de la respuesta de freezing de ambos grupos no fue diferente, al ser expuestos a un contexto nuevo con respecto al contexto en donde se recibió el condicionamiento. T-test: $t = 0,9861$; $p = 0,3435$ (Fig. 15 B).

Test 2 en contexto B

7 días posteriores al condicionamiento, se observaron resultados similares, en donde nuevamente no se observaron diferencias en el porcentaje del tiempo de freezing entre ambos grupos. T-test: $t = 0,9056$; $p = 0,3829$ (Fig. 15 C).

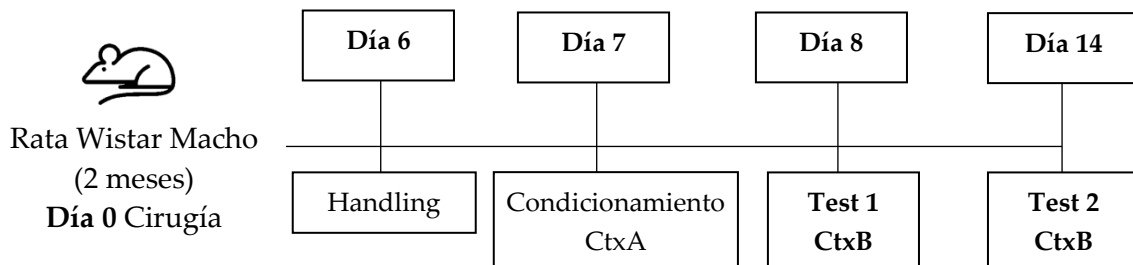


Fig. 14. Esquema del protocolo experimental para el análisis de la traza de memoria en el contexto B.

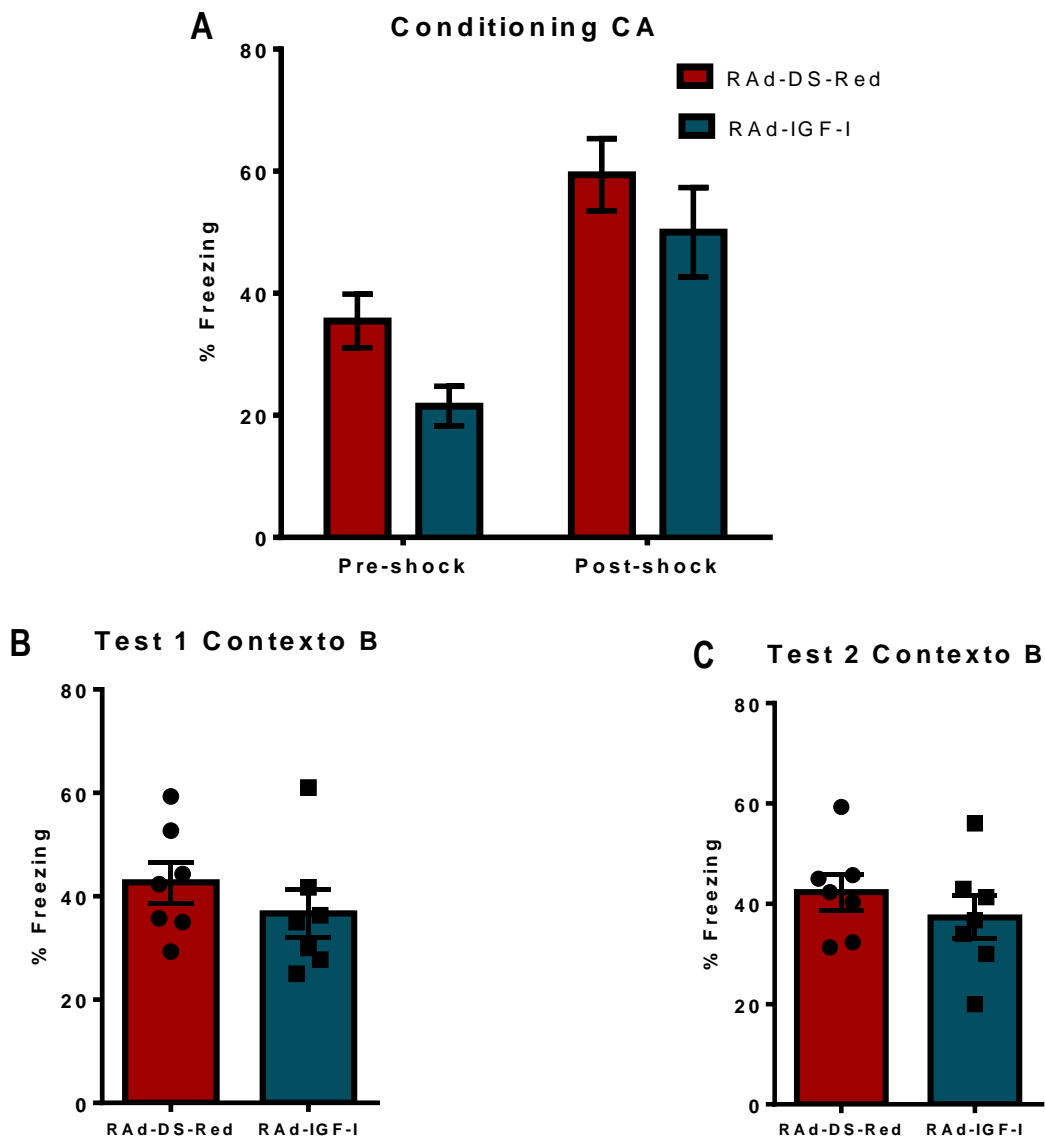


Figura 15. A) Condicionamiento en contexto A: *Pre Shock: porcentaje de tiempo de freezing antes del estímulo. Post Shock: porcentaje de tiempo de freezing después del estímulo. ANOVA a dos vías. [F (1, 24) = 0,1734; p = 0,680]. B) Test 1 en contexto B:* *Evaluación de la memoria contextual de miedo 24 h después del entrenamiento. (t= 0,9861; p = 0. 3435). C) Test 2 en contexto B:* *Evaluación de la memoria contextual de miedo 14 días después del entrenamiento (t=0,9056; p = 0.3829). Los datos están representados por la media ± SEM. n = 7*

Objetivo Específico 2. Evaluar los niveles de ERK 1/2 (vía de segundos mensajeros de la activación del receptor de IGF-1).

En la figura 17 A se observan los resultados obtenidos para la evaluación de los niveles de ERK fosforilada (pERK) con respecto a ERK total (ERK). Para el grupo control se obtuvo una media de 0,57, mientras que para el grupo tratado con RAdIGF-1 se obtuvo una media de 1,17. Si bien no se observó una diferencia significativa, se observa que existe una tendencia, con un $n=3$ y $p=0,051$, en donde la relación pERK/ERK tiende a ser mayor en el grupo tratado con RAdIGF-1 que el grupo control, tratado con RAd-DsRed.

En la figura 17 B se muestra la placa de revelado, tanto para pERK como para ERK. Del lado izquierdo el grupo de animales tratado con RAd-DsRed y del lado derecho los animales tratados con RAdIGF-1.



Fig. 16. Esquema del protocolo experimental para la evaluación del análisis de los niveles proteicos de ERKp/ERKT.

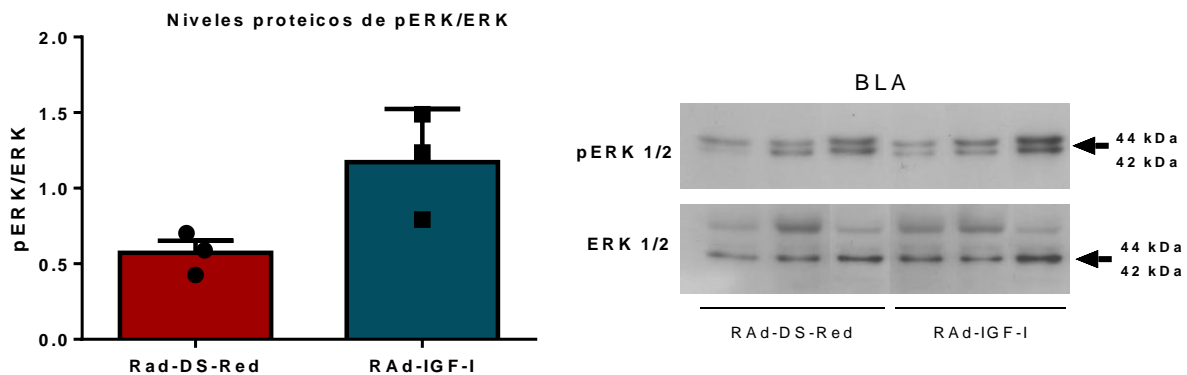


Fig. 17. A) Resultados obtenidos para el análisis de los niveles proteicos de ERKp/ERKT. Las barras representan la media ± SEM de ERKp/ERKT expresada como densidad óptica ($t= 2,74$ $p=0.0519$ $n=3$). B) Placas reveladas con ambas proteínas ERKp y ERKT.

Objetivo Específico 3. Evaluar si los cambios plásticos estructurales en HD los cuales serían promovidos por la acción neurotrófica de IGF1, son los responsables de la expresión de la traza de memoria.

Con el fin de evidenciar si el tratamiento con RAd-IGF-1 en BLA es capaz de inducir cambios plásticos estructurales en la región CA1 del hipocampo, un grupo de seis ratas fue aleatoriamente asignado a dos grupos: un grupo recibió la terapia con RAd-IGF-1 y, el grupo control, fue inoculado con RAd-DsRed. El análisis de la densidad y clasificación de espinas dendríticas, se llevó a cabo en un total de 42 segmentos dendríticos: RAd-DsRed: 20 segmentos; 628,17 μm y 3 ratas. RAdIGF-1: 22 segmentos; 671,73 μm y 3 ratas.

En la figura 19 A se muestran los resultados de la cuantificación para el total de espinas dendríticas. Los resultados se expresan en cantidad de espinas por cada 10 μm de dendrita analizada. Lo observado es que entre ambos grupos no existe una diferencia significativa en el número de espinas totales. T-test: $t= 0,84$ $p=0,462$.

En cambio, en el análisis de las espinas maduras (fig. 19 B), si se observaron diferencias significativas entre los grupos. T-test: $t=5,099$ $p=0.0063$. El número de espinas maduras fue mayor en el grupo tratado con RAd-IGF-1. En contraste, en el análisis de las espinas finas (fig. 19 C) se observó que éstas fueron significativamente mayores en el grupo RAd-DsRed. $t= 4,244$ T-test: $p= 0,0001$.

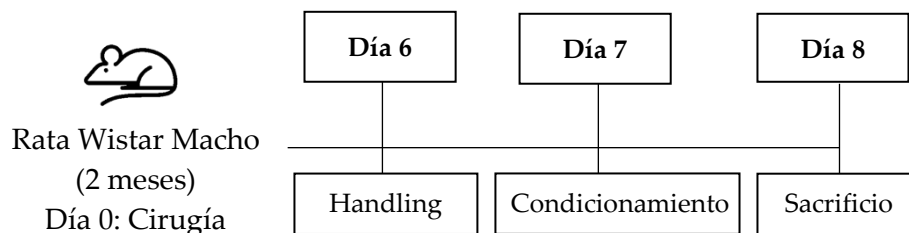


Fig. 18. Esquema del protocolo experimental para el análisis de espinas dendríticas (realizado el Día 8).

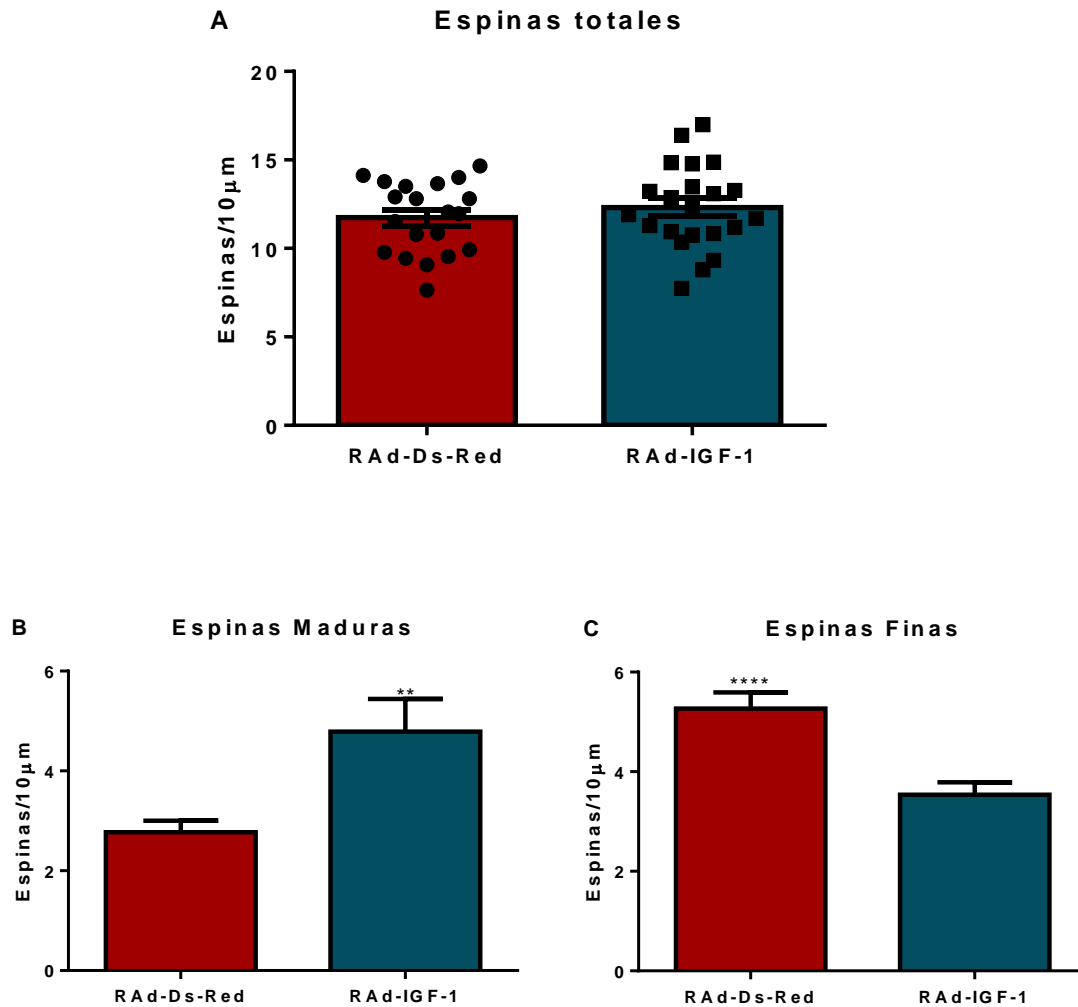


Fig. 19. Análisis cuantitativo de espinas dendríticas. A) *Espinas dendríticas totales.* RAd-DsRed: 11,74 espinas/10 μm IGF-1: 12,31 espinas/10 μm. ($t= 0,84$ $p=0,462$) B) *Espinas dendríticas maduras.* RAd-DsRed: 2,77 espinas/10 μm RAdIGF-1: 4,79 espinas/10 μm. ($t=2,804$ $p=0,006$) C) *Espinas dendríticas finas.* RAd-DsRed: 5,27 espinas/10 μm RAdIGF-1: 3,54 espinas/10 μm ($t= 4,244$ $p= 0,0001$). Data representada como media ± SEM. $n= 20-22$ dendritas/3 ratas/ 628-671 μm.

Conclusión y Discusión

Se encuentran establecidos en hipocampo, cognición y memoria, los posibles campos efectores de IGF-1, reportándose que es una de las moléculas estimuladora del metabolismo de la glucosa, aportando energía para la biosíntesis de neurotransmisores por lo que facilitaría circuitos hipocampales en cuanto a plasticidad, transmisión y estructura sináptica, así como también participando en aspectos neurogénicos modificando aprendizaje, memoria y funcionalidad cognitiva (Deak & Sonntag, 2012; Liquitaya-Montiel et al., 2012; Mainardi et al., 2015). Además, a través de la activación de PI3K, IGF-1 podría estar involucrado en la incorporación y transporte de receptores glutamatérgicos en espinas dendríticas (Deak & Sonntag, 2012). No obstante, escasa literatura refiere a estudios sobre el rol de los factores de crecimiento en memorias aversivas. Se ha reportado que el tratamiento sistémico con IGF-2 antes del condicionamiento mejora la retención y persistencia de distintas memorias de trabajo, a corto y largo plazo, incluyendo memorias de condicionamiento de miedo (Stern et al., 2014). Agis-Balboa y Fischer, sugieren que se establece un patrón específico de células granulares de DG-CA3 en la recuperación de las memorias de miedo, participando específicamente la señalización de IGF-2 (mediada indirectamente por IGF1R) como regulador esencial tanto de la neurogénesis del hipocampo adulto como de la extinción del miedo (Agis-Balboa & Fischer, 2014). Estos estudios también están sostenidos por Burgdorf et al. (2017), sugiriendo que IGFBP2 posee efectos símil-terapéuticos en múltiples modelos de estrés postraumático en ratas, en donde IGFBP2 facilitaría la plasticidad estructural al nivel de las espinas dendríticas (Burgdorf et al., 2017).

Uno de los factores de crecimiento estudiados en la formación de una memoria de miedo, es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Se observó que BDNF está involucrado tanto en el proceso de formación de una memoria de miedo, como también en cambios plásticos estructurales en hipocampo dorsal (Gaston Calfa et al., 2012; Giachero et al., 2013).

En el presente trabajo de tesina, el abordaje con el Adenovector portador del cDNA para IGF 1 fue desde BLA. Se observó que el tratamiento con el factor de crecimiento induce una mayor expresión del comportamiento de inmovilización en animales tratados bajo un protocolo de condicionamiento débil. Estos resultados indicarían un efecto facilitador y/o

promotor de IGF-1 en los procesos de formación/expresión de una traza de memoria de miedo. Al tener en cuenta el modelo de circuito de interconexión BLA-corteza -Hipocampo mencionado previamente, IGF-1 en BLA proporcionaría un estado propicio para la formación de este tipo de memorias.

No se observaron diferencias entre grupos respecto al comportamiento de inmovilización cuando las ratas fueron testeadas en un contexto diferente, sugiriendo que IGF-1 posee una acción potenciadora sobre la memoria asociativa. Con este protocolo, podemos inferir que la memoria de miedo fue un proceso selectivo del contexto en donde fueron condicionados los animales (Contexto A). En consecuencia, la exposición al mismo contexto, en donde el animal recibió el condicionamiento es necesaria para observar dichos cambios comportamentales.



Podemos concluir también, que uno de los mecanismos a través de los cuales IGF-1 estaría actuando es la vía de señalización MAPK/ERK, la cual se encontró aumentada al momento del condicionamiento (relación de ERKp/ERKT en BLA). Estos resultados obtenidos muestran una clara tendencia ($n=3$; $p=0,0051$) debiendo procesar restantes muestras disponibles en futuros estudios.

El análisis de espinas dendríticas, no mostró diferencias entre grupos en relación a su número total; sin embargo, existe un cambio estructural en hipocampo dorsal (CA1) en cuanto a la morfología de las mismas. El cambio plástico se evidenció con un incremento hipocampal de espinas maduras en animales tratados con RAd-IGF-1 vs su contraparte control. Debido a características específicas descritas previamente, se ha hipotetizado que las espinas maduras cumplen un rol esencial en los procesos de formación de la memoria. Así sugiere que el IGF-1 en BLA tiene un efecto sobre la plasticidad estructural en el hipocampo, más detalladamente en la morfología de las espinas, siendo éste el proceso detrás de la respuesta comportamental observada.

Como comentarios finales, podemos mencionar que el proceso de formación/expresión de memorias aversivas, involucra diferentes estructuras cerebrales y conexiones entre ellas, dando lugar a mecanismos complejos. La disfuncionalidad de estos circuitos neuronales, dan como resultados desórdenes de ansiedad, síndrome de estrés post

traumático, síndrome de ansiedad generalizada, entre otros. Profundizar en los mecanismos que subyacen a estos procesos mnésicos es crítico al momento de desarrollar tratamientos nuevos y efectivos para estos desordenes. Resultan de gran aporte futuro en memorias aversivas la exploración y manipulación, mediada por IGF 1 en este caso, de procesos plásticos que involucren cambios comportamentales, sinápticos y/o estructurales donde el hipocampo y BLA poseen un rol esencial.

En resumen, los resultados de esta tesina de grado permitieron profundizar sobre la formación de la traza de una memoria de miedo, la participación de la vía BLA-hipocampo y evidenciar el rol del factor de crecimiento IGF-1 en el mencionado circuito.



Bibliografía

1. Abdel-Wahab, R., Shehata, S., Hassan, M. M., Habra, M. A., Eskandari, G., Tinkey, P. T., ... Kaseb, A. O. (2015). Type I insulin-like growth factor as a liver reserve assessment tool in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 2, 131–142.
2. Aberg, M. A. I., Aberg, N. D., Palmer, T. D., Alborn, A.-M., Carlsson-Skwirut, C., Bang, P., ... Eriksson, P. S. (2003). IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 24(1), 23–40.
3. Agis-Balboa, R. C., & Fischer, A. (2014). Generating new neurons to circumvent your fears: the role of IGF signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(1), 21–42.
4. Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014). Structural and Molecular Remodeling of Dendritic Spine Substructures during Long-Term Potentiation. *Neuron*, 82(2), 444–459.
5. Bourne, J., & Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 381–386.
6. Braun, S. M. G., & Jessberger, S. (2014). Review: Adult neurogenesis and its role in neuropsychiatric disease, brain repair and normal brain function. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(1), 3–12.
7. Brooker, G. J., Kalloniatis, M., Russo, V. C., Murphy, M., Werther, G. A., & Bartlett, P. F. (2000). Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *Journal of Neuroscience Research*, 59(3), 332–341.
8. Burgdorf, J., Colechio, E. M., Ghoreishi-Haack, N., Gross, A. L., Rex, C. S., Zhang, X.-L., ... Moskal, J. R. (2017). IGF2BP2 Produces Rapid-Acting and Long-Lasting Effects in Rat Models of Posttraumatic Stress Disorder via a Novel Mechanism Associated with Structural Plasticity. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 20(6), 476–484.
9. Burgos, S. A., & Cant, J. P. (2010). IGF-1 stimulates protein synthesis by enhanced signaling through mTORC1 in bovine mammary epithelial cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 38(4), 211–221.
10. Byrne, J. H., Ammassari-Teule, M., & Segal, M. (2017). Dendritic Spine Plasticity and Memory Formation. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, 199–215.
11. Byrne, J. H., Rajbhandari, A. K., Tribble, J. E., & Fanselow, M. S. (2017). Neurobiology of Fear Memory. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, 487–503.
12. Calfa, G., Chapleau, C. A., Campbell, S., Inoue, T., Morse, S. J., Lubin, F. D., & Pozzo-Miller, L. (2012). HDAC activity is required for BDNF to increase quantal neurotransmitter release and dendritic spine density in CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus*, 22(7), 1493–1500.
13. Calfa, G., Volosin, M., & Molina, V. A. (2006). Glucocorticoid receptors in lateral septum are involved in the modulation of the emotional sequelae induced by social defeat. *Behavioural Brain Research*, 172(2), 324–332.
14. Camarero, G., Avendano, C., Fernandez-Moreno, C., Villar, A., Contreras, J., de Pablo, F., ... Varela-Nieto, I. (2001). Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal IGF-1-deficient mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), 7630–7641.
15. Chaaya, N., Battle, A. R., & Johnson, L. R. (2018). An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 92, 43–54.
16. Cheng, C. M., Mervis, R. F., Niu, S.-L., Salem, N., Witters, L. A., Tseng, V., ... Bondy, C. A. (2003). Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. *Journal of Neuroscience Research*, 73(1), 1–9.
17. Corvin, A. P., Molinos, I., Little, G., Donohoe, G., Gill, M., Morris, D. W., & Tropea, D. (2012). Insulin-like growth factor 1 (IGF1) and its active peptide (1–3)IGF1 enhance the expression

- of synaptic markers in neuronal circuits through different cellular mechanisms. *Neuroscience Letters*, 520(1), 51–56.
18. Cushman, J. D., & Fanselow, M. S. (2010). Fear Conditioning. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*, 524–531.
 19. Deak, F., & Sonntag, W. E. (2012). Aging, synaptic dysfunction, and insulin-like growth factor (IGF)-1. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 67 A(6), 611–625.
 20. Dyer, A. H., Vahdatpour, C., Sanfeliu, A., & Tropea, D. (2016). The role of Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) in brain development, maturation and neuroplasticity. *Neuroscience*, 325, 89–99.
 21. Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciochi, S., Herry, C., & Lüthi, A. (2009). Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron*, 62(6), 757–771.
 22. Fanselow, M. S. (2010). From contextual fear to a dynamic view of memory systems. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(1), 7–15.
 23. Fanselow, M. S., & Dong, H.-W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65(1), 7–19.
 24. Fanselow, M. S., & Poulos, A. M. (2005). The Neuroscience of Mammalian Associative Learning. *Annual Review of Psychology*, 56(1), 207–234.
 25. Fernandez, A. M., & Torres-Alemán, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(4), 225–239.
 26. Giachero, M., Bustos, S. G., Calfa, G., & Molina, V. A. (2013). A BDNF sensitive mechanism is involved in the fear memory resulting from the interaction between stress and the retrieval of an established trace. *Learning and Memory*, 20(5), 245–255.
 27. Giovannini, M. G. (2006). The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in memory encoding. *Reviews in the Neurosciences*, 17(6), 619–634.
 28. Glasper, E. R., Llorens-Martin, M. V., Leuner, B., Gould, E., & Trejo, J. L. (2009). Blockade of insulin-like growth factor-I has complex effects on structural plasticity in the hippocampus. *Hippocampus*, 20(6), NA-NA.
 29. Goodman, J., McIntyre, C., & Packard, M. G. (2017). Amygdala and Emotional Modulation of Multiple Memory Systems. In *The Amygdala - Where Emotions Shape Perception, Learning and Memories*. InTech.
 30. Grutzendler, J., Kasthuri, N., & Gan, W.-B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, 420(6917), 812–816.
 31. Harris, K. M. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(3), 343–348.
 32. Hereñú, C. B., Cristina, C., Rimoldi, O. J., Becú-Villalobos, D., Cambiaggi, V., Portiansky, E. L., & Goya, R. G. (2007). Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Therapy*, 14(3), 237–245.
 33. Hereñú, C. B., Morel, G. R., Bellini, M. J., Reggiani, P. C., Sosa, Y. E., Brown, O. A., & Goya, R. G. (2006). Gene Therapy in the Neuroendocrine System. In *Pituitary Today: Molecular, Physiological and Clinical Aspects* (Vol. 35, pp. 135–142). Basel: KARGER.
 34. Hereñú, C. B., Sonntag, W. E., Morel, G. R., Portiansky, E. L., & Goya, R. G. (2009). The ependymal route for insulin-like growth factor-1 gene therapy in the brain. *Neuroscience*, 163(1), 442–447.
 35. Isoardi, N. A., Bertotto, M. E., Martijena, I. D., Molina, V. A., & Carrer, H. F. (2007). Lack of feedback inhibition on rat basolateral amygdala following stress or withdrawal from sedative-hypnotic drugs. *European Journal of Neuroscience*, 26(4), 1036–1044.
 36. Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., & Noguchi, J. (2010). Structural

- dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 121–129.
37. Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*, 26(7), 360–368.
 38. Kiley, S. C., Thornhill, B. A., Tang, S.-S., Ingelfinger, J. R., & Chevalier, R. L. (2003). Growth factor-mediated phosphorylation of proapoptotic BAD reduces tubule cell death in vitro and in vivo. *Kidney International*, 63(1), 33–42.
 39. Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5057), 675–677.
 40. Labandeira-Garcia, J. L., Costa-Besada, M. A., Labandeira, C. M., Villar-Cheda, B., & Rodríguez-Perez, A. I. (2017). Insulin-Like Growth Factor-1 and Neuroinflammation. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 365.
 41. Le Grevès, M., Le Grevès, P., & Nyberg, F. (2005). Age-related effects of IGF-1 on the NMDA-, GH- and IGF-1-receptor mRNA transcripts in the rat hippocampus. *Brain Research Bulletin*, 65(5), 369–374.
 42. LeDoux, J. (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23(1), 155–184.
 43. LeDoux, J. E. (2007). The amygdala. *Current Biology*, 17(20), R868–R874.
 44. LeRoith, D., Neuenschwander, S., Wood, T. L., & Henninghausen, L. (1995). Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 inhibit involution of the mammary gland following lactation: Studies in transgenic mice. *Progress in Growth Factor Research*, 6(2–4), 433–436.
 45. Li, W., Ma, L., Yang, G., & Gan, W.-B. (2017). REM sleep selectively prunes and maintains new synapses in development and learning. *Nature Neuroscience*, 20(3), 427–437.
 46. Liquitaya-Montiel, A., Aguilar-Arredondo, A., Arias, C., & Zepeda, A. (2012). Insulin growth factor-I promotes functional recovery after a focal lesion in the dentate gyrus. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 11(7), 818–828.
 47. Lupien, S. B., Bluhm, E. J., & Ishii, D. N. (2003). Systemic insulin-like growth factor-I administration prevents cognitive impairment in diabetic rats, and brain IGF regulates learning/memory in normal adult rats. *Journal of Neuroscience Research*, 74(4), 512–523.
 48. Maheux, J., Froemke, R. C., & Sjöström, P. J. (2016). Functional plasticity at dendritic synapses. In *Dendrites* (pp. 505–556). Oxford University Press.
 49. Mainardi, M., Fusco, S., & Grassi, C. (2015). Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. *Neural Plasticity*, 2015.
 50. Maldonado, N. M., Martijena, I. D., & Molina, V. A. (2011). Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a weak training: Reversal by midazolam pretreatment. *Behavioural Brain Research*, 225(1), 77–84.
 51. Malin, E. L., & McGaugh, J. L. (2006). Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6), 1959–1963.
 52. Manzanares, P. A. R., Isoardi, N. A., Carrer, H. F., & Molina, V. A. (2005). Previous Stress Facilitates Fear Memory, Attenuates GABAergic Inhibition, and Increases Synaptic Plasticity in the Rat Basolateral Amygdala. *Journal of Neuroscience*, 25(38), 8725–8734.
 53. Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian Fear Conditioning. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 897–931.
 54. Maren, S., & Fanselow, M. S. (1997). Electrolytic Lesions of the Fimbria/Fornix, Dorsal Hippocampus, or Entorhinal Cortex Produce Anterograde Deficits in Contextual Fear Conditioning in Rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67(2), 142–149.

55. Martijena, I. D., Rodríguez Manzanares, P. A., Lacerra, C., & Molina, V. A. (2002). Gabaergic modulation of the stress response in frontal cortex and amygdala. *Synapse*, 45(2), 86–94.
56. McGaugh, J. L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories os emotionally arousing experiences. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 1–28.
57. McGaugh, J. L., McIntyre, C. K., & Power, A. E. (2002). Amygdala Modulation of Memory Consolidation: Interaction with Other Brain Systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), 539–552.
58. Meyer, D., Bonhoeffer, T., & Scheuss, V. (2014). Balance and Stability of Synaptic Structures during Synaptic Plasticity. *Neuron*, 82(2), 430–443.
59. Mitschelen, M., Yan, H., Farley, J. A., Warrington, J. P., Han, S., Hereñú, C. B., ... Sonntag, W. E. (2011). Long-term deficiency of circulating and hippocampal insulin-like growth factor I induces depressive behavior in adult mice: a potential model of geriatric depression. *Neuroscience*, 185, 50–60.
60. Nishida, F., Morel, G. R., Hereñú, C. B., Schwerdt, J. I., Goya, R. G., & Portiansky, E. L. (2011). Restorative effect of intracerebroventricular insulin-like growth factor-I gene therapy on motor performance in aging rats. *Neuroscience*, 177, 195–206.
61. Packard, M. G., Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1994). Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18), 8477–8481.
62. Perusini, J. N., & Fanselow, M. S. (2015). Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety. *Learning & Memory*, 22(9), 417–425.
63. Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 106(2), 274–285.
64. Platholi, J., & Lee, F. S. (2018). Neurotrophic Factors. *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, 55–64.
65. Popken, G. J., Hodge, R. D., Ye, P., Zhang, J., Ng, W., O’Kusky, J. R., & D’Ercole, A. J. (2004). In vivo effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on prenatal and early postnatal development of the central nervous system. *European Journal of Neuroscience*, 19(8), 2056–2068.
66. Roozendaal, B., Nguyen, B. T., Power, A. E., & McGaugh, J. L. (1999). Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11642–11647.
67. Sanchez, H. L., Silva, L. B., Portiansky, E. L., Herenu, C. B., Goya, R. G., & Zuccolilli, G. O. (2008). Dopaminergic mesencephalic systems and behavioral performance in very old rats. *Neuroscience*, 154(4), 1598–1606.
68. Schafe, G. E., Nadel, N. V, Sullivan, G. M., Harris, A., & LeDoux, J. E. (1999). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 6(2), 97–110.
69. Segal, M., & Andersen, P. (2000). Dendritic spines shaped by synaptic activity. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(5), 582–586.
70. Shi, L., Linville, M. C., Tucker, E. W., Sonntag, W. E., & Brunso-Bechtold, J. K. (2005). Differential Effects of Aging and Insulin-like Growth Factor-1 on Synapses in CA1 of Rat Hippocampus. *Cerebral Cortex*, 15(5), 571–577.
71. Spence, E. F., & Soderling, S. H. (2015). Actin Out: Regulation of the Synaptic Cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 290(48), 28613–28622.
72. Stern, S. A., Kohtz, A. S., Pollonini, G., & Alberini, C. M. (2014). Enhancement of memories by systemic administration of insulin-like growth factor II. *Neuropsychopharmacology : Official*

- Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(9), 2179–2190.
73. Svensson, J., Diez, M., Engel, J., Wass, C., Tivesten, A., Jansson, J.-O., ... Ohlsson, C. (2006). Endocrine, liver-derived IGF-I is of importance for spatial learning and memory in old mice. *Journal of Endocrinology*, 189(3), 617–627.
 74. Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E., & Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 420(6917), 788–794.
 75. Trejo, J., Piriz, J., Llorens-Martin, M. V., Fernandez, A. M., Bolós, M., LeRoith, D., ... Torres-Aleman, I. (2007). Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Molecular Psychiatry*, 12(12), 1118–1128.
 76. Tsay, D., & Yuste, R. (2004). On the electrical function of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*, 27(2), 77–83.
 77. Tyler, W. J., & Pozzo-Miller, L. (2003). Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *The Journal of Physiology*, 553(2), 497–509.
 78. Valencia Segura, R. K., Colín Barenque, L., Fortoul van der Goes, T. I., Valencia Segura, R. K., Colín Barenque, L., & Fortoul van der Goes, T. I. (2018). *Las espinas dendríticas, su función y algunas alteraciones*. *Revista de la Facultad de Medicina (México)* (Vol. 61). AMERBAC.
 79. Xing, C., Yin, Y., He, X., & Xie, Z. (2006). Effects of insulin-like growth factor 1 on voltage-gated ion channels in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research*, 1072(1), 30–35.
 80. Yang, G., Lai, C. S. W., Cichon, J., Ma, L., Li, W., & Gan, W.-B. (2014). Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning. *Science*, 344(6188), 1173–1178.
 81. Yang, G., Pan, F., & Gan, W.-B. (2009). Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*, 462(7275), 920–924.
 82. Yuste, R. (2013). Electrical Compartmentalization in Dendritic Spines. *Annual Review of Neuroscience*, 36(1), 429–449.