



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Departamento de Farmacobiología

**Papel de la insulina y el IGF-I en la transmisión sináptica  
de la región CA3 del hipocampo**

Tesis que presenta  
**QFB Jesús González Jorge**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias en**

**Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Director de tesis  
**Dr. Emilio Javier Galván Espinosa**

**Ciudad de México**

**Agosto 2018**

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio 9 del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca con el número 615629

## Índice

<i>Índice de figuras y tablas</i> .....	<i>i</i>
<b>Abreviaturas</b> .....	<i>ii</i>
<b>Resumen</b> .....	<i>v</i>
<b>Abstract</b> .....	<i>vi</i>
<b>Introducción</b> .....	<i>1</i>
<i>La Insulina</i> .....	<i>1</i>
<i>Vía de señalización MAPK</i> .....	<i>1</i>
<i>Vía de señalización PI3K</i> .....	<i>2</i>
<i>Vía de señalización PKC</i> .....	<i>3</i>
<i>El Factor de crecimiento similar a la insulina</i> .....	<i>5</i>
<i>Localización de la insulina y el IGF-I en el Sistema Nervioso Central</i> .....	<i>7</i>
<i>El papel de la insulina y el IGF-I en el Sistema Nervioso Central</i> .....	<i>8</i>
<i>Hipocampo</i> .....	<i>10</i>
<i>Corteza entorrinal/ Giro Dentado</i> .....	<i>11</i>
<i>Region CA3</i> .....	<i>12</i>
<i>Las Fibras Musgosas</i> .....	<i>13</i>
<i>Plasticidad Sináptica de las Fibras Musgosas</i> .....	<i>13</i>
<i>Facilitación por pulso pareado</i> .....	<i>14</i>
<i>Inhibición por pulso pareado</i> .....	<i>14</i>
<i>Potenciación a largo plazo</i> .....	<i>16</i>
<b>Justificación</b> .....	<i>18</i>
<b>Hipótesis</b> .....	<i>18</i>
<b>Objetivos</b> .....	<i>18</i>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<i>19</i>

<i>Animales</i> .....	19
<i>Electrofisiología</i> .....	19
<i>Western Blot</i> .....	23
<i>Reactivos</i> .....	24
<i>Estadística</i> .....	25
<b>Resultados</b> .....	25
<i>Alteraciones ocasionadas por la insulina sobre la fuerza de la transmisión sináptica en la sinapsis FMs-CA3</i> .....	25
<i>Efecto de la insulina en la plasticidad sináptica a largo plazo en la sinapsis MF-CA3</i> .....	27
<i>Efecto de la insulina sobre la transmisión sináptica inhibitora en la sinapsis FM-CA3</i> .....	30
<i>La insulina induce alteraciones en la plasticidad de manera específica en la sinapsis FM-CA3</i> .....	31
<i>Alteraciones ocasionadas por el IGF-I sobre la fuerza de la transmisión sináptica en la sinapsis FMs-CA3</i> .....	35
<i>Efecto del IGF-I en la plasticidad sináptica a largo plazo en la sinapsis MF-CA3</i> .....	37
<i>Efecto del IGF-I sobre la transmisión sináptica inhibitora en la sinapsis FM-CA3</i> .....	39
<i>El IGF-I induce alteraciones en la plasticidad de manera específica en la sinapsis FM-CA3</i> .....	41
<i>La señalización PI3K/Akt media los procesos de plasticidad inducidos por insulina, pero no los inducidos por IGF-I</i> .....	43
<b>Discusión</b> .....	45
<i>La insulina altera la excitabilidad y la fuerza de la transmisión sináptica en las sinapsis FM-CA3</i> .....	45

<i>El IGF-I disminuye la excitabilidad y la fuerza de la transmisión sináptica en las sinapsis FM-CA3.....</i>	<i>47</i>
<i>El papel de la insulina en los procesos de plasticidad a largo plazo en las sinapsis FM-CA3.....</i>	<i>48</i>
<i>El papel del IGF-I en los procesos de plasticidad a largo plazo en las sinapsis FM-CA3.....</i>	<i>50</i>
<i>El papel de la insulina en los procesos de plasticidad a corto plazo en las sinapsis FM-CA3.....</i>	<i>50</i>
<i>La insulina estimula el circuito inhibitor en la región CA3.....</i>	<i>50</i>
<i>El papel del IGF-I en los procesos de plasticidad a corto plazo en las sinapsis FM-CA3.....</i>	<i>51</i>
<i>El efecto de insulina e IGF-I son específicas de la sinapsis FM – CA3.....</i>	<i>52</i>
<i>La señalización PI3K/Akt media los procesos de plasticidad inducidos por insulina pero no los inducidos por IGF-I.....</i>	<i>54</i>
<i>Consideraciones finales sobre las concentraciones de insulina e IGF-I usadas en este estudio.....</i>	<i>54</i>
<b>Conclusión.....</b>	<b>55</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>56</b>

## **Índice de figuras y tablas.**

<i>Figura 1. Sistema de transducción de señales de la insulina.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2. Sistema de transducción de señales del IGF-I.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 3. El circuito neuronal en el hipocampo de roedores .....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4. Facilitación e inhibición por pulso pareado .....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 5. Plasticidad sináptica en las fibras musgosas.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 6. Esquema de registros extracelulares de campo.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 7. Efecto de la insulina sobre la excitabilidad neuronal en la sinapsis FMs-CA3.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 1. Valores de amplitud máxima FM-EPSP evaluados mediante protocolo I/O con Insulina.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 8. La insulina induce LTP de la transmisión sináptica entre FMs-CA3.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 2. Porcentaje de amplitud de FM-EPSP <math>\pm</math> SEM durante el curso temporal con Insulina.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 9. La insulina aumenta la inhibición proactiva en la sinapsis FMs-CA3.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 3. Índices de inhibición (MF-PPI <math>\pm</math> SEM) con insulina 25 nM y 3 <math>\mu</math>M.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 10. Especificidad de la LTP dependiente de insulina en la sinapsis FMs-CA3... </i>	<i>33</i>
<i>Tabla 4. Porcentaje de amplitud <math>\pm</math> SEM de FM-EPSP vs A/C-EPSP durante el curso temporal.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 11. Efecto del IGF-I sobre la excitabilidad neuronal en la sinapsis FMs-CA3.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 5. Valores de amplitud máxima FM-EPSP evaluados mediante protocolo I/O con IGF-I.....</i>	<i>35</i>

<i>Figura 12. El IGF-I induce LTD de la transmisión sináptica entre FMs-CA3.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 6. Porcentaje de amplitud de FM-EPSP <math>\pm</math> SEM durante el curso temporal con IGF-I.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 13. El IGF-I disminuye la inhibición proactiva en la sinapsis FMs-CA3.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 7. Índices de inhibición (MF-PPI <math>\pm</math> SEM) con IGF-I 10 nM y 1000 nM.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 14. Especificidad de la LTD dependiente de IGF-I en la sinapsis FMs-CA3.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 8. Porcentaje de amplitud <math>\pm</math> SEM de FM-EPSP vs A/C-EPSP durante el curso temporal con IGF-I.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 15. La señalización PI3K/Akt regula las alteraciones en la plasticidad dependientes de insulina pero no las dependientes de IGF-I.....</i>	<i>42</i>

## Abreviaturas

<b>μA</b>	Microamperio
<b>μM</b>	micromolar
<b>μs</b>	microsegundo
<b>A/C</b>	Asociación Comisural
<b>Akt o PKB</b>	Proteína cinasa B
<b>AMPA</b>	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>BSA</b>	Albúmina sérica de bovino
<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>CGs</b>	Células granulares
<b>CA1</b>	Cuerno de Amón 1
<b>CA2</b>	Cuerno de Amón 2
<b>CA3</b>	Cuerno de Amón 3
<b>CE</b>	Corteza Entorrinal
<b>DCG-IV</b>	(2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-Dicarboxiciclopropil) glicina
<b>EGTA</b>	Acido tetraacetico de etilen glicol
<b>E-S</b>	Entrada-Salida
<b>Erk 1/ 2</b>	cinasas reguladas por señales extracelulares
<b>fEPSPs</b>	Potenciales Post Sinápticos Excitatorios de campo
<b>FMs</b>	Fibras Musgosas
<b>GABA</b>	Ácido Gamma Amino Butírico

<b>GABAA</b>	Receptor ionotrópico tipo A de ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GAD67</b>	Glutamato Descarboxilasa 67
<b>GD</b>	Giro Dentado
<b>GluRs</b>	Receptores ionotrópicos de glutamato
<b>Grb2</b>	proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento
<b>Hz</b>	Hertz
<b>HFS</b>	Estimulación a alta frecuencia
<b>IGF-I</b>	Factor de crecimiento tipo-insulínico I
<b>IGFBPs</b>	Proteínas de unión a IFG
<b>IGF-IR</b>	Receptor de IGF-I
<b>IRS-I</b>	Sustrato del receptor de insulina
<b>IPP</b>	Índice de pulsos pareados
<b>ISI</b>	Intervalo inter estímulo
<b>LFS</b>	Estimulación a baja frecuencia
<b>LTD</b>	Depresión a largo plazo
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo
<b>LCRa</b>	Líquido cefalorraquídeo artificial
<b>MAPKs</b>	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
<b>mg</b>	miligramo
<b>mGluRs</b>	Receptores metabotrópicos de Glutamato
<b>mTOR</b>	Diana de rapamicina en mamífero

<b>mL/min</b>	mililitro por minuto
<b>mM</b>	milimolar
<b>ms</b>	milisegundo
<b>mV</b>	milivolt
<b>nM</b>	nanomolar
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartato
<b>PBS</b>	Buffer salino de fosfatos
<b>PTB</b>	Dominio de unión a fosfotirosinas
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>PH</b>	Pleckstrina
<b>PPF</b>	Facilitación por pulso pareado
<b>PPI</b>	Inhibición por pulso paread
<b>PI3K</b>	Fosfatidil inositol 3 cinasa
<b>PTX</b>	Picrotoxina
<b>RAS</b>	proteínas G pequeñas
<b>S1</b>	Estímulo 1
<b>S2</b>	Estímulo 2
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sodio .
<b>SL</b>	Stratum Lucidum
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SH2</b>	Dominio de homología con Src2

**TNF- $\alpha$**       Factor de Necrosis Tumoral alfa

**Tyr**            Tirosina

**Thr**            Treonina

## Resumen

La insulina es una hormona ampliamente estudiada por su papel en el control del metabolismo celular. Sin embargo, evidencia reciente sugiere que tiene funciones adicionales a nivel del sistema nervioso central. Por otra parte, el factor de crecimiento insulínico (IGF-I), guarda una homología del 80% con la insulina y comparte vías de señalización con esa hormona. Notablemente, ambas moléculas y sus respectivos receptores están presentes en el hipocampo, una región involucrada en diversos procesos cognitivos. A pesar de que ambas hormonas han sido parcialmente estudiadas en la región CA1 del hipocampo, se desconoce su efecto en la región comprendida por el giro dentado y el área CA3.

En esta tesis se realizaron registros extracelulares en rebanadas de hipocampo estimulando las fibras musgosas y registrando en el stratum lucidum de CA3 (Sinapsis MF-CA3). Nuestros resultados muestran que la perfusión de insulina modula la fuerza de la transmisión MF-CA3 de manera dependiente de la concentración y genera potenciación a largo plazo. Además, la insulina modula la inhibición por pulsos pareados, incrementando el índice de inhibición la inhibición proactiva. Western blots de la región CA3 mostraron que el efecto de la insulina está relacionado con la activación de la vía fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K). Por otra parte, el IGF-I produjo efectos opuestos a los observados con insulina en los fenómenos previamente descritos: su perfusión causó depresión de la transmisión de la sinapsis MF-CA3 y disminución de la inhibición proactiva. Ni la insulina ni el IGF-I modularon la transmisión sináptica de las sinapsis comisurales de asociación de CA3 (CA3-CA3), lo que sugiere que estas hormonas actúan de manera sinapsis-específica en la región CA3 del hipocampo.

Nuestros resultados indican que la insulina incrementa la fuerza de la transmisión sináptica MF-CA3 y que esta modulación depende de la activación de PI3K, a diferencia del IGF-I que produce depresión de la respuesta sináptica sin depender de la activación de PI3K.

## **Abstract**

Insulin is a hormone known mainly for the role it plays in cellular metabolism. However, in recent years, it has been suggested that insulin has other functions at the level of the central nervous system (CNS) that depend on the signaling pathways that are activated by the interaction with its receptor. On the other hand, the insulin growth factor (IGF-I) is a molecule that has an 80% homology with insulin, and also shares some signaling pathways to carry out its actions. The literature is consistent in reporting that these molecules, as well as their respective receptors, are present in cognitive brain regions such as the hippocampus; which leads to infer that they are related to cognitive processes. To date, the role of insulin and IGF-I in synaptic plasticity processes have only been reported in the CA1 region of the hippocampus; however, it is important to study them in the CA3 region since it has different characteristics.

Our results showed that a brief application of insulin can modulate the neuronal excitability in the mossy fiber-CA3 synapse (MF-CA3), decreasing the excitability at concentrations ranging from 5 to 630 nM and increasing the excitability with 3  $\mu$ M, as evaluated by input-output curves. Paired pulse inhibition protocols revealed a decrease in insulin-mediated inhibition rate of the MF-CA3 synapse. We found by western blot that these effects are related with the activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). On the other hand, IGF-I used at concentrations ranging from 10 to 1000 nM was found to have the opposite effects to those observed by insulin in the above phenomena. In addition, it was shown that these effects are specific to the MF-CA3 synapse, since there is no change in the basal response at synapses of commissural association when applying any of the drugs.

Therefore, these findings tell us that insulin is able to modulate the strength of the synaptic transmission in a concentration dependent manner, that this modulation is related with the activation of the PI3K and is specific to the MF-CA3 synapse, unlike the IGF-I that produces depression of the synaptic response and is not dependent on the activation of PI3K.

## **Introducción**

### **La insulina**

La insulina es una hormona con efectos sobre el metabolismo y el crecimiento. La unión de la insulina a su receptor (IR) regula estos procesos a través de dos vías de señalización: las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K).

### **Vía de señalización de las MAPKs.**

Los efectos de la insulina en la regulación de la síntesis de proteínas son mediados principalmente a través de la activación de la vía de señalización de las MAPK (Figura 1). La fosforilación en residuos de Tirosina (Tyr) del dominio citoplasmático del IR, promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/ SOS; SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina (GEF), capaz de activar a Ras. La activación de Ras (GTP-Ras) inicia el encendido de la cascada de las MAPKs. GTP-Ras se une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de la vía, que involucra el reclutamiento y activación de MEK (también llamada cinasa de MAPK) y de las ERK1 (cinasa regulada extracelularmente 1) y ERK2. Alternativamente a esta vía de señalización que lleva a la activación de las ERK1 y ERK2 (conocidas genéricamente como MAPK), la insulina es capaz de activar a estas proteínas por una vía independiente de Shc, pero que depende de la activación del IRS (sustrato del receptor de insulina). Una vez activo IRS, une al complejo Grb2/ SOS y a partir de este punto la secuencia de activación de proteínas es la misma que se describió para Shc. Las MAPKs tienen una amplia gama de sustratos potenciales, incluyendo factores de transcripción y otras cinasas, que participan principalmente en la regulación de la expresión genética en tejidos sensibles a la insulina pero no en la regulación del transporte de glucosa (Avruch J, 1998; Virkamaki A, 1999).

## Vía de señalización de la PI3K

La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos. La transducción de señales a través de la vía de PI3K se esquematiza en la (Figura 1) y se inicia cuando el receptor activo y autofosforilado, interacciona con IRS y lo fosforila. Las proteínas IRS contienen un dominio amino-terminal de homología a pleckstrina (dominio PH) altamente conservado, seguido por un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB), que en conjunto permiten el acoplamiento de IRS al IR activo. Adicionalmente, los IRSs contienen entre 8 y 18 sitios potenciales de fosforilación (en función del tipo de IRS, de los cuales se conocen 4 isoformas, IRS-1 a IRS- 4), que al ser fosforilados por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 (de homología al dominio 2 de la proteína Src), muchas de las cuales funcionan como proteínas adaptadoras, como es el caso de PI3K, Grb2 (proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento), Crk II, SHP-2 (proteína tirosina fosfatasa con homología a Src), entre muchas otras (Virkamaki A., 1999). Las PI3Ks, son heterodímeros que constan de una subunidad reguladora (p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , p85 $\beta$  ó p55PIK) y de una subunidad catalítica (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  ó p110 $\delta$ ). Las subunidades reguladoras son proteínas adaptadoras que contienen dos dominios SH2, cuales permiten su unión a las proteínas IRS-1. La interacción entre ambas proteínas provoca cambios alostéricos en la conformación de la subunidad reguladora dando por resultado la activación de la subunidad catalítica de PI3K. A consecuencia de ello, p110 se localiza cerca de la membrana plasmática en donde tiene acceso a su sustrato PI4,5-P2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), generando los productos PIP2 (PI3,4-bisfosfato) y PIP3 (PI3,4,5- trisfosfato), respectivamente (Figura 1). El PIP3 sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinositidos-1), y Akt o proteína cinasa B (PKB) (Engelman JA; 2009). En el caso de la cinasa Akt, después de su reclutamiento a la membrana plasmática es fosforilada en dos residuos, la Ser473 y la Thr308. La fosforilación en la Ser473

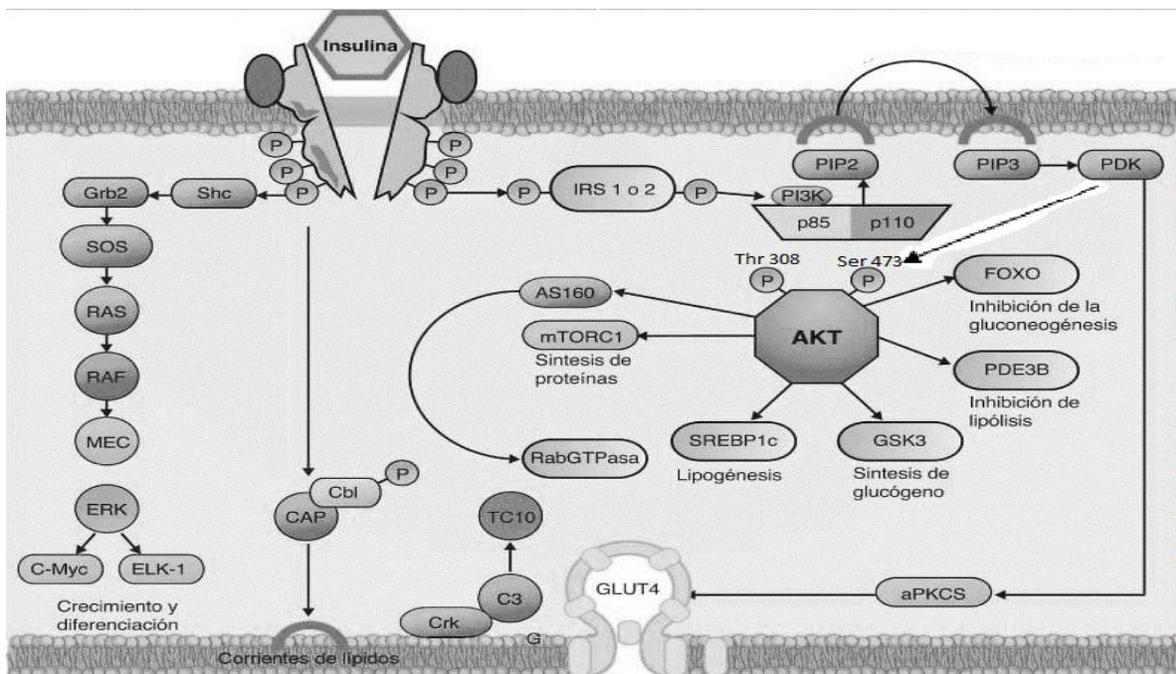
ocurre primero por acción del complejo proteico mTor/Rictor, también conocido como PDK2. Esta fosforilación parece promover la interacción entre el motivo hidrofóbico del carboxilo terminal de Akt y la cinasa PDK1 que la fosforila en la Thr308; estas dos fosforilaciones son importantes para que Akt se active completamente (McCarthy AM, 2007). La enzima Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de una lista creciente de sustratos que propagan la respuesta de la insulina, incluyendo a la enzima glucógeno sintasa (GS), a la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (factor de transcripción CREB), a la molécula blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), a la caspasa 9 y a la proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2 (BAD). Entre estos destaca la fosforilación e inactivación de la enzima GSK3 (White MF, 2002), una cinasa que en condiciones de no estímulo inhibe a la glucógeno sintasa; la inhibición de GSK3 por Akt favorece la activación de la glucógeno sintasa y el aumento en la síntesis de glucógeno (Virkamaki A., 1999). La cascada de la PI3K incluye a otras cinasas de Ser que median la respuesta de la insulina, incluyendo a mTOR la cual regula la síntesis proteica a través de las vías de p70S6K/S6 y 4EBP1/eIF4 ((Engelman 2009))

### **Vía de señalización de la PKC.**

Por otra parte, la activación de las PKCs atípicas  $\lambda$  y  $\zeta$  inducida por la insulina también las involucra en favorecer el transporte de glucosa inducido por la insulina. Por un lado, se ha sugerido que ambas PKCs pueden asociarse con PDK1 cuando ésta se ancla al PIP3 generado por la acción de PI3K, induciendo la fosforilación en los residuos de Thr402/Thr410 en el asa de activación de PKC. Finalmente, podemos decir que independientemente de la vía que lleve a la activación de PKC- $\lambda/\zeta$ , ambas contribuyen de manera significativa a la translocación de GLUT4 inducida por la insulina (Figura 1) (Liu XJ et al., 2006).

En los primeros estudios sobre los efectos de la insulina en el Sistema Nervioso Central (SNC) se vio que esta hormona no incrementaba la captación de glucosa; de ahí se dedujo que el cerebro era un órgano insensible a ella, una idea que fue ampliamente aceptada durante muchos años. Sin embargo, más tarde se demostró que la insulina era capaz de promover la captación de glucosa en células nerviosas en cultivo y también que el GLUT-4 estaba presente en algunas regiones del SNC, en donde coincidía con el receptor de insulina; además, se vio que la hormona incrementaba la entrada de glucosa en el hipocampo y en el hipotálamo. A pesar de este tipo de resultados, la idea de que ciertas células o áreas del SNC sean sensibles a la insulina en cuanto a la captación de glucosa todavía no es aceptada ampliamente, porque no se ha confirmado de manera inequívoca. Hay que tener en cuenta que aunque el GLUT-4 sea una isoforma del transportador presente en el cerebro, se encuentra en escasa proporción; en realidad, en el tejido nervioso las isoformas más abundantes son el GLUT-1 y GLUT-3 (Vannucci, S.J., 1998).

La insulina no solo juega un papel central en la regulación del metabolismo y el crecimiento celular, sino que se encuentra presente en el SNC, donde tiene múltiples funciones. Los efectos principales incluyen la activación de una serie de mecanismos asociados a la supervivencia neuronal; modulación de la liberación de neurotransmisores y por consiguiente, modulación de la plasticidad sináptica.



**Figura 1. Sistema de transducción de señales de la insulina.** La insulina una vez unida a su receptor IR lo activa por medio de autofosforilación, dicha activación lleva a cabo el inicio de las dos vías canónicas conocidas de la insulina, por un lado, la insulina activa la vía de las MAPK a través de dos mecanismos: en el primero, la activación del IR promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS; SOS activa a Ras, la cual inicia el encendido de la cascada de las MAPK. GTP-Ras une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de MEK y de las ERK1/2. Por otro lado, el IR activo y autofosforilado, activa a IRS la cual contiene varios sitios de fosforilación en residuos de Tyr convirtiéndose en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 como PI3K. La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 da por resultado la activación de p110 y a consecuencia de ello, p110 tiene acceso a su sustrato PI(4,5)P<sub>2</sub>, el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, que sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 y Akt. El complejo proteico PDK2 activa a Akt, induciendo una primera fosforilación en la Ser473 que es seguida por una fosforilación en la Thr308, esta última inducida por PDK1. Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de regular la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta, como mTor, FOXO, GSK3 y caspasa 9. Y finalmente, la activación de PDK1 induce también la fosforilación de sitios críticos en el asa de activación de dos formas atípicas de la PKC (aPKCs), que contribuyen de manera significativa a la translocación de GLUT4 inducida por la insulina. Imagen modificada de Jose Laguna, Enrique Piña; 2001.

### Factor de crecimiento similar a la insulina-I

A diferencia de la insulina, la cual es sintetizada principalmente por las células B del páncreas en el adulto, los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs,

por sus siglas en inglés) son sintetizados por múltiples órganos (D'Ercole y col., 1984). La actividad biológica de esta familia es doble: crecimiento y metabolismo, ambas interrelacionadas, ya que el metabolismo debe ser ajustado para que se pueda llevar a cabo el crecimiento (Froesch y col., 1985).

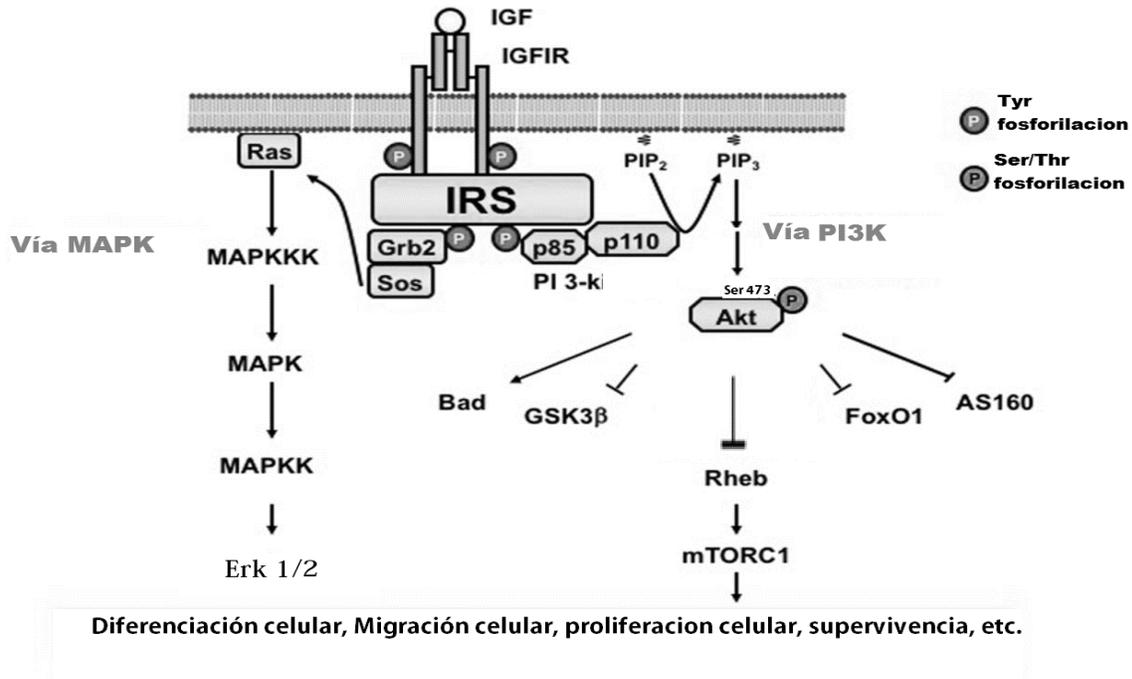
Las acciones biológicas del IGF-I son iniciadas por su interacción con la porción extracelular de una glicoproteína heterotetramérica de membrana, el receptor de IGF-1 (IGF1R). La activación de IGF1R da como resultado una actividad de tirosina cinasa en sus subunidades  $\beta$ , promoviendo su autofosforilación, y posterior reclutamiento de proteínas de atraque (incluyendo IRS 1-4 y Grb2) y la subsecuente activación de cascadas de señalización (LeRoith et al., 1995). La unión de IGF-I a sus receptores (figura 2) provoca la fosforilación del IRS-1, el cual interactúa sobre proteínas que poseen dominios SH2 (src homology 2). La cinasa 3' fosfatidilinositol es la proteína con la que interactúa el IRS-1, lo que permite la activación de la cinasa (Keller y col., 1993; Chuang y col., 1993; Myers y col., 1993).

El hecho de que IRS-1 sea un sustrato común tanto para el receptor de IGF-I como para insulina, que son hormonas con respuestas fisiológicas diferentes, hace pensar en una posible fosforilación parcial y específica de IRS-1 inducida por cada hormona. Otros autores relacionan proteínas como Ras o la MAPK con la vía de señalización intercelular inducida por R-IGF-I (Lu y Campisi, 1992; Roth y col., 1991).

El IGF-I es determinante durante el crecimiento y desarrollo ((Yakar et al. 1999). Además, participa en la reparación y regeneración de tejidos, como el SNC (Torres Aleman., 1998).

Las acciones de la insulina y el IGF-I en el SNC constituyen un campo de estudio relativamente joven. Más aún, que por mucho tiempo se descartó que estas hormonas tuvieran un efecto allí, ya que la insulina no atraviesa la barrera hematoencefálica. Sin embargo, diversos trabajos han mostrado que la insulina y

su receptor se encuentran presentes en el SNC ((Havrankova, Roth, y Brownstein 1979, 1981, 1983). De igual manera, la expresión de IGF-I, así como su receptor en el SNC están bien documentados (Rotwein et al. 1988).



**Figura 2. Sistema de transducción de señales del IGF-I.** La unión del IGF-I con su receptor IGF1R promueve la autofosforilación del receptor induciendo su activación, lo que lleva a cabo consecuentemente a la activación de dos vías canónicas de los factores de crecimiento: la vía de la PI3K implicada principalmente en la supervivencia celular y la vía de las MAPK involucradas en los procesos de proliferación celular. Modificado de Hakuno F, Takahashi SI; 2018.

### Localización de la insulina y el IGF en el Sistema Nervioso Central.

Durante mucho tiempo se creyó que el SNC no respondía a los niveles periféricos de insulina, y más aún, se desconocía si la insulina era producida en el SNC. Finalmente, una serie de trabajos de Havrankova y cols (1978, 1981, 1983) demostraron que el receptor de insulina (IR) se expresa en el SNC. Actualmente, la expresión del IR ha sido descrita en diversas regiones, incluidas el bulbo olfatorio, hipotálamo, corteza cerebral e hipocampo (Havrankova et al., 1981; Plum et al., 2005). Por otra parte, la cuestión de si la insulina misma se expresa en el cerebro ha sido un tema de debate durante muchos años. Existe evidencia de que

el ARNm de insulina, proinsulina, y el péptido C están presente en ciertas regiones del cerebro durante el desarrollo, así como también en el cerebro adulto (Devaskar et al., 1993), también existen estudios que reportan la expresión de los genes del receptor de insulina y su acción en el SNC (Schulingkamp, R.J., Pagano, 2000; Baron-Van Evercooren A., 1991; Takayuki Nemoto, 2014). Además, se plantea la posibilidad de que la insulina periférica ingresa al cerebro a través de un mecanismo saturable que involucra la barrera hematoencefálica (BHE), que es llevado a cabo por medio de una proteína transportadora, cuya identidad sigue siendo desconocida. Aun así, se ha propuesto que es el propio receptor de insulina quien desempeña dicha función (Schwartz et al., 1992; Woods et al., 2003; Banks, 2004). También es importante mencionar que otros tipos celulares del SNC como la astrogliá son una fuente importante en la regulación de la secreción de insulina y además que estas células gliales juegan un papel clave en la absorción y aprovechamiento de la glucosa para regular el metabolismo energético del SNC en cooperación con la insulina y el IGF-I (Yamamoto N, 2018; Torres Aleman et al., 2017)

Por otra parte, la evidencia experimental ha sido más concluyente con el IGF-I, ya que este es sintetizado en múltiples células del SNC (neuronas, glía, endotelio, etc.) que, adicionalmente, expresan su receptor (Bach; 1991, Bony; 1993). Además, la mayoría de las proteínas transportadoras de IGFs, conocidas como IGFBPs (Insulin-like Growth Factor-Binding Protein, por sus siglas en inglés) se expresan abundantemente durante el neurodesarrollo (Bony; 1991). Sin embargo, en el cerebro adulto, la expresión de IGF-I disminuye significativamente, mientras que la expresión de las IGFBPs se vuelve selectiva (Albiston; 1992).

### **El papel de la Insulina y el IGF-I en el Sistema Nervioso Central.**

Como se mencionó previamente, la insulina y su receptor están implicados en supervivencia neuronal y plasticidad sináptica. Ambos efectos están mediados por la cascada de señalización intracelular de PI-3-K/Akt. La supervivencia celular se da a través de un mecanismo que inactiva la maquinaria pre-apoptótica.

Curiosamente, esta misma vía de señalización (PI-3-K/Akt) es necesaria durante los procesos de aprendizaje y memoria (Lars P. van der Heide, 2006). Esto lleva a la hipótesis de que la ruta PI-3-K/Akt forma un vínculo directo entre el aprendizaje, la memoria y la supervivencia neuronal. Las implicaciones de esta hipótesis son de gran alcance, ya que proporciona una explicación de por qué la insulina tiene efectos beneficiosos sobre el aprendizaje y la memoria y cómo la actividad sináptica puede prevenir la degeneración celular.

Existe evidencia del papel que juegan la insulina y otros factores de crecimiento en los procesos de plasticidad sináptica en la región CA1 del hipocampo por medio de la activación de la vía PI-3-K/Akt, lo que sugiere que PI-3-K podría ser una vía final común en la expresión de múltiples formas de potenciación sináptica.

Por otra parte, al igual que en otros tejidos, las acciones propuestas de IGF-I en SNC podrían agruparse dentro de tres categorías: i) acciones tróficas, ii) acciones metabólicas y iii) acciones especializadas específicas del tejido nervioso. Existen evidencias experimentales que apoyan acciones de IGF-I en SNC para cada una de estas tres categorías. Aun así, y a diferencia de los abundantes estudios realizados que han demostrado el papel neurotrófico de IGF-1 en el SNC, un reducido número de trabajos sugieren que este péptido también participa en fenómenos de neuromodulación o plasticidad sináptica.

Varios estudios han demostrado los efectos estructurales y morfológicos del IGF-1 sobre la neuroplasticidad. Por ejemplo, el IGF-I es un remodelador del tejido nervioso a través de sus acciones anti-apoptóticas y mitogénicas, así como diferenciadoras, aspectos clásicos de los factores tróficos. El IGF-I mantiene el árbol vascular de acuerdo a la demanda funcional (López López C., 2004), así como controla la neurogénesis adulta de forma tónica (Trejo J. L., 2008). Aparentemente otro componente importante de la arquitectura cerebral como es la mielina también estaría regulado por este factor trófico (McMorris, 1993). Desde

luego en etapas de desarrollo este es un papel importante del IGF-I (Torres Alemán I., 1998)

Existe una gran cantidad de formas en que IGF-1 puede mediar la neuroplasticidad, incluidos los efectos sobre los GluRs, el equilibrio de excitación/inhibición en circuitos neuronales, sobre los canales de calcio, proteínas sinápticas e interacciones con otros factores neurotróficos.

Por otra parte, el IGF-1 participa activamente en la modulación y composición de los receptores membranales de glutamato (Tropea et al., 2009). Además, el IGF-1 modula la depresión a largo plazo (LTD), al reducir las subunidades del receptor AMPA a través de la endocitosis mediada por la proteína clatrina de los receptores AMPA que contienen la subunidad GluR2 (Wang y Linden, 2000; Deak y Sonntag, 2012). Otro estudio demostró que el IGF-1 mejoraba la LTP independiente de receptores NMDA, IGF1R y dependiente de la síntesis de proteínas (Burgdorf et al., 2015). Por lo tanto, en ambas formas de plasticidad sináptica, ya sea LTD o LTP, el IGF-1 puede ejercer sus efectos sobre la transmisión glutamatérgica.

En conjunto, las evidencias mencionadas previamente sugieren que ciertas alteraciones de plasticidad sináptica tienen una relación directa con el control de la insulina y el IGF-1. De manera interesante, cabe resaltar que ambos procesos, cognición y las anomalías celulares que subyacen a la demencia dependen de las funciones llevadas a cabo por el hipocampo, una estructura mesolímbica central en el aprendizaje.

### **Hipocampo**

El hipocampo deriva de la región medial del telencéfalo, forma parte del sistema límbico y tiene un papel importante en la adquisición del aprendizaje espacial y la consolidación de la memoria a largo y corto plazo. Una de las características que hacen única a la formación hipocampal es su organización anatómica. El hipocampo está dividido en tres subregiones: CA3, CA2 y CA1, además de contar con otras áreas como lo son el giro dentado y la corteza entorrinal.

## **Corteza Entorrinal / Giro Dentado**

La corteza entorrinal (CE) representa la principal entrada de información somatosensorial al hipocampo y es una zona de interconexión con otras partes del cerebro. (Witter et al. 1989). Por otra parte el giro dentado (GD), representa el primer filtro de información neuronal y primer relevo dentro del hipocampo. Su principal grupo celular son las neuronas granulares. Los axones de estas neuronas, conocidos como **fibras musgosas**, hacen contacto sináptico con las neuronas piramidales de la región CA3. Diversos estudios anatómicos han demostrado que en promedio, cada axón de las neuronas granulares hace sinapsis con 15 neuronas piramidales de CA3, distribuidas a través de todo el eje transversal de esta área (Kobayashi, 2010). La sinapsis fibra musgosa-CA3 (FM-CA3), es una sinapsis de baja probabilidad de liberación de NT (Jonas et al., 1993; Zucker y Regehr, 2002) con características únicas, como son su plasticidad sináptica dependiente de actividad (Salin et al., 1996) y plasticidad sináptica a largo plazo (LTP) independiente de receptores NMDA (Harris y Cotman, 1986).

Además de las células piramidales, las fibras musgosas forman sinapsis excitadoras con interneuronas distribuidas a lo largo de la región CA3 (Galvan et al., 2011). De hecho, la principal diana sináptica de las fibras musgosas no son las neuronas piramidales, sino las interneuronas GABAérgicas de esta región (Acsády et al., 1998; Lawrence y McBain, 2003; McBain 2008). El disparo de las neuronas granulares, activa a interneuronas del hilus y de CA3, lo que produce un fenómeno de inhibición proactiva (feed forward inhibition), (Jung y McNaughton, 1993; Henze et al., 2002; Mori et al., 2004). La activación temprana de las interneuronas por acción de las FMs mantiene en un estado de baja actividad a la red neuronal de CA3 (McBain 2008).

## **Región CA3**

La región CA3 juega un papel muy importante en los procesos de memoria episódica o memoria a corto plazo; además, la conectividad interna de esta región

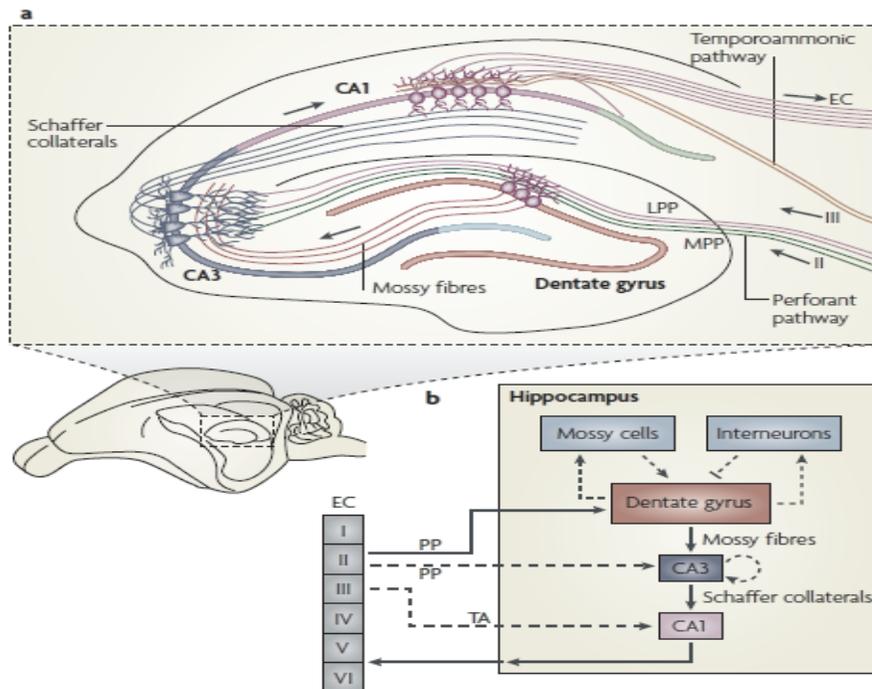
es la más compleja de todo el hipocampo. Las neuronas piramidales de CA3 recibe entradas sinápticas excitadoras provenientes de la corteza entorrinal, ya sea directamente a través de la vía perforante o indirectamente de la circunvolución dentada a través de las fibras musgosas (Amaral y Witter, 1983). Los axones provenientes de las neuronas granulares del giro dentado (fibras musgosas) terminan con grandes botones sinápticos (4-10 micras) mientras que aquellas con interneuronas están dirigidos por extensiones filopodiales más pequeñas. La vía de fibras musgosas actúa como un filtro de paso, traduce densamente señales codificadas corticales a un código del hipocampo disperso, específico y esencial para la formación de memoria. Finalmente, los axones de las neuronas piramidales CA3 dan origen a dos tipos de conexiones excitadoras. Cuando los axones se ramifican dentro de CA3 y hacen contacto sináptico con neuronas e interneuronas de CA3, dan origen a la red de colaterales recurrentes o comisurales de asociación. Este circuito local está implicado en la codificación de representaciones espaciales (O'Keefe y Nadel, 1978) y recuerdos episódicos. Las conexiones más importantes de la región CA3 están ejemplificadas en la Figura 3.

### **Las Fibras Musgosas**

Las fibras musgosas (FM) son los axones desmielinizados de las células granulares que conforman el giro dentado. Estos axones tienen terminales sinápticas muy especializadas conocidas como botones musgosos, cuyo diámetro oscila entre los 4 y los 10  $\mu\text{m}$ . De los botones musgosos emergen una serie de pequeñas ramificaciones llamadas extensiones filopodiales (0.5 a 2  $\mu\text{m}$ ). A lo largo del axón se encuentran otras zonas de contacto sináptico que se conocen como botones en passant (0.5 a 2  $\mu\text{m}$ ) Estas especializaciones axonales dan origen a los contactos sinápticos con interneuronas inhibitorias.

Diversos estudios anatómicos indican que las FMs, particularmente aquellas que extienden sus dendritas en el stratum lucidum y tienen el soma cerca del stratum piramidale, son responsables de la excitabilidad glutamatérgica. El resultado de

esta activación es una fuerte actividad excitadora del circuito en CA3 con una sola fibra y un solo impulso eléctrico. Esta particularidad le ha conferido el nombre de “sinapsis detonante”.



**Figura 3. El circuito neuronal en el hipocampo de roedores.** **a,** Ilustración de los circuitos del hipocampo. **b,** Diagrama de la red neuronal del hipocampo. El circuito tradicional trisináptica excitatoria (Corteza entorrinal (CE), giro dentado-CA3-CA1-CE), representada con flechas sólidas. Los axones de las neuronas en la capa II de la corteza entorrinal proyectan a giro dentado a través de la vía perforante (PP), incluyendo la vía lateral perforante (LPP) y la vía perforante medial (MPP). El giro dentado envía proyecciones a las células piramidales CA3 a través de fibras musgosas. Neuronas piramidales CA3 transmiten la información a las neuronas piramidales CA1 a través de las fibras colaterales de Schaffer. Las neuronas piramidales de CA1 piramidal envían proyecciones a la capa profunda de la CE. CA3 también recibe proyecciones directas de la capa II de la CE a través de la PP. CA1 recibe proyecciones de la capa III de la CE a través de la vía temporoamónica (TA). Las células granulares del giro dentado proyectan a las células musgosas en el hilus y a interneuronas de esta región, que envían fibras excitatorias e inhibitorias, respectivamente a las células granulares. Imagen tomada de Deng et al., 2010.

### Plasticidad sináptica de las fibras musgosas

La comunicación entre neuronas experimenta modificaciones en la fuerza y/o en la eficacia de la transmisión sináptica por periodos cortos de tiempo o de manera persistente, y son referidos como potenciación a corto plazo y potenciación a largo

plazo, respectivamente. La plasticidad a corto plazo es un fenómeno característico de la sinapsis FM – neurona piramidal de CA3 que se presenta como un cambio inmediato en la amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores (Lambert y Wilson, 1994; Dobrunz, 1997; Schmitz, 2001; Zucker y Regehr, 2002).

La facilitación por estimulación es uno de los procesos de plasticidad a corto plazo que se distingue en la sinapsis FMs – piramidales de CA3, inducida durante la aplicación de estímulos eléctricos pareados comúnmente observada como el aumento en la amplitud de la segunda respuesta sináptica evocada.

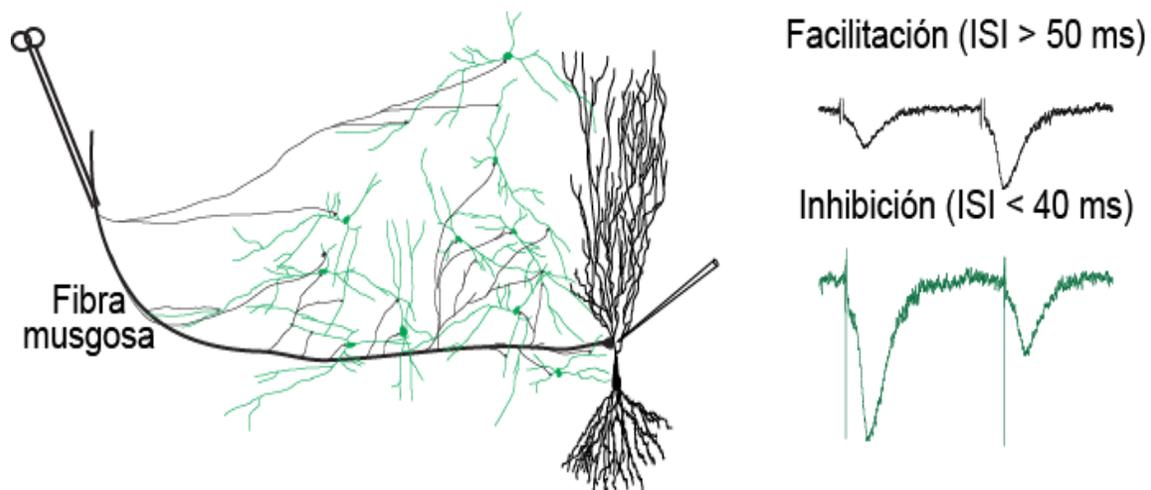
### ***Facilitación por pulsos pareados***

La facilitación por pulsos pareados de las sinapsis FMs – neurona piramidal de CA3 (PPF o paired pulse facilitation por sus siglas en inglés) se caracteriza por producir un aumento de hasta 350% con respecto al valor original de la respuesta sináptica (Sali, 1996; Zucker, 1989), proceso dependiente del incremento transitorio en la concentración de  $Ca^{2+}$  a nivel presináptico, donde el primer estímulo eléctrico despolariza la terminal presináptica y activa a los canales que permean este ion al interior de la terminal promoviendo, así, la fusión de vesículas exocitóticas. Cuando el segundo estímulo eléctrico llega a la terminal causa una segunda despolarización que incrementa aún más la concentración de  $Ca^{2+}$  y desencadena una mayor fusión de vesículas exocitóticas (Zucker, 1989; Katz y Miledi, 1968) liberando glutamato masivamente con el consecuente aumento en la amplitud del potencial postsináptico excitador.

La participación del calcio extracelular y del calcio residual en la sinapsis FM – PPF ha sido comprobada experimentalmente al aplicar el quelante de calcio EGTA (etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter)- N,N,N',N'- ácido tetra acético), que suprime su aparición (Salin, 1996; Scott, 2008).

### ***Inhibición por pulsos pareados***

Paradójicamente, si se disminuye el tiempo entre los intervalos de estimulación eléctrica de los pulsos pareados (entre 5 y 40 ms), la segunda respuesta sináptica tiende a disminuir su amplitud. La inhibición por pulso pareado (PPI o paired pulse inhibition por sus siglas en inglés) requiere además de los intervalos en la estimulación, que la intensidad de dicha estimulación sea alta (Figura 4), para asegurar la activación simultánea de un mayor número de interneuronas que liberan GABA. Como resultado de la activación masiva de interneuronas y la concomitante liberación de GABA, se observa una disminución en la segunda respuesta sináptica. Además, este fenómeno es revertido por antagonistas de los receptores GABA<sub>A</sub> (picrotoxina, bicuculina o Gabazina). De igual manera, la inhibición es incrementada en presencia de agonistas de receptores GABA<sub>A</sub> (Austin, 1989).



**Figura 4. Facilitación e inhibición por pulsos pareados.** A la izquierda, esquema de una fibra musgosa, haciendo múltiples contactos sinápticos con interneuronas (verdes) y con una neurona piramidal (negra), se muestra el electrodo de estimulación sobre la FM y el electrodo de registro cerca de la neurona piramidal. A la derecha, los registros extracelulares (fEPSP) representativos de la sinapsis FMs – CA3 en una facilitación y la inhibición que ejerce las interneuronas al incrementar la intensidad de estimulación (Modificado de Villanueva-Castillo, 2017).

Otro mecanismo de plasticidad a corto plazo es la facilitación dependiente de la frecuencia de estimulación, donde las respuestas evocadas por las FMs experimentan un incremento de hasta 400% con respecto a su valor basal al

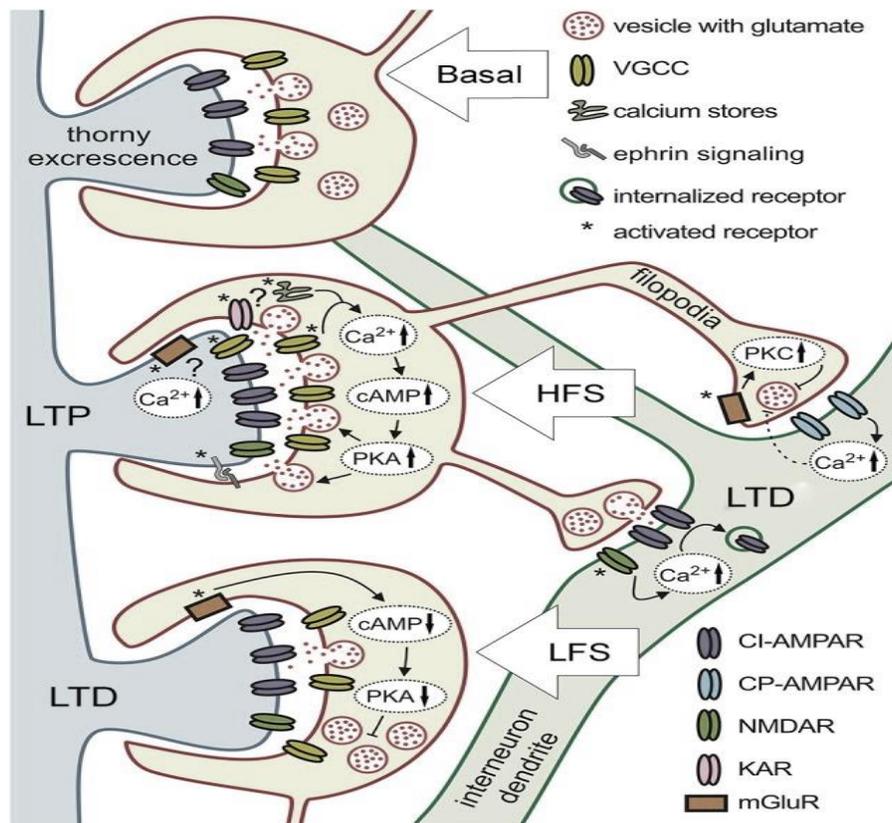
disminuir el tiempo de repetición de la estimulación eléctrica ( $>1$  Hz). Sin embargo, cuando el tiempo de estimulación vuelve a aumentar ( $<0,06$  Hz), el potencial postsináptico excitador regresa a su valor original (Salin, 1996).

### ***Potenciación a Largo Plazo***

La potenciación a largo plazo de la sinapsis FM – CA3 requiere de un protocolo de inducción de estimulación de alta frecuencia. De manera coincidente, estos protocolos de inducción son independientes de la activación de receptores NMDA (Harris y Cotman, 1986), ya que los receptores glutamatérgicos expresados de manera imperante son los tipo-AMPA. A nivel presináptico, la estimulación de alta frecuencia activa canales y corrientes de calcio que echan a andar vías de señalización entre las que destaca la de adenilato ciclasa - AMPc (figura 5, Zalutsky y Nicoll, 1992; Weisskopf, 1994; Villacres, 1998).

En conjunto estos mecanismos presinápticos incrementan significativamente la liberación de glutamato incrementando la fuerza sináptica (incremento de la amplitud de la respuesta postsináptica generada por la actividad de la neurona presináptica) y promoviendo la inducción del mecanismo de potenciación sináptica.

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) controlan la modulación lenta de la transmisión sináptica a través de la activación de vías de señalización intracelular y segundos mensajeros (Ferraguti y Shigemoto, 2006; Cosgrove, 2011). Una característica importante de las fibras musgosas es la expresión de los receptores del grupo II (mGluR 2,3) que están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa (AC) e inhiben la producción de AMPc, por lo que su activación suprime parcialmente el circuito GD-CA3. La estimulación de baja frecuencia en las neuronas piramidales, mediante la activación de los receptores mGluR 2, que disminuye los niveles de AMPc, disminuye la activación de la PKA y por tanto la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Tóth, 2014).



**Figura 5. Plasticidad sináptica en las fibras musgosas.** En la imagen se muestran los mecanismos moleculares que subyacen algunos procesos de plasticidad en las terminales sinápticas de las fibras musgosas con las neuronas piramidales (dendrita de color azul) y con las interneuronas (dendrita verde). La estimulación de alta frecuencia en las sinapsis FM – neurona incrementa el calcio presináptico, activa la AC, incrementa la concentración de AMPc, activa la proteína cinasa A (PKA) aumentando la liberación del neurotransmisor induciendo LTP. Este mismo protocolo induce LTD en las interneuronas a través de los receptores AMPA impermeables a calcio, la cual induce la activación de la cascada de la PKC, disminuyendo la liberación del neurotransmisor. La inducción de LTD como lo muestra la figura también se lleva a cabo mediante la estimulación de baja frecuencia en las neuronas piramidales, mediante la activación de los receptores mGluR2, que disminuyen los niveles de AMPc, disminuye la activación de la PKA y por lo tanto la probabilidad de liberación del neurotransmisor. Modificado de Evstratova y Thóth; 2014.

En conjunto, los distintos mecanismos de plasticidad involucrados en la sinapsis de las FMs nos muestran la complejidad del arreglo o conformación funcional y anatómica del circuito hipocampal de la región CA3, en donde la interacción que se lleva a cabo con las diversas respuestas sinápticas determina como las células granulares reciben, transmiten e integran la información durante los procesos de formación de nuevas memorias.

## **JUSTIFICACIÓN**

- Estudios electrofisiológicos realizados en la región CA1 del hipocampo, han demostrado que la insulina y el IGF-I participan activamente en la modulación de transmisión sináptica. Sin embargo, el papel que juegan estos dos factores en la transmisión y plasticidad de la región CA3 del hipocampo, siguen siendo desconocidos. Aun así, la literatura es consistente en mostrar que las neuronas de la región CA3 expresan los receptores membranales de insulina y de IGF-I, así como la presencia de ambas proteínas en dicha región.

## **HIPÓTESIS**

- 1) La perfusión tanto de insulina e IGF-I, modificarán la fuerza de la transmisión en la sinapsis fibras musgosas – neuronas piramidales de CA3.
- 2) La perfusión de insulina inducirá potenciación de la transmisión en la sinapsis fibra musgosa – CA3, por el contrario IGF-I inducirá depresión de la transmisión en la sinapsis estudiada.
- 3) La modificación de la transmisión sináptica inducida por la insulina estará acompañada por la activación exclusiva de la vía de señalización PI-3-K/Akt/ en la región CA3 del hipocampo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Caracterizar el efecto de la insulina y el IGF-I sobre la fuerza de la transmisión sináptica y los procesos de plasticidad a corto y a largo plazo en el área CA3 hipocampal en rebanadas de cerebro mantenidas *in vitro*.

### **Objetivos Particulares**

1. Determinar el efecto de la insulina y el IGF-I sobre la fuerza de la transmisión sináptica evaluadas mediante curvas I-O

2. Determinar las vías de señalización activas tras la estimulación con insulina e IGF-I en la región CA3 del hipocampo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales:**

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley de aproximadamente 4 semanas de edad obtenidas del bioterio del CINVESTAV sede Sur. Alojados en cajas con ciclo luz-oscuridad 12-12 hrs con agua y alimento ad libitum. Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con la norma oficial mexicana, NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” y con base en los lineamientos del comité interno para el cuidado y el uso de animales de laboratorio del CINVESTAV-IPN, No. de protocolo 0090-14.

### ***Electrofisiología.***

#### *a) Obtención de las rebanadas de hipocampo:*

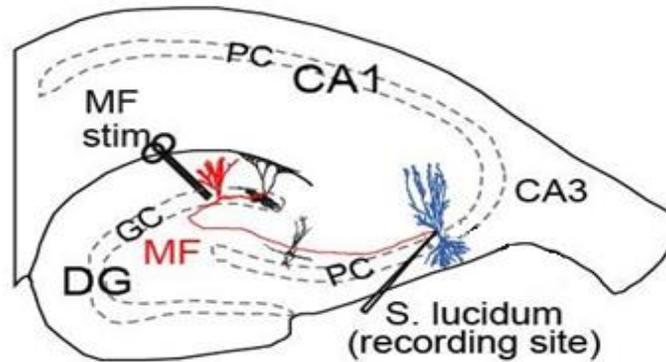
Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/Kg) y por decapitación se obtuvo el cerebro, el cual fue sumergido en una solución de sacarosa, (0-4°C), que contiene: 210 mM Sacarosa, 2.8 mM KCl, 2.0 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCOO<sub>2</sub>, 10 mM Glucosa, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM CaCl<sub>2</sub>. La obtención de rebanadas horizontales de hipocampo (385 mm), se realizó en constante oxigenación, empleando un vibratomo (Leica VT1000S). Las rebanadas obtenidas fueron transferidas a una cámara de incubación mantenida a una temperatura de 33± 2°C durante 30 minutos, la solución de incubación tuvo la siguiente composición: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCOO<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucosa y 1 mM CaCl<sub>2</sub>; burbujeada constantemente con carbógeno; posterior al periodo de incubación las rebanadas se mantuvieron en la misma solución y se dejaron reposar 60 min a temperatura ambiente antes de ser utilizadas para los experimentos.

*b) Registros extracelulares de campo:*

La rebanada fue trasferida a una cámara de registro con líquido cefaloraquídeo artificial (LCRa) que contenía: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCOO<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucosa y 2 mM CaCl<sub>2</sub>. La temperatura dentro de la cámara de registro fue de 36 °C, con un flujo constante de LCRa de 3-5 ml/min.

El estímulo eléctrico consistió en pulsos pareados de corriente a 0.06 Hz; los potenciales de campo se evocaron mediante la inyección de corriente directa utilizando una unidad de aislamiento (A365, World Precision Instruments) a través de un electrodo bipolar constituido de nicromo el cual tiene un diámetro de 50 µm de grosor. Los pulsos cuadrados de corriente tuvieron una duración de 100 ± 25 µs. Las respuestas extracelulares se registraron con una pipeta de borosilicato que al ser llenada con una solución de NaCl (3 M) tuvieron una resistencia de entre 1 y 5 MΩ. Se utilizó un amplificador Dagan BVC-700A acoplado a un headstage con una ganancia adicional de 100x. El ruido eléctrico (50/60 Hz) fue eliminado con un filtro externo (Humbug; Quest Scientific). Los estímulos y pulsos cuadrados de corriente fueron generados con un estimulador Master-8 (AMPI Tech) y las señales electrofisiológicas resultantes fueron almacenadas en el disco duro de una computadora mediante un software de adquisición LabView 7.0 (National Instruments).

Los electrodos de estimulación y de registro fueron colocados como lo muestra la figura 6:



**Figura 6. Esquema registros extracelulares de campo.** Posiciones de electrodos de estimulación y registro. (S = stratum). Región del hipocampo CA3. Vía estudiada GD - CA3. Fibras Musgosas.

### **Estimulación in vitro con insulina e IGF-I.**

Después de la incubación de una hora mínimo en LCRa, se colocaron las rebanadas en una cámara de inmersión ( $\approx 300\mu\text{L}$ ) y se perfundieron constantemente con LCRa fresco calentado a  $36^{\circ}\text{C}$  a una velocidad  $3.5\text{ mL/min}$ . Las rebanadas control se perfundieron con LCRa durante todo el experimento. Una vez obtenida una respuesta sináptica basal estable por 10 min, la rebanada fue expuesta con la sustancia de nuestro interés por 15 minutos y se prosiguió a realizar los distintos protocolos, para evaluar la plasticidad a corto y largo plazo; finalmente se aplicó DCG IV. El mismo protocolo se realizó con IGF-I.

Después de terminar cada experimento, se recolectaron las rebanadas para disectar la región CA3 y realizar el protocolo de Western Blot.

### **Curvas de intensidad de corriente contra fEPSP (E-S)**

Para determinar la excitabilidad neuronal en presencia tanto de insulina como de IGF-I y encontrar la estimulación adecuada que nos permita ver cambios en la amplitud como respuesta al estímulo aplicado, se realizarán curvas entrada-salida, por medio de estimulación por pulsos pareados (60 ms entre cada estímulo), comenzando con  $0\ \mu\text{A}$  de estimulación hasta llegar a  $130\ \mu\text{A}$  en incrementos de  $10\ \mu\text{A}$ .

Al graficar la amplitud (o la pendiente) del potencial de campo en (mV) contra diferentes intensidades de estimulación eléctrica, se obtiene una curva sigmoidea (curva E-S). Esta curva refleja el número de fibras activadas a diferentes intensidades de estimulación y el fEPSP resultante de esa estimulación. Una vez obtenidos los valores de amplitud mínima y máxima (respuesta eléctrica saturada) de la curva E-S, se utilizó la intensidad necesaria para evocar un fEPSP, de una amplitud equivalente al 30-50% de la respuesta máxima obtenida del potencial de campo evocado, para la realización de los diferentes protocolos, esto para poder observar los cambios en la excitabilidad de las fibras neuronales.

Algunos experimentos se llevaron a cabo en presencia de DCG IV (5  $\mu$ M), agonista de receptores metabotrópicos tipo II y III, para comprobar que los fEPSP's registrados en CA3 provienen de la estimulación de las FMs.

### **Inhibición por pulso pareado (IPP)**

Los mecanismos de plasticidad a corto plazo característicos de las MFs, se puede evaluar mediante un análisis del pulso pareado; las alteraciones en el índice de pulso pareado nos hablan acerca de alteraciones a nivel pre y/o postsináptico.

Se utilizó la intensidad de corriente necesaria para evocar un fEPSP con una amplitud de aproximadamente el 40% con respecto a la determinación de la curva E-S. El protocolo de inhibición consistió en la aplicación de dos estímulos consecutivos con intervalos inter estímulo que fueron desde los 5 hasta los 50 ms en intervalos variables.

El IPP fue expresado como la diferencia entre la amplitud de la segunda respuesta con respecto a la primera, para el cálculo de dicho índice se utilizó la siguiente fórmula:

$$IPP = \frac{S_2}{S_1} \quad \text{Donde } S_1 \text{ y } S_2: \text{ amplitud (mV) del primer y segundo fEPSP respectivamente.}$$

De tal manera que:  $IPP > 1$  nos indica facilitación de la respuesta sináptica

$IPP < 1$  nos indica depresión sináptica

### **Inducción farmacológica de plasticidad a largo plazo.**

La plasticidad sináptica a largo plazo, ya sea LTP o LTD, en la sinapsis MFs - CA3 juegan un papel importante en los procesos de memoria y aprendizaje. Estas formas de plasticidad tienen un componente de inducción presináptico a diferencia de la plasticidad a largo plazo de la región CA1, y su generación por medio de paradigmas eléctricos es bien conocido (Wong y Kandel; 1961; Regehr, 1995). Sin embargo, se conoce poco acerca de la farmacología que promueve su inducción. Por lo tanto, para determinar las alteraciones en la plasticidad a largo plazo y cuáles mecanismos dependientes de la acción de la insulina y del IGF-I se están activando para llevar a cabo dichas alteraciones realizamos cursos temporales, los cuales consisten en obtener respuestas estables, y realizar registros de actividad basal durante 10 minutos, posteriormente perfundir insulina o IGF-I durante 15 minutos, realizar un lavado de 30 minutos mínimo y finalmente aplicar DCGIV.

Algunos experimentos se realizaron estimulando la vía de asociación comisural o fibras comisurales de asociación (C/A), para ello el electrodo de estimulación se colocó sobre el stratum radiatum de CA3a y se registró sobre el stratum lucidum; este registro alterno de C/A se utilizó para demostrar la especificidad de las alteraciones inducidas por insulina e IGF-I sobre la sinapsis Mfs – CA3.

### **Biología Molecular.**

*a) Obtención de proteínas totales a partir de rebanadas de hipocampo.*

Con el fin de obtener las proteínas de los tejidos de interés, se llevó a cabo la disección de la región CA3 a partir de las rebanadas utilizadas para los experimentos de electrofisiología. Se homogenizó el tejido con solución de

Laemmli 2x suplementado con ortovanadato 4mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.28 mM y LCRA.

*b) Western Blot.*

Se cargaron las muestras conteniendo 10 $\mu$ l del lisado de CA3 en un gel al 10% de acrilamida-SDS, para separar las proteínas se llevó a cabo una electroforesis desnaturizante. El gel concentrador se corrió a 60 V, una vez las muestras estuvieron en el gel separador el voltaje se cambió a 120 V. Se utilizó un marcador de peso molecular preteñido para determinar el tamaño de las bandas. Una vez separadas, Se transfirieron las proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PDVF) durante 1h a 70 V. Posteriormente se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en PBS-Tween-20 al 0.1%, durante 1h a temperatura ambiente y a continuación se incubó con el anticuerpo primario contra pAkt (para el residuo Ser473). (4060, *Cell Signaling Technology*) dilución (1:1000). Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con leche 1% en PBS-Tween 0.1%. Después se incubó con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (111-035-144, *Jackson ImmunoResearch*), dilución (1:3000). Como control de carga se utilizó la proteína  $\beta$ -actina, como anticuerpo primario anti-actina en una dilución (1:5000) (*ab3280, abcam*) y como anticuerpo secundario un anti-conejo (111-035-144, *Jackson ImmunoResearch*) dilución (1:10000). El análisis de datos se llevó a cabo con un sistema de análisis de imágenes (Image Studio C-Digit).

### **Reactivos**

La sacarosa (S9378), la glucosa (G8270), el bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>2</sub>, S6014), el cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>, 63020), la N-metil-D-glucamina (NMDG, M2004), buffer salino de fosfatos (PBS, P3813), la insulina (I2643) y el IGF-1(I3769) fueron obtenidos de *Sigma Aldrich*. El cloruro de potasio (KCl, 3040), el sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>, 2506), el fosfato dibásico de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3828), el cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>, 1311), el cloruro de sodio (NaCl, 3624), el Tween 20

(P1379), el etanol (IX20) y xileno (917) se adquirieron de *J.T. Baker*. La (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-Dicarboxiciclopropil) glicina (*DCG-IV*, 0975) (*Tocris Bioscience*).

El pentobarbital sódico se obtuvo de *Pisa agropecuaria*. La albúmina de suero bovino (*BSA*, *BP1605*), *Fisher Scientific*. De todos los fármacos y sustancias antes mencionadas, aparece entre paréntesis el número de catálogo.

### **Estadística**

Para el análisis de datos electrofisiológicos, se midió la amplitud de los fEPSP. Los datos se normalizaron a la línea basal (100%). Se usaron no más de tres rebanadas por animal, el promedio de dichas rebanadas se tomaron y se usaron en el análisis.

Todos los datos se expresan como el valor de la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para todas las comparativas se utilizó una prueba ANOVA de una vía entre los diferentes tratamientos, seguida de una prueba post hoc Dunnett. Las diferencias encontradas fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $*p < 0.05$ .

## **RESULTADOS.**

### **La insulina modifica la fuerza de la transmisión sináptica de la sinapsis FM<sub>s</sub>-CA<sub>3</sub>.**

Para determinar si la insulina modifica la fuerza de la transmisión sináptica, se realizaron curvas entrada-salida (Curvas E/S o I/O). Las concentraciones utilizadas para este experimento fueron 5 nM, 25 nM, 125 nM, 630 nM y 3  $\mu$ M de insulina.

En condiciones control, la curva I-O reveló que la amplitud máxima del FM-EPSP fue de  $7.85 \pm 0.25$  mV ( $n = 7$ ) dato que coincide con lo previamente reportado (ver Villanueva-Castillo y cols., 2017). Por otra parte, la perfusión de insulina (5 nM ó

25, 125 o 630 nM) produjo una depresión de la respuesta sináptica (amplitud máxima con 25 nM =  $5.16 \pm 1.6$  mV; con 125 nM insulina =  $5.63 \pm 2.2$  mV; y con 630 nM =  $6.84 \pm 0.9$  mV; n=7). Contrario a estas observaciones, la perfusión de 3  $\mu$ M de insulina produjo un efecto bifásico pues primero deprimió la amplitud de la respuesta sináptica y después la potenció (amplitud máxima con insulina 3  $\mu$ M =  $9.86 \pm 0.69$  mV. Los datos se ilustran en la figura 7.

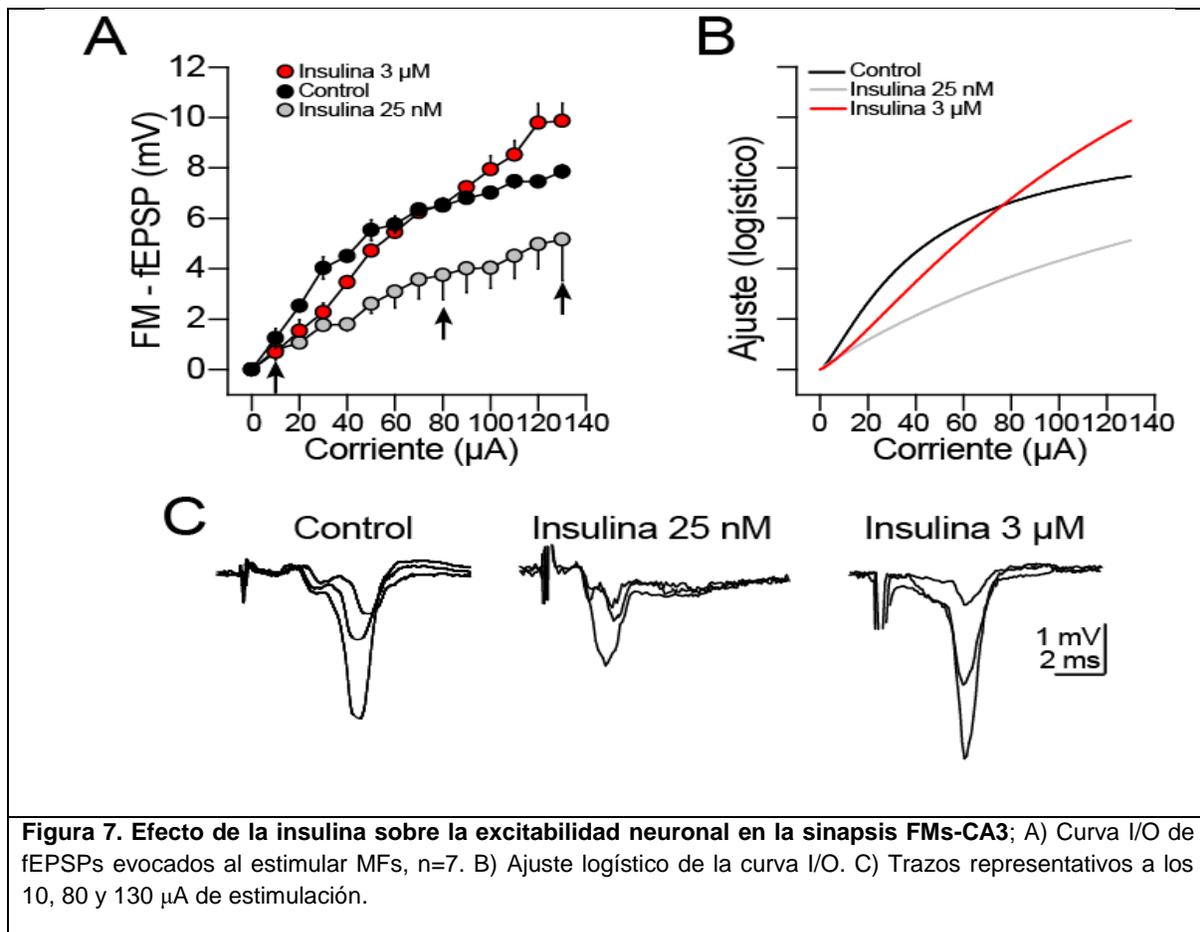


Tabla 1. Valores de amplitud máxima FM-EPSP evaluados mediante protocolo I/O con Insulina.

Concentración de insulina	Amplitud Máxima FM-EPSP $\pm$ SEM
<b>Control</b>	7.85 $\pm$ 0.25 mV
<b>5nM</b>	6,06 $\pm$ 1,61 mV
<b>25 nM</b>	5.16 $\pm$ 1.6 mV
<b>125 nM</b>	5.63 $\pm$ 2.2 mV
<b>630 nM</b>	6.84 $\pm$ 0.9 mV
<b>3 <math>\mu</math>M</b>	9.86 $\pm$ 0.69 mV

### **Efecto de la insulina sobre la transmisión sináptica FM – CA3.**

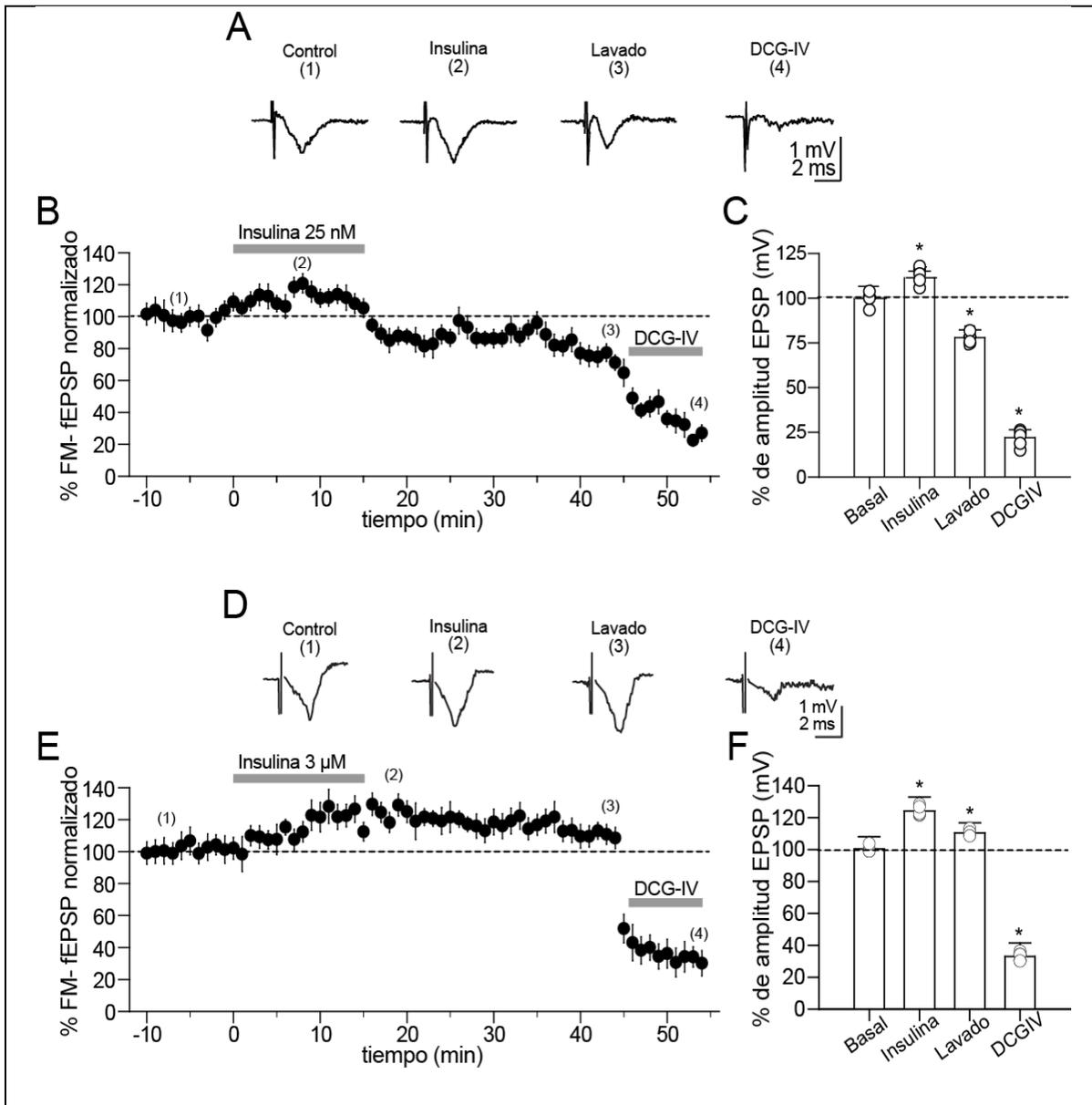
Los experimentos previos demuestran que la insulina modula la fuerza de la transmisión sináptica en la sinapsis FM-CA3. Por tal razón en los siguientes experimentos se probó si la insulina tiene capacidad de alterar la plasticidad de esta sinapsis. Se obtuvo una basal estable de EPSPs durante 20 min y a continuación se perfundió insulina 25 nM. Después de este periodo se retiró la insulina y continuó el registro por 30 minutos más. Al finalizar este periodo, se perfundió el fármaco DCG-IV, un agonista de los receptores metabotrópicos del grupo II. La perfusión de insulina produjo un incremento transitorio del EPSP que posteriormente se convirtió en depresión sináptica (incremento del EPSP durante la perfusión de insulina =  $120.7 \pm 5.98$  %;  $p=0.05$ ; EPSP a los 30 min de lavado =  $81.45 \pm 3.56$  % del valor basal;  $p=0.05$ ;  $n=10$ ). Adicionalmente, la perfusión de DCG-IV deprimió la respuesta sináptica ( $22.4 \pm 3.65$  % de basal;  $p=0.05$ ). La depresión de las respuestas en presencia de DCG-IV confirma que el origen de los EPSPs es la fibra musgosa (Kamiya et al., 1996).

A diferencia de lo observado con 25 nM, la perfusión de 3  $\mu$ M de insulina produjo una potenciación de la respuesta sináptica FM-CA3 (incremento del EPSP durante la perfusión de 3  $\mu$ M de insulina =  $129.7 \pm 7.0$  %;  $p=0.05$ ; EPSP a los 30 min de lavado =  $112.76 \pm 6.34$  % del valor basal;  $p=0.05$ ;  $n=10$ ). De igual manera, la perfusión de DCG-IV deprimió las respuestas sinápticas, corroborando que el

origen de las mismas es la fibra musgosa (EPSP en presencia de DCG-IV =  $30.10 \pm 7.9$  % de basal;  $p=0.05$ ). La figura 8 muestra el promedio del total de experimentos realizados para las dos concentraciones de insulina y respuestas representativas.

**Tabla 2. Porcentaje de amplitud de FM-EPSP  $\pm$  SEM durante el curso temporal con Insulina.**

Condición	Insulina 25 nM	Insulina 3 $\mu$ M
<b>perfusión</b>	$81.45 \pm 3.56$ %	$129.7 \pm 7.0$ %
<b>lavado</b>	$120.7 \pm 5.98$ %	$112.76 \pm 6.34$ %
<b>DCG IV</b>	$22.4 \pm 3.65$ %	$30.10 \pm 7.9$ %



**Figura 8. La insulina induce LTP de la transmisión sináptica entre FMs-CA3.** A) Trazos representativos de los fEPSPs (1) antes, (2) al adicionar y (3) al lavar la insulina (25nM), así como al adicionar (4) DCG IV (5 μM) B) Curso temporal de la amplitud de las fEPSPs evocados al estimular las FMs y la disminución de la misma al adicionar DCG IV. C) Histograma comparativo del porcentaje de amplitud de los fEPSP evocados en distintas condiciones al perfundir con insulina 25 nM. D) Trazos representativos de los fEPSPs (1) antes, (2) al adicionar y (3) al lavar insulina (3μM), así como al adicionar (4) DCG IV (5 μM). E) Curso temporal de la amplitud de las fEPSPs evocados al estimular las FMs y la disminución de la misma al adicionar DCG IV (5 μM). F) Histograma comparativo del porcentaje de amplitud de los fEPSP evocados en distintas condiciones al perfundir con insulina 3 μM. n=10; \*p<0.05. Registros extracelulares de campo.

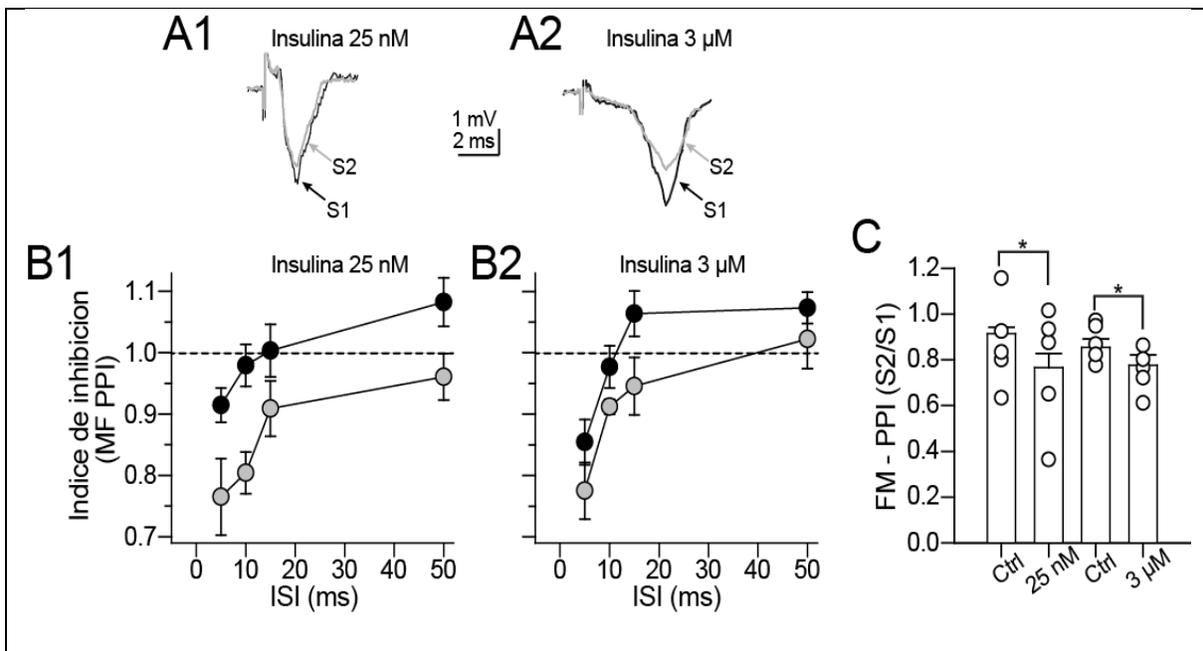
### La insulina incrementa la inhibición en el circuito FM – CA3.

Para determinar si la insulina tiene efecto sobre la transmisión inhibitoria de CA3, se utilizó el protocolo de inhibición por pulsos pareados (PPI, por sus siglas en inglés) utilizando intervalos interestímulo de 5, 10, 15 y 50 ms. El índice PPI se obtuvo al dividir la amplitud de la segunda respuesta entre la amplitud de la primera respuesta. Los valores de PPI <1, indican depresión sináptica mientras que PPI >1 significa facilitación. En condición control, los ISI de 5, 10 y 15 ms producen valores menores a 1 (ilustrado en la 9B1; círculos negros) y la perfusión de insulina (25 nM o 3  $\mu$ M) incrementó el índice de inhibición (círculos grises; ilustrado en la 9B1) de manera significativa (Inhibición control con ISI 5 ms =  $0.91 \pm 0.02$ ; 10 ms =  $0.97 \pm 0.03$ ; 15 ms =  $1.0 \pm 0.04$ ; 50 ms =  $1.08 \pm 0.04$ . En presencia de insulina 25 nM, 5 ms =  $0.76 \pm 0.06$ ; p =0.05. 10 ms =  $0.80 \pm 0.03$ ; p =0.05. 15 ms =  $0.91 \pm 0.04$ ; p =0.05. 50 ms =  $0.9606 \pm 0.03$  p = 0.05. n =7).

Para el caso de la insulina 3  $\mu$ M, la cinética de inhibición mostro un comportamiento similar, con la única diferencia que el intervalo de 50 ms estuvo acompañado por una facilitación de la respuesta sináptica (Figura 9B2); (Inhibición control con ISI 5 ms =  $0.77 \pm 0.04$ ; 10 ms =  $0.91 \pm 0.01$ ; 15 ms =  $0.94 \pm 0.04$ ; 50 ms =  $1.02 \pm 0.04$ . En presencia de insulina 3  $\mu$ M, 5 ms =  $0.85 \pm 0.03$ ; p =0.05. 10 ms =  $0.97 \pm 0.03$ ; p =0.05. 15 ms =  $1.06 \pm 0.03$ ; p =0.05. 50 ms =  $1.07 \pm 0.02$ ; p =0.05. n =7).

**Tabla 3. Índices de inhibición (MF-PPI  $\pm$  SEM) con insulina 25 nM y 3  $\mu$ M.**

ISI	Control (MF-PPI)	(MF-PPI) Insulina 25 nM	Control (MF-PPI)	(MF-PPI) Insulina 3 $\mu$ M
<b>5 ms</b>	$0.91 \pm 0.02$	$0,7650 \pm 0.06$	$0.77 \pm 0.04$	$0.85 \pm 0.03$
<b>10 ms</b>	$0.97 \pm 0.03$	$0,8042 \pm 0.03$	$0.91 \pm 0.01$	$0.97 \pm 0.03$
<b>15 ms</b>	$1.0 \pm 0.04$	$0,9088 \pm 0.04$	$0.94 \pm 0.04$	$1.06 \pm 0.03$
<b>50 ms</b>	$1.08 \pm 0.04$	$0,9606 \pm 0.03$	$1.02 \pm 0.04$	$1.07 \pm 0.02$



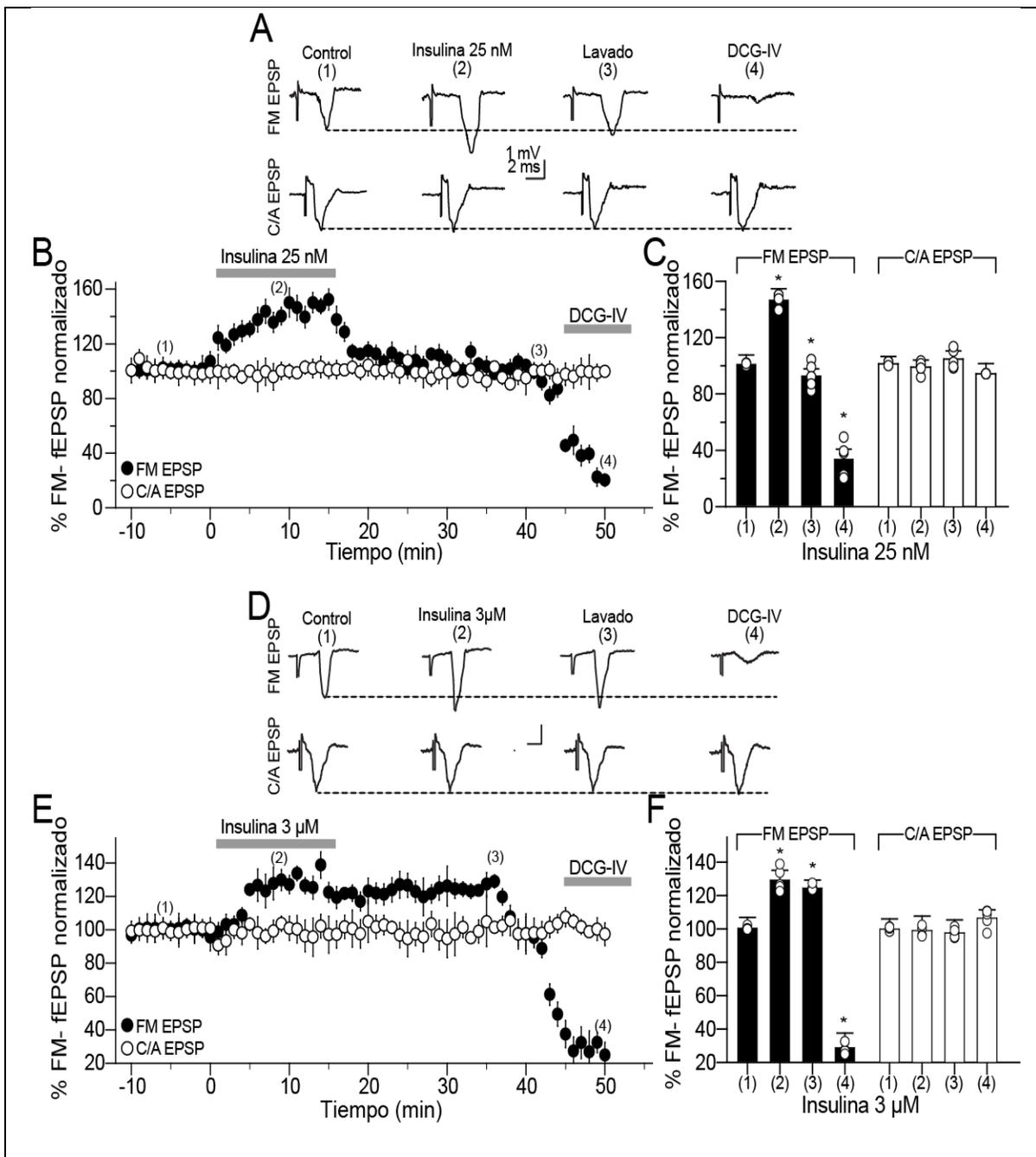
**Figura 9. La insulina aumenta la inhibición proactiva en la sinapsis FMs-CA3;** A1 y A2) Trazos representativos, insulina 25 nM e insulina 3 μM respectivamente, el primer (S1) en negro y segundo (S2) en gris fEPSP's con tiempo entre cada estímulo (ISI) de 5 ms. B1) Índice por pulso pareado (IPP) en la sinapsis MF-CA3 a diferentes ISI, respuestas de las rebanadas control (en negro) el índice por pulsos pareados tiene un valor menor a 1, sin embargo en las rebanadas expuestas a insulina 25nM (en gris) el PPI es significativamente menor en comparación al control. B2) Índice de inhibición (PPI) en la sinapsis MF-CA3 a diferentes ISI, respuestas de las rebanadas control (en negro) el índice por pulsos pareados tiene un valor menor a 1, sin embargo en las rebanadas expuestas a insulina 3 μM (en gris) el PPI es estadísticamente menor en comparación a los obtenidos en las rebanadas control. C) La gráfica de barras representa el índice de inhibición por pulsos pareados con ISI= 5 ms, ANOVA de una vía; n= 7; \* < P= 0.05.

### La insulina induce potenciación sinapsis-especifica.

Además de la sinapsis fibra musgosa – CA3, las neuronas piramidales también recibe contactos sinápticos excitadores de las fibras comisurales de asociación (Berzhanskaya et al., 1998; Claiborne et al., 1993; Yeckel y Berger, 1998). Las fibras comisurales de asociación son colaterales axónicas que hacen sinapsis exclusivamente con otras neuronas de CA3, creando así, un circuito recurrente de excitación local. Por lo tanto, es interesante examinar si los procesos plásticos inducidos por insulina son exclusivos de la sinapsis FM-CA3, o también se presentan en la sinapsis CA3-CA3 (o sinapsis comisural de asociación).

Para este experimento, se colocaron dos electrodos de estimulación, uno sobre las fibras musgosas y otro en el stratum radiatum para activar la sinapsis CA3-CA3 y se registraron consecutivamente ambas respuestas excitadoras. Se obtuvo una basal estable de 20 min de EPSPs y se perfundi6 insulina 25 nM por 15 min. Despues de este tiempo se removio y se continuo 30 min mas antes de aplicar DCG-IV. La insulina produjo efectos muy diferentes en ambas respuestas de la region CA3. Mientras que en la FM-CA3 produjo una potenciación transitoria seguida de una discreta depresión sináptica, la insulina no tuvo efectos sobre la sinapsis CA3-CA3 (MF-EPSP a los 15 min de perfusion de 25 nM insulina =  $152.4 \pm 7.6$  % con respecto a basal,  $p=0.05$ ; a los 30 min =  $111.7 \pm 7.8$  % de basal;  $p=0.05$ . CA3-CA3 EPSP a los 15 min de perfusion de 25 nM insulina =  $100.2 \pm 6.2$  % con respecto a basal,  $p=0.05$ ; a los 30 min =  $95.3 \pm 4.8$  % con respecto a basal;  $p=0.05$ ;  $n=10$ ). Adicionalmente, estas respuestas fueron sensibles a DCG-IV (depresion de  $20.2 \pm 4.2$  % con respecto a basal,  $p=0.05$ ). Los experimentos y trazos representativos de los efectos de insulina se ilustran en la Figura 10A-C.

En el siguiente experimento se examin6 el papel de la dosis de 3  $\mu$ M de insulina. En este caso el resultado fue más claro ya que a esta dosis (3  $\mu$ M) la insulina indujo potenciación de las respuestas FM-CA3 sin causar efecto alguno en la sinapsis CA3-CA3 (MF EPSP a los 15 min de perfusion 3  $\mu$ M de insulina =  $138.7 \pm 7.7$  % con respecto a basal,  $p=0.05$ ; a los 30 min =  $128.9 \pm 3.9$  % de basal;  $p=0.05$ . CA3-CA3 EPSP a los 15 min de perfusion de 3  $\mu$ M insulina =  $103.6 \pm 4.5$  % con respecto a basal,  $p=0.05$ ; a los 30 min =  $101.4 \pm 2.9$  % con respecto a basal;  $p=0.05$ ;  $n=7$ ). La potenciación observada con insulina fue sensible a DCG-IV, corroborando que el origen sináptico de la misma es la fibra musgosa (depresion del EPSP  $24.8 \pm 7.6$  % con respecto a basal,  $p=0.05$ ). En concordancia con nuestros resultados, las respuestas sinapticas CA3-CA3 fueron totalmente insensibles a DCG-IV (EPSP en presencia de DCG-IV =  $97.4 \pm 6.7$  % con respecto a basal). La insensibilidad de esta respuesta a DCG-IV confirma que su origen es la fibra comisural de asociación y que no tiene contaminación sináptica.



**Figura 10. Especificidad de la LTP dependiente de insulina en la sinapsis FMs-CA3.** La LTP inducida por la insulina está presente específicamente en las sinapsis fibra musgosa-CA3 (MF-CA3). A y D) A) Trazos representativos de los fEPSPs (1) antes, (2) al adicionar y (3) al lavar insulina (25nM y 3 μM) respectivamente, el (4) corresponde a la perfusión de DCG IV (5 μM); los trazos de la parte superior corresponden a el fEPSP de MF-CA3; los trazos inferiores corresponden a la sinapsis de la asociación comisural. B y E) Cursos temporales de la amplitud de las fEPSPs evocados, que comparan el efecto de la insulina (25 nM y 3μM respectivamente) de la MF y las respuestas comisurales asociativas en las mismas rebanadas. La LTP es

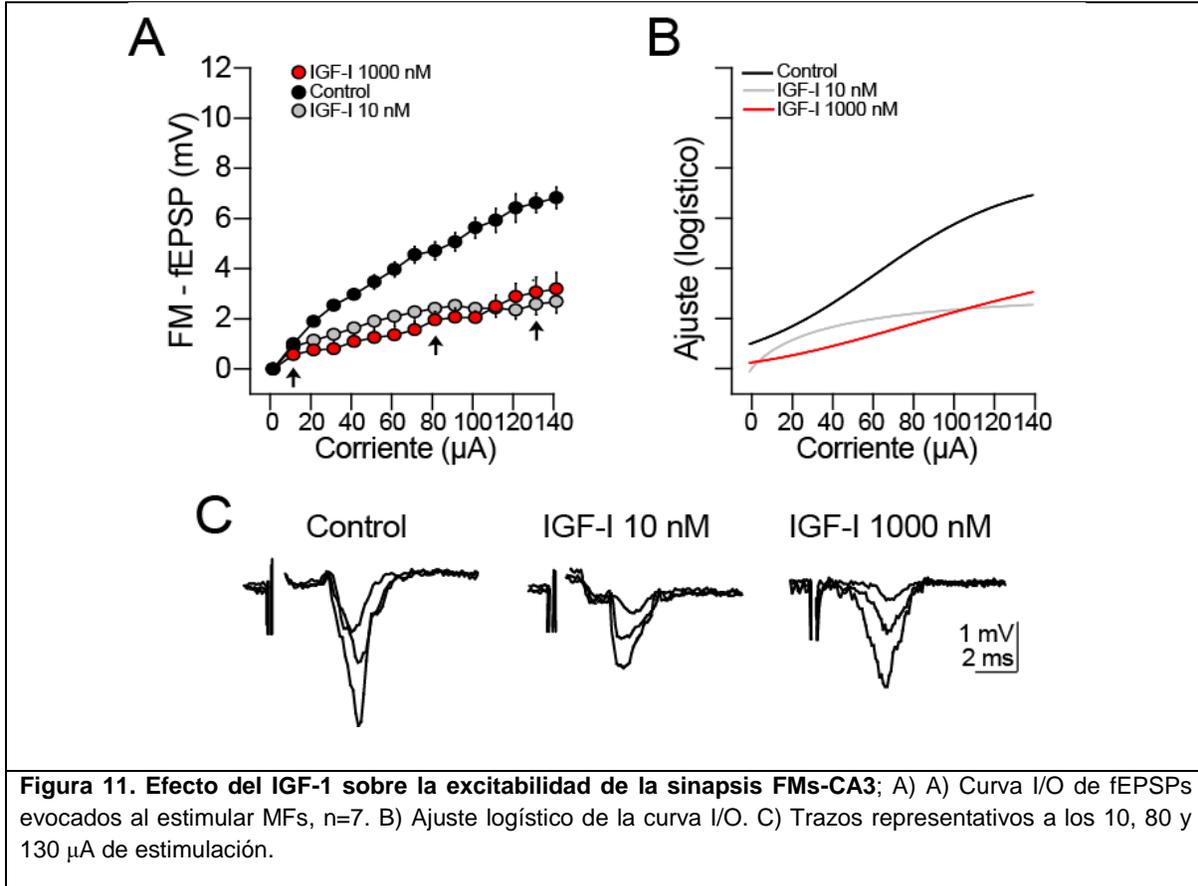
generada específicamente en la sinapsis de MF-CA3, pero no en las sinapsis de asociación comisural. Al final de los experimentos, la aplicación de DCG-IV (5  $\mu$ M) disminuyó la respuesta sináptica de la MF, pero no tuvo efecto sobre las respuestas de asociación comisural. C y F) Histograma comparativo del porcentaje de amplitud de los fEPSP evocados al perfundir con insulina 25nM y 3 $\mu$ M respectivamente; en negro la respuesta de la MF y en blanco el efecto sobre la asociación comisural; resumen de 10 experimentos (n=10) media  $\pm$  e.e., ANOVA de una vía; \*P<0.05.

**Tabla 4. Porcentaje de amplitud  $\pm$  SEM de FM-EPSP vs A/C-EPSP durante el curso temporal.**

Condición	Insulina 25 nM		Insulina 3 $\mu$ M	
	MF-EPSP	A/C-EPSP	MF-EPSP	A/C-EPSP
<b>perfusión</b>	152.4 $\pm$ 7.6 %	100.2 $\pm$ 6.2	138.7 $\pm$ 7.7 %	103.6 $\pm$ 4.5 %
<b>lavado</b>	111.7 $\pm$ 7.8 %	95.3 $\pm$ 4.8 %	128.9 $\pm$ 3.9 %	101.4 $\pm$ 2.9 %
<b>DCG IV</b>	20.2 $\pm$ 4.2 %	106,4 $\pm$ 7.1 %	24.8 $\pm$ 7.6 %	97.4 $\pm$ 6.7 %

### Alteraciones del IGF-I sobre la fuerza de la transmisión sináptica en la sinapsis FM-CA3.

De la misma manera decidimos realizar curvas entrada-salida (E/S o I/O) para determinar si el IGF-I es capaz de modificar la fuerza de la transmisión sináptica.



**Tabla 5. Valores de amplitud máxima FM-EPSP evaluados mediante protocolo I/O con IGF-I.**

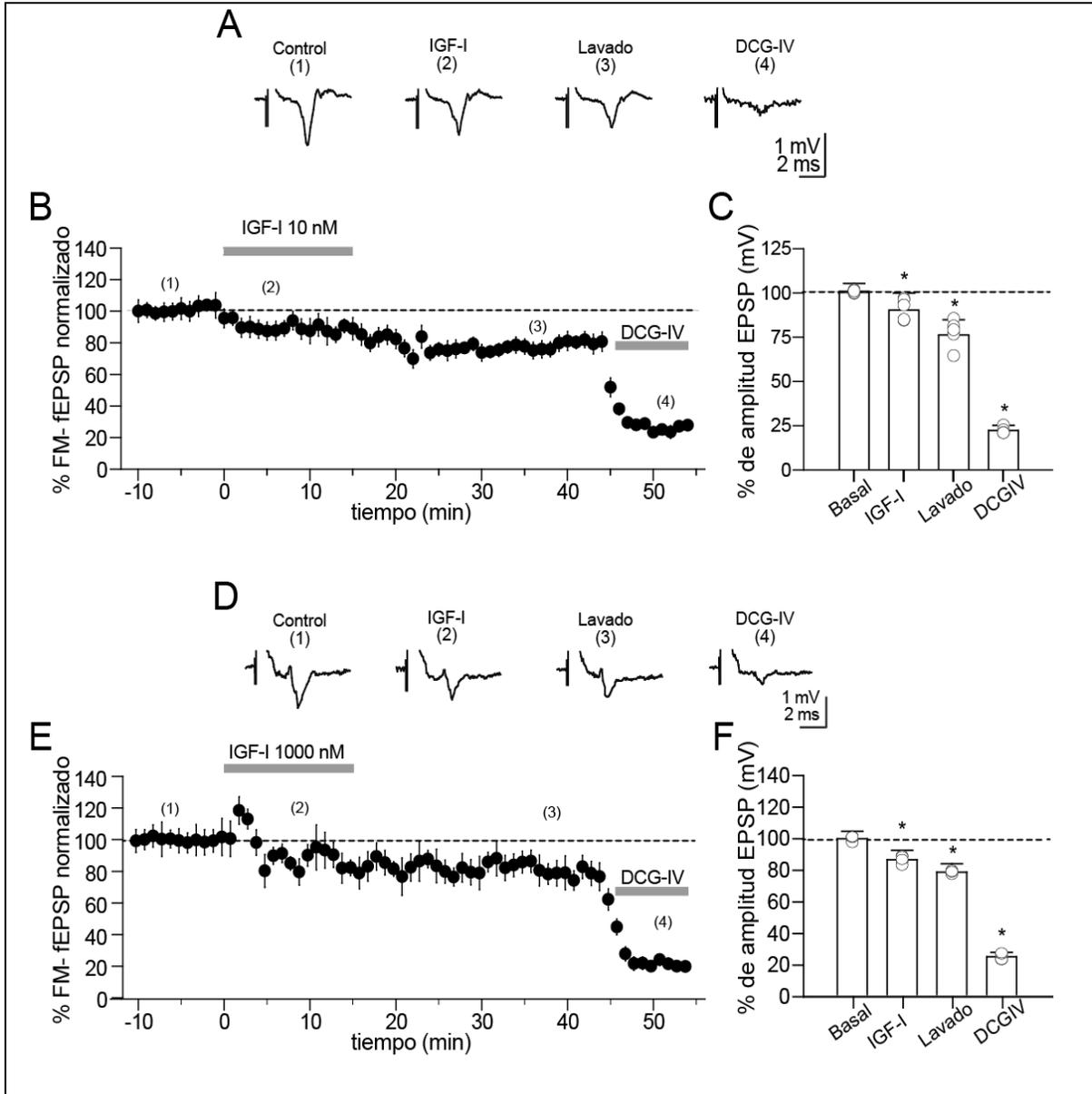
Concentración de IGF-I	Amplitud Máxima FM-EPSP ± SEM
<b>Control</b>	7.30 ± 0.38 mV
<b>1 nM</b>	1.06 ± 0.15 mV
<b>10 nM</b>	2.48 ± 0.46 mV
<b>100 nM</b>	1.55 ± 0.44 mV
<b>1000 nM</b>	3.02 ± 0.68 mV

En este caso utilizamos cuatro concentraciones las cuales fueron 1 nM, 10 nM, 100 nM y finalmente 1000 nM de IGF-I.

Pudimos observar en las condiciones control, que la curva I-O reveló una amplitud máxima del FM-EPSP de  $7.30 \pm 0.38$  mV ( $n = 7$ ) y este dato nuevamente coincide con lo reportado (Villanueva-Castillo y cols., 2017). Por otro lado, cuando perfundimos con IGF-I (1 nM, 10 nM, 100 nM o 1000 nM) se produjo una depresión de la respuesta sináptica (amplitud máxima con 1 nM =  $1.06 \pm 0.15$  mV; con 10 nM IGF-I =  $2.48 \pm 0.46$  mV; con 100 nM =  $1.55 \pm 0.44$  mV y con 1000 nM =  $3.02 \pm 0.68$  mV;  $n=7$ ).

Por lo tanto, encontramos una disminución en la excitabilidad neuronal en la sinapsis MF-CA3 al perfundir con IGF-I. Estos resultados los podemos observar en la figura 11A, mientras que en el panel B) observamos los trazos representativos al perfundir las diferentes concentraciones de IGF-I (1, 10, 100 y 1000 nM).

## Efecto del IGF-I sobre la plasticidad a largo plazo en la sinapsis FM-CA3.



**Figura 12. El IGF-I induce LTD de la transmisión sináptica entre FMs-CA3.** A) Trazos representativos de los fEPSPs (1) antes, (2) al adicionar y (3) al lavar el IGF-I (10 nM), así como al adicionar (4) DCG IV (5  $\mu$ M) B) Curso temporal de la amplitud de las fEPSPs evocados al estimular las FMs y la disminución de la misma al adicionar DCG IV. C) Histograma comparativo del porcentaje de amplitud de los fEPSP evocados en distintas condiciones al perfundir con IGF- I 10 nM. D) Trazos representativos de los fEPSPs (1) antes, (2) al adicionar y (3) al lavar el IGF-I (1000 nM), así como al adicionar (4) DCG IV (5  $\mu$ M). E) Curso temporal de la amplitud de las fEPSPs evocados al estimular las FMs y la disminución de la misma al adicionar DCG IV (5  $\mu$ M). F) Histograma comparativo del porcentaje de amplitud de los fEPSP evocados en distintas condiciones al perfundir con IGF-I 1000 nM. n=10; \* p<0.05. Registros extracelulares de campo.

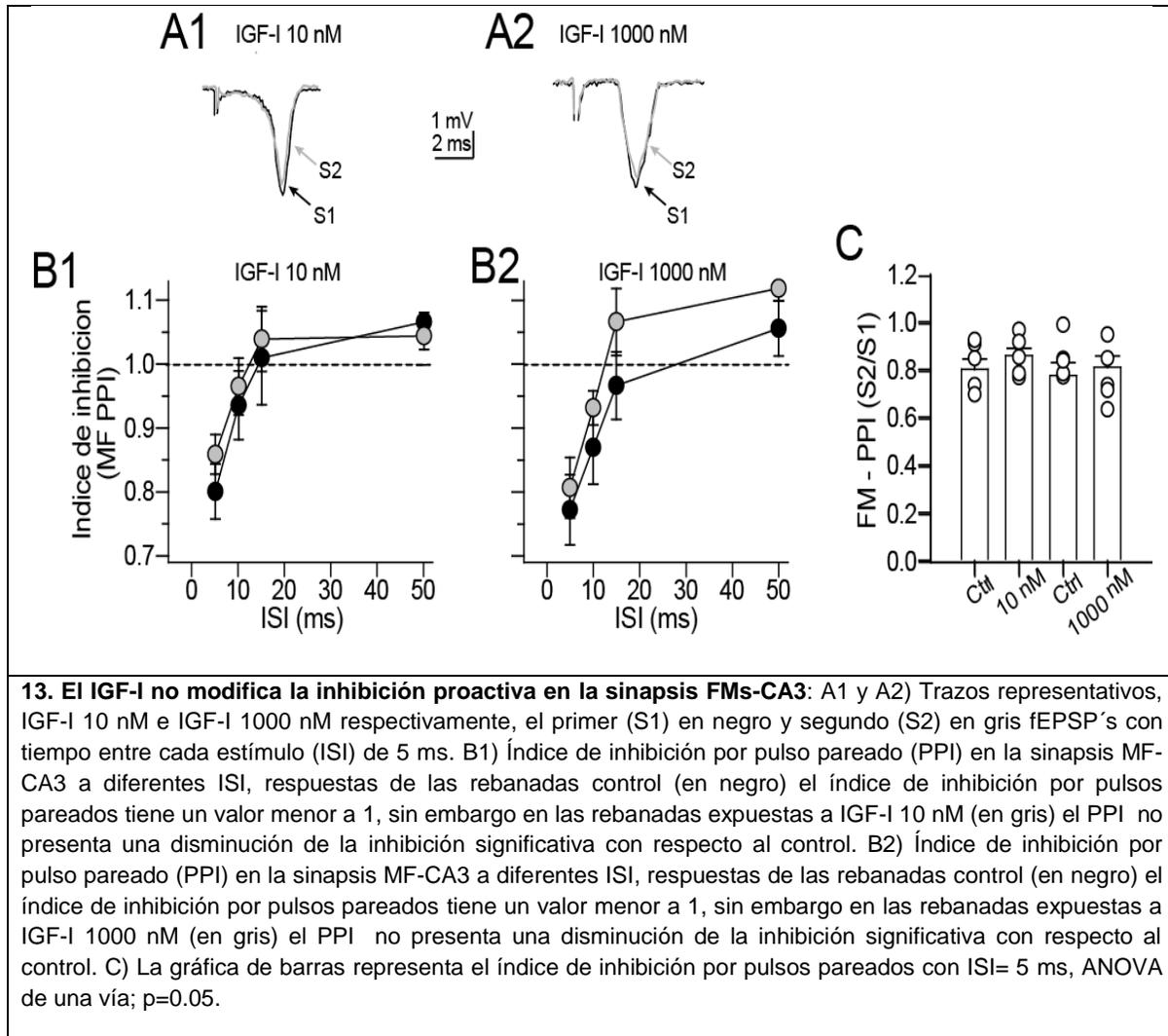
**Tabla 6. Porcentaje de amplitud de FM-EPSP  $\pm$  SEM durante el curso temporal con IGF-I.**

Condición	IGF-I 10 nM	IGF-I 1000 nM
<b>perfusión</b>	89.8 $\pm$ 9.4 %	88.30 $\pm$ 6.31 %
<b>lavado</b>	76.1 $\pm$ 7.25 %	80.26 $\pm$ 5.43 %
<b>DCG IV</b>	22.33 $\pm$ 2.9 %	25.10 $\pm$ 2.90 %

Las curvas I/O demuestran que el IGF-I modula la fuerza de la transmisión sináptica en la sinapsis FM-CA3. Por este motivo en los siguientes experimentos se probó si el IGF-I tiene la capacidad de alterar la plasticidad de esta sinapsis. Para ello se obtuvo un registro basal estable de EPSPs durante 10 min y a continuación se perfundió IGF-I 10 nM durante 15 minutos. Después de este periodo se lavó el IGF-I continuando con el registro por 30 minutos más. Al finalizar este periodo, se perfundió el fármaco DCG-IV, un agonista de los receptores metabotrópicos del grupo II. La perfusión de IGF-I 10 nM produjo una depresión sináptica del EPSP (depresión del EPSP durante la perfusión de IGF-I = 89.8  $\pm$  9.4 %;  $p=0.05$ ; EPSP a los 30 min de lavado = 76.11  $\pm$  7.25 % del valor basal;  $p=0.05$ ;  $n=10$ ). Adicionalmente, la perfusión de DCG-IV deprimió la respuesta sináptica (22.33  $\pm$  2.94 % de basal;  $p=0.05$ ). La depresión de las respuestas en presencia de DCG-IV confirma que el origen de los EPSPs es la fibra musgosa (Kamiya et al., 1996).

La perfusión de IGF-I 1000 nM también produjo una depresión de la respuesta sináptica FM-CA3 (depresión del EPSP durante la perfusión de 1000 nM de IGF-I = 88.30  $\pm$  6.31 %;  $p=0.05$ ; EPSP a los 30 min de lavado = 80.26  $\pm$  5.43 % del valor basal;  $p=0.05$ ;  $n=10$ ). De igual manera, la perfusión de DCG-IV deprimió las respuestas sinápticas, corroborando que el origen de las mismas es la fibra musgosa (EPSP en presencia de DCG-IV = 25.10  $\pm$  2.90 % de basal;  $p=0.05$ ). La figura 12 muestra el promedio del total de experimentos realizados para las dos concentraciones de insulina y respuestas representativas.

**Efecto del IGF-I sobre la transmisión sináptica inhibitora en la sinapsis FM-CA3.**



**Tabla 7. Índices de inhibición (MF-PPI ± SEM) con IGF-I 10 nM y 1000 nM.**

ISI	Control (MF-PPI)	(MF-PPI) IGF-I 10 nM	Control (MF-PPI)	(MF-PPI) IGF-I 1000 nM
<b>5 ms</b>	0,80 ± 0.04	0.85 ± 0.03	0.77 ± 0.05	0.80 ± 0.04
<b>10 ms</b>	0.93 ± 0.05	0.96 ± 0.04	0.87 ± 0.05	0.96 ± 0.04
<b>15 ms</b>	1.00 ± 0.07	1.03 ± 0.05	0.96 ± 0.05	1.06 ± 0.05
<b>50 ms</b>	1.06 ± 0.01	1.04 ± 0.02	1.05 ± 0.04	1.12 ± 0.02

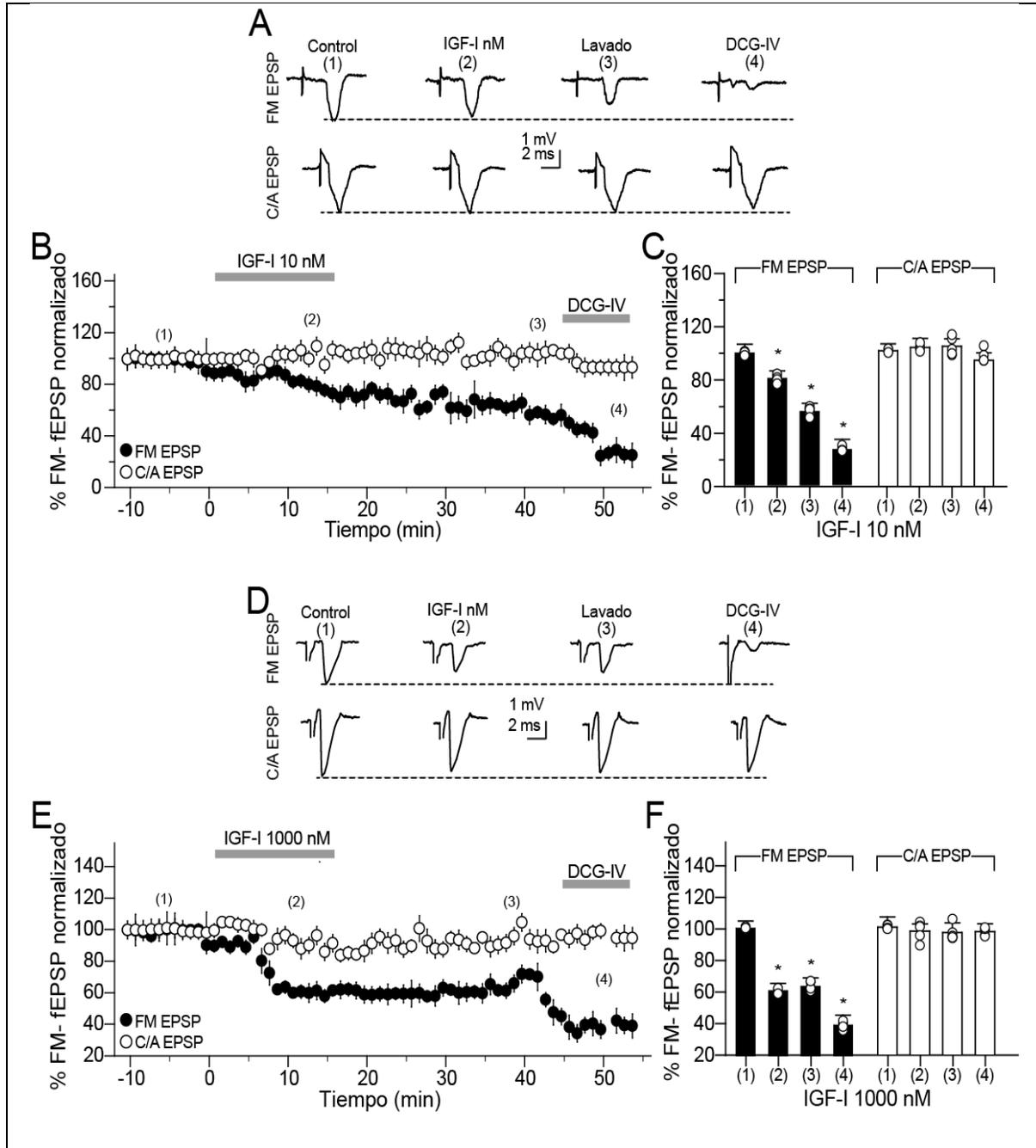
Nuevamente, una vez caracterizadas las alteraciones que causa el IGF-I en la modulación de la plasticidad sináptica en la sinapsis FM-CA3, se aplicó el mismo protocolo de inhibición (PPI por sus siglas en ingles) por pulsos pareados para estudiar la acción del IGF-I sobre la transmisión sináptica inhibitoria de CA3, utilizando intervalos interestímulo de 5, 10, 15 y 50 ms.

En condición control, los ISI de 5, 10 y 15 ms producen valores menores a 1 (Ilustrado en la 13B; círculos negros) y la perfusión de IGF-I (10 nM o 1000 nM) disminuyó el índice de inhibición (círculos grises) sin embargo, este efecto no fue significativo (Inhibición control con ISI 5 ms =  $0,80 \pm 0.04$ ; 10 ms =  $0.93 \pm 0.05$ ; 15 ms =  $1.0 \pm 0.07$ ; 50 ms =  $1.06 \pm 0.01$ . En presencia de IGF-I 10 nM, 5 ms =  $0.85 \pm 0.03$ ; p = 0.05. 10 ms =  $0.96 \pm 0.04$ ; p = 0.05. 15 ms =  $1.03 \pm 0.05$ ; p = 0.05. 50 ms =  $1.04 \pm 0.02$  p = 0.05. n = 7).

Para el caso de IGF-I 1000 nM, la cinética de inhibición mostro un comportamiento similar, (Inhibición control con ISI 5 ms =  $0.77 \pm 0.05$ ; 10 ms =  $0.87 \pm 0.05$ ; 15 ms =  $0.96 \pm 0.05$ ; 50 ms =  $1.05 \pm 0.04$ . En presencia de IGF-I 1000 nM, 5 ms =  $0.80 \pm 0.04$ ; p = 0.05. 10 ms =  $0.93 \pm 0.02$ ; p = 0.05. 15 ms =  $1.06 \pm 0.05$ ; p = 0.05. 50 ms =  $1.12 \pm 0.02$ ; p = 0.05. n = 7).

Estos resultados obtenidos del protocolo de inhibición nos dicen que el IGF-I no causa una alteración de la inhibición proactiva de CA3, por lo tanto, la liberación de GABA no se ve afectada de manera significativa.

**El IGF-I induce alteraciones en la plasticidad de manera específica en la sinapsis FM-CA3.**



**Figura 14. Especificidad de la LTD dependiente de IGF-I en la sinapsis FM-CA3.** La LTD inducida por el IGF-I está presente específicamente en las sinapsis fibra musgosa-CA3 (MF-CA3). A y D) Trazos representativos de los fEPSPs (1) antes, (2) al adicionar y (3) al lavar IGF-I (10nM y 1000nM)

respectivamente, el (4) corresponde a la perfusión de DCG IV (5  $\mu$ M); los trazos de la parte superior corresponden a el fEPSP de MF-CA3; los trazos inferiores corresponden a la sinapsis de la asociación comisural. B y E) Cursos temporales de la amplitud de los fEPSPs evocados, que comparan el efecto del IGF-I (10nM y 1000nM respectivamente) de la MFs y las respuestas comisurales en las mismas rebanadas. La LTD es generada específicamente en la sinapsis de MF-CA3, pero no en las sinapsis de asociación comisural. Al final de los experimentos, la aplicación de DCG-IV (5  $\mu$ M) disminuyó la respuesta sináptica de la MF, pero no tuvo efecto sobre las respuestas de asociación comisural. C y F) Histograma comparativo del porcentaje de amplitud de los fEPSP evocados al perfundir con IGF-I 10nM y 1000nM respectivamente; en negro la respuesta de la MF y en blanco el efecto sobre la asociación comisural; Resumen de siete experimentos (n=7) media  $\pm$  SEM., ANOVA de una vía, \* P < 0.05.

**Tabla 8. Porcentaje de amplitud  $\pm$  SEM de FM-EPSP vs A/C-EPSP durante el curso temporal con IGF-I.**

Condición	IGF-I 10 nM		IGF-I 1000 nM	
	MF-EPSP	A/C-EPSP	MF-EPSP	A/C-EPSP
<b>perfusión</b>	80.93 $\pm$ 5.50 %	103.9 $\pm$ 6.6 %	51,94 $\pm$ 5.54 %	97.07 $\pm$ 5.5 %
<b>lavado</b>	56.09 $\pm$ 5.98 %	104.8 $\pm$ 5.6 %	55.40 $\pm$ 6.42 %	95.91 $\pm$ 7.64 %
<b>DCG IV</b>	27.53 $\pm$ 7.50 %	106,4 $\pm$ 7.1 %	24.9 $\pm$ 7.5 %	96.63 $\pm$ 3.57 %

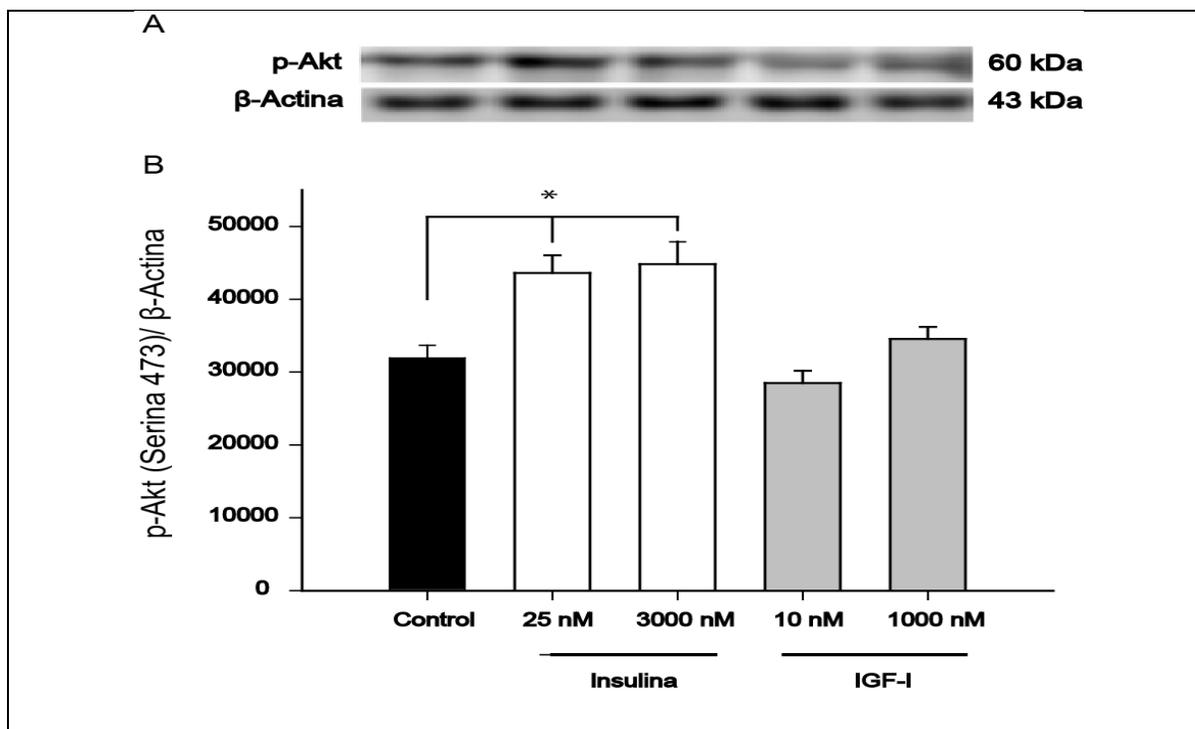
De la misma forma que la insulina produjo efectos muy diferentes en ambas entradas sinápticas que evaluamos en la región CA3, el IGF también tuvo efectos específicos sobre la FM-CA3, en este caso el IGF-I produjo una depresión sináptica, mientras que no tuvo efectos sobre la sinapsis CA3-CA3 (MF EPSP a los 15 min de perfusión 10 nM de IGF-I = 80.93  $\pm$  5.50 % con respecto a basal, p=0.05; a los 30 min = 56.09  $\pm$  5.98 % de basal; p =0.05. CA3-CA3 EPSP a los 15 min de perfusión de 10 nM de IGF-I = 103.95  $\pm$  6.68 con respecto a basal, p=0.05; a los 30 min = 104.82  $\pm$  5.60 % con respecto a basal; p =0.05; n=10). Adicionalmente, estas respuestas fueron sensibles a DCG-IV (depresión de 27.53  $\pm$  7.50 % con respecto a basal, p=0.05). Los experimentos y trazos representativos de los efectos de insulina se ilustran en la Figura 14A-C.

En el siguiente experimento se examinó el papel de la dosis de 1000 nM de IGF-I. De la misma manera (1000 nM) de IGF-I indujo una depresión de las respuestas FM-CA3 sin causar efecto alguno en la sinapsis CA3-CA3 (MF EPSP a los 15 min de perfusión 1000 nM de IGF-I =  $51,94 \pm 5.54$  % con respecto a basal,  $p=0.05$ ; a los 30 min =  $55.40 \pm 6.42$  % de basal;  $p =0.05$ . CA3-CA3 EPSP a los 15 min de perfusión de 1000 nM de IGF-I =  $97.07 \pm 5.58$  % con respecto a basal,  $p=0.05$ ; a los 30 min =  $95.91 \pm 7.64$  % con respecto a basal;  $p =0.05$ ;  $n=7$ ). La depresión observada con IGF-I fue sensible a DCG-IV, corroborando que el origen sináptico de la misma es la fibra musgosa (depresión del EPSP  $24.9 \pm 7.5$  % con respecto a basal,  $p=0.05$ ). En concordancia con nuestros resultados, las respuestas sinápticas CA3-CA3 fueron totalmente insensibles a DCG-IV (EPSP en presencia de DCG-IV =  $96.63 \pm 3.57$  % con respecto a basal). La insensibilidad de esta respuesta a DCG-IV confirma que su origen es la fibra comisural de asociación y que no tiene contaminación sináptica. Estos experimentos se representan en la Figura 14D-F.

Estos resultados sugieren que la LTD dependiente del IGF-I es específico de la sinapsis MF- CA3, ya que no está presente en la entrada sináptica de asociación comisural hacia CA3.

### **La señalización PI3K/Akt está involucrada en los procesos de plasticidad inducidos por insulina pero no los inducidos por IGF-I.**

La literatura ha reportado en varios trabajos que la activación de la vía PI3K/Akt a través del IRS desempeña un papel fundamental tanto en la acción de la insulina como en la del IGF-I (Saltiel y Pessin, 2002; Laurino L. and Wang XX, 2005), por lo tanto nos dimos a la tarea de examinar si esta vía se enciende y como consecuencia causa las alteraciones en los fenómenos de plasticidad que observamos anteriormente una vez que perfundimos brevemente con insulina o IGF-I los registros electrofisiológicos de rebanadas de hipocampo.



**Figura 15. La señalización PI3K/Akt regula las alteraciones en la plasticidad dependientes de insulina pero no las dependientes de IGF-I.** A) Western Blot representativo que muestra que la aplicación de insulina aumenta la intensidad de la banda de 60 kDa correspondiente a p-Akt, a diferencia del IGF-I donde no se observa efecto alguno sobre esta misma banda, esta intensidad en las bandas fue comparado con respecto el control. B) La cuantificación densitométrica de tres experimentos (n=3) se resume en el gráfico de barras. Media ± SEM. donde \*p< 0.05.

La cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas mediante el Western Blot (figura 15) revelaron el aumento en la fosforilación de Akt después del tratamiento con insulina con ambas concentraciones (25 nM y 3µM). Por otro lado el IGF-I no muestra con ninguna de las dos concentraciones utilizadas (10 y 1000 nM) algún efecto significativo sobre la fosforilación de Akt.

Por lo tanto la vía de señalización PI3K/Akt está implicada únicamente en la inducción de fenómenos de plasticidad como la LTP o el aumento de la inhibición proactiva observada con insulina, pero esta no es la responsable de las

alteraciones en la plasticidad sináptica observadas con el IGF-I, a pesar de que se ha demostrado su actividad en respuesta de IGF-I R.

### **Discusión.**

En este trabajo hemos caracterizado los efectos electrofisiológicos inducidos por la insulina y el IGF-I sobre la transmisión sináptica, la respuesta del circuito inhibitorio y la potenciación a largo plazo en la sinapsis MF-CA3 del hipocampo. Los hallazgos más destacados del presente trabajo son (1) que una breve aplicación de insulina modifica la fuerza de la transmisión sináptica de manera dependiente de la concentración; concentraciones en el rango nanomolar deprimen la transmisión sináptica y concentraciones arriba del rango micromolar incrementan la excitabilidad; (2) la insulina es capaz de inducir una potenciación de la respuesta sináptica en la sinapsis MF-CA3 del hipocampo; (3) que la potenciación mediada por insulina es específica de la sinapsis MF-CA3, ya que no es posible obtenerla en la sinapsis CA3-CA3; (4) la insulina produce un aumento en la inhibición proactiva dada por la actividad de las interneuronas y (5) los efectos electrofisiológicos observados parecen involucrar la activación de la vía PI3K/Akt.

Por otra parte, los resultados obtenidos con IGF-I son opuestos a lo observado con insulina: (1) una breve aplicación de IGF-I deprime la transmisión en la sinapsis MF-CA3 independientemente de la concentración empleada; (2) que el IGF-I – produce depresión sináptica en la sinapsis MF-CA3; (3) este fenómeno solo ocurre en la MF-CA3 y no en la sinapsis CA3-CA3; (4) que el IGF-I no altera la inhibición proactiva basal y finalmente, (5) que estos efectos parecen ser independientes de la vía PI3K / Akt

### **La insulina modula la excitabilidad y la fuerza de la transmisión sináptica en las sinapsis FM-CA3.**

La información en la literatura acerca de las alteraciones que causa la insulina a la transmisión sináptica en la vía MFs- CA3 es prácticamente nula; por tal motivo,

investigamos su capacidad para modular el circuito neuronal de esta región. Las curvas I-O revelaron que a concentraciones nanomolares, la insulina disminuye la excitabilidad neuronal, mientras que a rangos micromolares aumenta la excitabilidad.

En la literatura no existen reportes que contrasten o que respalden este efecto. Sin embargo, existen estudios hechos en cultivos de células hipocámpales de CA1 en donde se ha encontrado que la insulina, la glicina así como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) regulan la expresión membranal de los receptores tipo AMPA (Passafaro et al., 2001 ; Man et al., 2003, Stellwagen et al., 2005). Los tres compuestos previamente mencionados modulan el tráfico de receptores AMPA por un mecanismo dependiente de la activación de la vía PI3K (Passafaro et al., 2001). Un posible mecanismo que podría subyacer a los efectos moduladores de la insulina es que promueva la inserción o la endocitosis de receptores AMPA en la sinapsis de la fibra musgosa. Más aún, que los procesos de potenciación y depresión sináptica de esta región son primordialmente mediados por este tipo de receptores (Harris y Cotman, 1986).

Adicionalmente, otra posible explicación a la variabilidad en la excitabilidad es que la activación de la cinasa Akt en células piramidales de hipocampo, incrementa el flujo de calcio a través de receptores AMPA, produciendo hiperexcitabilidad (Chen et al., 2011). Por otra parte, estudios realizados en *Drosophila* demostraron un mecanismo de retroalimentación negativa mediado por la activación de la vía PI3K que regula la excitabilidad neuronal. En el trabajo citado se menciona que la retroalimentación negativa de la excitabilidad de la neurona motora en *Drosophila* se produce a través de la activación inducida por glutamato de autorreceptores DmGluRA del tipo metabotrópico muy similares a los receptores del grupo mGluR II altamente expresados en el SNC de mamíferos, específicamente en la fibra musgosa, causando la inhibición dependiente de PI3K por medio del factor de transcripción Foxo y acompañado por una consiguiente disminución en la excitabilidad neuronal (Howlett E., et al., 2008)

En conjunto estos trabajos pueden dar una explicación a la modulación de la excitabilidad y por consiguiente al aumento o disminución de la fuerza de la transmisión sináptica basal, ya que el aumento o la reducción del número de receptores AMPA postsinápticos así como su sensibilidad están dados por la actividad de la vía PI3K/Akt. Ambas posibilidades requieren investigación adicional.

### **El IGF-I disminuye la excitabilidad y la fuerza de la transmisión sináptica en las sinapsis FM-CA3.**

Por otro parte, nuestros resultados mostraron sistemáticamente que el IGF-I deprime la transmisión sináptica MF-CA3. En la literatura existen diversos estudios que apoyan el hecho de que el IGF-I juega un papel importante en los fenómenos que están detrás de la excitabilidad neuronal. En este sentido, un reporte demostró que el IGF-I disminuye la corriente  $I_A$  presente en las dendritas de las células piramidales del hipocampo, por lo tanto disminuye la generación de potenciales de acción dendríticos y consecuentemente se altera la forma de los EPSP ( Hoffman et al., 1997 ). Además, el IGF-I modula otros canales iónicos de membrana, por ejemplo canales de  $Ca^{2+}$  y canales de  $K^+$  ( Blair y Marshall 1997 ; Fadool et al 2000 ; Kanzaki et al., 1999 ; Sakagami et al 1999 ) o inclusive se sabe que modula la activación y el tránsito de receptores ionotrópicos como los de glutamato, y receptores GABA ( González de la Vega et al., 2001 , Man et al., 2000 ,Savchenko y otros 2001 , Wan et al., 1997 ). De igual manera, el IGF-I disminuye las corrientes mediadas por receptores AMPA en cultivos de neuronas de Purkinje sin afectar las corrientes mediadas por NMDA ( Wang y Linden 2000). Esta capacidad multifuncional del IGF-I para modular tantos tipos de canales le dan un contraste muy interesante a nuestros resultados ya que si bien no explican del todo la disminución en la excitabilidad neuronal y la disminución en la fuerza de la transmisión sináptica que nosotros observamos, si la respalda parcialmente el hecho de que el IGF-I modula a la baja las corrientes mediadas por los receptores tipo AMPA de la misma manera que lo hace la insulina, probablemente

a través de la endocitosis de los mismos. Entre otras conductancias que regula el IGF-I y que podrían estar implicadas en la alteración de la excitabilidad se encuentran la inhibición de corrientes  $I_A$  de  $K^+$ , activación de receptores Kainato, activa canales de  $Ca^{2+}$  y al co-transportador de  $K^+/Cl^-$ .

En contraste con lo obtenido en este trabajo, existen reportes que muestran un aumento en la excitabilidad de células hipocampales en presencia de IGF-I, sin embargo, estos experimentos fueron hechos en cultivos de células hipocampales indistintas (Xing C. et al., 2006; 2007), una condición experimental que carece de especificidad asociada a los circuitos propios de la formación hipocampal. Además, los registros en el trabajo citado se realizaron tras 24 horas de incubación con IGF-I 100 nM, siendo que las acciones sobre la fuerza de la transmisión sináptica del IGF-I se alcanzaron a observar en nuestro laboratorio de manera experimental con una breve aplicación de tan solo 15 minutos.

### **El papel de la insulina en los procesos de plasticidad a largo plazo en las sinapsis FM-CA3.**

Como se mencionó con anterioridad, el recambio postsináptico de receptores AMPA promovido por la activación de la vía de señalización de PI3K, juega un papel relevante en procesos de plasticidad sináptica en el cerebro (Carroll et al., 2001; Sanna Pietro Paolo et al., 2002). En este sentido, la inducción de la LTD en la región CA1 está asociada con una reducción en la densidad de receptores AMPA membranales. Y más aún, la LTD es insulino-dependiente e involucra activación de la vía de PI3K (Kandler et al., 1998; Luthi et al., 1999); esto se ha demostrado en neuronas de la región CA1 del hipocampo (Man et al., 2000) y en cultivos de neuronas cerebelares de purkinje (Wang y Linden, 2000). Por otra parte la expresión de la LTP estudiada en CA1 está asociada con un incremento en el abastecimiento de receptores de tipo AMPA en las espinas dendríticas (Shi et al., 1999; Hayashi et al., 2000).

Nuestros resultados mostraron que el efecto de la insulina fue dependiente de la concentración. En concordancia con nuestro hallazgo, un trabajo previo (Huang Chiung C. et al 2004), reportó que la insulina deprime la transmisión sináptica de la región CA1 de manera dependiente de la concentración. Dado que nosotros encontramos potenciación con insulina, surge la pregunta, ¿cuál es el motivo de esta diferencia? Una probable respuesta podría ser que en lo que respecta a la región CA3, se esté llevando a cabo la inserción de receptores AMPA en la postsinapsis, en lugar de endocitarlos como sucede en CA1, y, ¿De qué depende esta inserción? esta inserción de receptores AMPA podría estar dada por la acción de la insulina mediante la interacción con su receptor y la consecuente activación de alguna de las vías canónicas de señalización. De ser así, estaríamos hablando que la LTP insulino-dependiente puede inducirse a nivel postsináptico en la sinapsis MF-CA3 a diferencia de la habitual inducción por estimulación a alta frecuencia que se lleva a cabo presinápticamente. Esta explicación es consistente con algunos trabajos en los cuales se afirma que la LTP es favorecida por la inserción de los receptores AMPA en la zona sináptica (Passafaro et al., 2001), esta inserción es consecuencia de la activación de la cinasa PI3K y de la actividad de los receptores NMDA (Heng-Ye Man et al., 2003); además de que la expresión superficial en la membrana neuronal de receptores AMPA depende del tipo de subunidad del cual están conformados (Passafaro et al., 2001). Otro punto a favor de esta hipótesis es que existe una expresión diferencial entre los tipos de AMPARs que hay en CA1 y los que hay en CA3, se sabe que en la región CA1 predominan los receptores que contienen la subunidad GluR2 es decir receptores AMPA que son permeables a  $Ca^{2+}$ , mientras que en CA3 predominan los receptores que contienen la subunidad GluR1 los cuales no son permeables a  $Ca^{2+}$ , solo a  $Na^{+}$  (Panicker S. et al., 2008). Además, es importante resaltar que la activación mediante la insulina de los receptores AMPA que contienen a la subunidad GluR1 es predominante sobre la activación de los receptores que están conformados por alguna subunidad GluR2 (Passafaro et al., 2001), este dato refuerza también lo que observamos en nuestros resultados.

### **El papel del IGF-I en los procesos de plasticidad a largo plazo en las sinapsis FM-CA3.**

Como se mencionó previamente, la inserción y endocitosis de receptores de glutamato es un mecanismo asociado a la depresión y potenciación sináptica, respectivamente. Además, este fenómeno (inserción/remoción), es modulado por IGF-I (Tropea et al., 2009). El IGF-I promueve la endocitosis de receptores AMPA por un mecanismo que involucra clatrin, con la concomitante movilidad de vesículas entre los sistemas de membranas. El IGF-I promueve la endocitosis del receptor AMPA que contiene a la subunidad GluR2 (Wang y Linden, 2000; Deak y Sonntag, 2012). Una posible explicación para la FM-LTD inducida por IGF-I es que este factor trófico remueve AMPAR con subunidades GluR2 postsinápticas disminuyendo de esta manera, la fuerza de la transmisión excitadora.

### **La insulina estimula el circuito inhibitorio en la región CA3.**

El circuito GD-CA3 posee un fuerte mecanismo de inhibición GABAérgica que restringe la excitación glutamatérgica. Dado el arreglo citoarquitectónico de las fibras musgosas, por cada neurona piramidal contactada, se realiza previamente contacto con alrededor de 15 interneuronas GABAérgicas (Mcbain, 2008; Buzsaki, 1984).

El protocolo de inhibición por pulsos pareados reveló que la perfusión de insulina incrementa momentáneamente la inhibición GABAérgica. Un incremento en la inhibición implica que momentáneamente, las interneuronas son más excitables y liberan más GABA. Dado que el registro electrofisiológico se realizó en el stratum lucidum, y esta región es rica en interneuronas de disparo rápido positivas a parvalbumina (Refs) que además inervan perisomáticamente a las neuronas piramidales, es válido hipotetizar que las interneuronas de disparo rápido positivas a parvalbumina expresan receptores de Insulina, una idea que vale la pena explorar.

Estudios previos han reportado que la insulina induce un rápido reclutamiento de receptores funcionales tipo GABA<sub>A</sub> a la membrana postsináptica. La inserción de receptores GABA se observa en 10 minutos tras la perfusión de Insulina. Este mecanismo parece ser importante en los procesos de plasticidad. Además, la inserción de receptores GABA<sub>A</sub> es a nivel postsináptico, cercano a los sitios presinápticos de liberación de GABA (Q. Wan et al., 1997). El incremento en la densidad de receptores GABA promovería la eficacia de la transmisión inhibitoria para evitar la pérdida del balance excitador/inhibidor, y como consecuencia favorecería los procesos de plasticidad. Esta hipótesis requiere validación experimental.

### **El papel del IGF-I en los procesos de plasticidad a corto plazo en las sinapsis FM-CA3.**

Nuestros resultados mostraron que la perfusión de IGF-I no modula la inhibición GABAérgica. Sin embargo, la literatura reporta que el IGF-I maduro es un neuromodulador. Hay reportes que sugieren que el IGF-I disminuye la liberación de GABA en diversas regiones corticales y en el giro dentado del hipocampo (Torres Aleman, 1993). Estos reportes no concuerdan con los resultados que nosotros obtuvimos experimentalmente con el protocolo de IPP. ¿Cuál es el motivo de que no exista una pérdida significativa de la inhibición al perfundir con IGF-I incluso con la concentración de 1000 nM? Una posible explicación sería que las interneuronas del stratum lucidum (de disparo rápido y que expresan parvalbumina) carecen de este receptor. Tampoco podemos descartar que quizás, nuestro protocolo de estimulación no tiene la sensibilidad suficiente para registrar un efecto significativo sobre la inhibición proactiva. La posible modulación (o ausencia de la misma) por IGF-I en interneuronas de CA3 puede estudiarse de manera directa con experimentos de patch clamp en célula única. Esta posibilidad está considerada en un futuro cercano.

### **El efecto de insulina e IGF-I son específicas de la sinapsis FM – CA3.**

Uno de los descubrimientos más notorios en este trabajo fue que tanto la insulina como el IGF-I ejercen sus efectos de manera específica en la región CA3 del hipocampo. Nuestros experimentos revelaron que ambas hormonas modulan la transmisión glutamatérgica de la sinapsis FM-CA3, pero carecen de efectos en la sinapsis Comisural de Asociación – CA3 (o sinapsis CA3-CA3).

A pesar de la complejidad de conexiones sinápticas y de las múltiples entradas excitadoras que convergen en las neuronas piramidales de CA3, es posible identificar al menos, dos tipos de sinapsis en estas neuronas. Las conexiones provenientes del giro dentado, mediadas por las fibras musgosas y las conexiones cuyo origen son otras neuronas piramidales de CA3. Ambas sinapsis tienen características que las hacen diferentes entre sí, entre las que destacan: 1) *Composición de la transmisión glutamatérgica*. Mientras la FM-CA3 está compuesta por predominantemente receptores tipo AMPA localizados en espinas distribuidas en el ápice dendrítico, la sinapsis CA3-CA3 son mixtas: están compuestas por receptores AMPA y NMDA que se distribuyen a través de todo el árbol dendrítico; 2) *Facilitación*; mientras la FM-CA3 tiene una marcada facilitación sináptica ( $\geq 400\%$ ), las sinapsis CA3-CA3 apenas expresan facilitación ( $\leq 150\%$ ). 3) *Sensibilidad farmacológica*: A nivel presináptico, las sinapsis FM-CA3 expresa receptores metabotrópicos de glutamato tipo II cuya activación está acoplada negativamente a la adenilato ciclasa-cAMP-PKA. La activación de este receptor suprime la liberación de glutamato de la terminal nerviosa. Dado que las terminales presinápticas comisurales (la sinapsis CA3-CA3) carece de este receptor, la aplicación del agonista DCG-IV no tiene efectos sobre el proceso de liberación de glutamato. Esta herramienta farmacológica permite identificar de manera confiable, el origen de las respuestas registradas. Un EPSP que expresa depresión de  $\approx 90\%$  con DCG-IV, proviene de las fibras musgosas. De igual manera la insensibilidad a este agonista nos da la certeza que la respuesta registrada proviene de la sinapsis comisural de asociación.

Nuestros registros pareados mostraron que la perfusión de DCG-IV suprimió exclusivamente la respuesta proveniente de la FM sin modificar el EPSP proveniente de la fibra comisural, dando certeza a que los efectos observados tras la perfusión de insulina o IGF-I se indujeran en una sinapsis claramente identificada.

Esto conlleva a la pregunta ¿porqué la sinapsis FM-CA3 es sensible a estas hormonas y la sinapsis CA3-CA3 no lo es? En primer lugar, hay que tener presente que ambas sinapsis coexisten en la neurona de CA3, aunque su distribución espacial es diferente. Las sinapsis FM-CA3 es una sinapsis gigante, que se forma muy cerca del soma neuronal. La sinapsis comisural es pequeña y se distribuye a lo largo del árbol dendrítico de la neurona piramidal. Esto nos permite especular que tanto insulina como IGF-I tendrían potencial para modular plasticidad a nivel somático e incapacidad para controlar procesos de plasticidad a nivel dendrítico.

También, que una sinapsis sea sensible y otra insensible (a insulina e IGF-I) favorece la idea que las espinas dendríticas (sitios especializados donde se encuentran las sinapsis) y sus respectivas vías de señalización de segundos mensajeros, se encuentran segregados al interior de la neurona. Si tomamos en cuenta que nuestros resultados mostraron que el efecto de insulina involucra la vía de señalización PI3K/Akt, es válido especular que mientras la sinapsis FM-CA3 expresa la maquinaria celular asociada a esta vía, la sinapsis CA3-CA3 carece de este mecanismo de señalización intracelular. Dado que la vía PI3K/Akt tiene acciones a nivel nuclear, es válido especular que la cercanía de la sinapsis FM-CA3 facilitaría su efecto modulador a nivel nuclear. Caso opuesto, la lejanía de la sinapsis CA3-CA3 dificultaría una respuesta nuclear tras la acción estimuladora mediada por insulina o IGF-I.

A pesar de lo interesante que resultan estas especulaciones, se requieren más experimentos para poder corroborar cada una de estas ideas.

## **La señalización PI3K/Akt está involucrada en los procesos de plasticidad inducidos por insulina pero no los inducidos por IGF-I.**

Como se mencionó previamente, la acción de la insulina (pero no de IGF-I) está mediada por la cascada de señalización PI3K/Akt. Los Western Blots realizados con este fin, mostraron un aumento significativo en la fosforilación de la serina 473 de Akt consecuencia de la activación de la PI3K. La activación de esta vía de señalización, está implicada en diversos procesos de plasticidad sináptica dependiente de la activación de mTOR (Charles A. Hoeffler and Eric Klann, 2011). En contraste, el IGF-I no tuvo efectos sobre la vía PI3K/Akt. Dado que el receptor de IGF-I puede estar acoplado tanto a PI3K/Akt como a la vía de ERK/MAPK, es posible que en las neuronas piramidales de CA3, su activación estimule a ERK/MAPK, una hipótesis que debe ser corroborada con western blots y con bloqueadores selectivos de esta vía de señalización.

## **Consideraciones finales sobre las concentraciones de insulina e IGF-I usadas en este estudio**

Lo reportado en la literatura, nos dice que la concentración de insulina en el SNC es similar a la que se encuentra a nivel periférico la cual proviene del páncreas (50-110 pmol/L), estudios realizados con un modelo de estreptozotocina demuestran que el SNC posee un importante poder amortiguador de los niveles de insulina, ya que mientras que los niveles séricos de insulina periférica se ven afectados significativamente, los niveles de insulina en SNC no se modifican drásticamente (Havrankova et al., 2017). Por otro lado el IGF-I, una vez que se alcanza la adultez los niveles de IGF-I permanecen constantes (135-450 ng/ml), de la misma forma que la insulina, el IGF-I tiene niveles basales similares en SNC, el cual se ha visto que tiene diferentes orígenes, el principal aporte es endocrino proveniente del hígado, pero también existe aporte paracrino proveniente de las meninges y la vasculatura cerebral, y por último el aporte autocrino producto de las neuronas y la glía (W.E. Sonntag, 1999; YingJie Wu, 2009).

Existen diversos reportes tanto de insulina como de IGF-I donde se demuestra que la alteración o la deficiencia en los niveles basales de ambos factores a nivel del SNC, trae como consecuencia deterioros cognitivos, y son una de las causas del desarrollo de patologías neurodegenerativas, por ejemplo la más común y que comparten ambos factores es la enfermedad de Alzheimer. De hecho la diabetes de tipo II es un factor de riesgo para padecer este tipo de demencia. Recientemente se ha observado que la proteína  $\beta$ -amiloide, que se sobreproduce en la enfermedad de Alzheimer, causa alteraciones en la vía de señalización de la insulina, lo que apoya la relación entre este padecimiento y la insulina (Heras Sandoval, 2009). El IGF-I por su parte se ha relacionado con esta demencia al encontrarse disminuido en pacientes que presentan Alzheimer (Tham, A., 1993; Mustafa A., 1999). El motivo de esta capacidad amortiguadora que el SNC presenta para mantener los niveles basales de insulina e IGF-I, aun cuando los niveles de ambos factores se ven afectados en la periferia, muy probablemente sea para evitar alteraciones que conlleven al desarrollo de neuropatologías. .

Por último, se ha determinado que la concentración de insulina en hipocampo completo es  $\approx 0.2$  ng/g (Baskin et al., 1983) y no existen reportes que hayan determinado la concentración de IGF-I en esta estructura cerebral; y al día de hoy, no hay reportes que hayan determinado la concentración de estas hormonas en las diferentes regiones del hipocampo, incluida la región CA3.

Este planteamiento pondría en duda si las concentraciones que utilizamos en este estudio mimetizan las acciones fisiológicas promovidas por ambas hormonas. Teniendo presente estas limitaciones, nosotros optamos por utilizar concentraciones de insulina e IGF-I que han sido reportadas previamente en la literatura. Aun así, es difícil saber o descartar *a priori* si estas concentraciones son relevantes en condiciones fisiológicas. A pesar de esto, nuestros resultados aportan información consistente que tanto insulina como IGF-I modulan de manera específica la fuerza de las sinapsis de las neuronas piramidales de CA3 a través

de vías de señalización intracelular. Estos hallazgos son la pauta para posteriores estudios bioquímicos y biofísicos sobre la plasticidad sináptica de CA3.

## **Conclusión**

En este trabajo se presenta uno de los primeros estudios sobre la caracterización de las alteraciones en la transmisión sináptica de la región CA3 (MFs – CA3) del hipocampo, derivadas de la aplicación de insulina e IGF-I.

Nuestros resultados muestran que la perfusión de insulina modula la fuerza de la transmisión MF-CA3 de manera dependiente de la concentración y genera potenciación a largo plazo. Además, la insulina aumenta la inhibición por pulsos pareados, afectando la inhibición proactiva. Western blots de la región CA3 mostraron que el efecto de la insulina está mediado por la activación de la vía fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K). Por otra parte, el IGF-I produjo efectos opuestos a los observados con insulina en los fenómenos previamente descritos: su perfusión causó depresión de la sinapsis MF-CA3 y disminución de la inhibición proactiva. Ni la insulina ni el IGF-I modularon la transmisión sináptica de la sinapsis comisurales de asociación de CA3 (CA3-CA3), lo que sugiere que estas hormonas actúan de manera sinapsis específica en la región CA3 del hipocampo.

En conjunto todos estos resultados muestran que dichas alteraciones en las MFs afectan los mecanismos de plasticidad a corto y largo plazo que subyacen a los procesos cognitivos de memoria y aprendizaje en el circuito GD-CA3.

## Referencias.

Gaarskjaer F.B. (1978) Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. I. Terminal area related to number of granule and pyramidal cells. *J Comp Neurol* 178:49–72.

Baron-Van Evercooren A; Expression of IGF-I and insulin receptor genes in the rat central nervous system: a developmental, regional, and cellular analysis. *J Neurosci Res.* 1991 Feb;28(2):244-53.

Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. Department of Physiology, *Physiol Rev.* 1999 Oct; University of Wisconsin School of Medicine, USA.

Hui L, Pei DS, Zhang QG, Guan QH, Zhang GY. The neuroprotection of insulin on ischemic brain injury in rat hippocampus through negative regulation of JNK signaling pathway by PI3K/Akt activation. *Brain Res.* 2005; 1052: 1-9

Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, et al. Brain insulin receptors and spatial memory. *J Biol Chem.* 1999; 274: 34893-902.

Hong M, Lee VM. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate Tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem.* 1997; 272: 19547-53.

Hori K, Yasuda H, Konno D, Maruoka H, Tsumoto T, Sobue K. NMDA receptor-dependent synaptic translocation of insulin receptor substrate p53 via protein kinase C signaling. *J Neurosci.* 2005; 25: 2670-81.

Lars P. van der Heide et al. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. Department of Pharmacology and Anatomy, University Medical Center Utrecht, The Netherlands; June 2006.

Hong M, Lee VM. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate Tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem.* 1997; 272: 19547-53.

Hori K, Yasuda H, Konno D, Maruoka H, Tsumoto T, Sobue K. NMDA receptor-dependent synaptic translocation of insulin receptor substrate p53 via protein kinase C signaling. *J Neurosci.* 2005; 25: 2670-81.

Andersen P., Morris P., Amaral D., Bliss T., O'Keefe J. (2007). *The Hippocampus Book*. Published by Oxford University Press, Inc. 198 Madison Avenue, New York, New York 10016.

Steward O., Scoville S.A. (1976) Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurol* 169:347–370.

Tamamaki N., Nojyo Y. (1993) Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus* 3:471–480.

Frotscher M. (1989). Mossy fiber synapses on glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons: evidence for feed-forward inhibition in the CA3 region of the hippocampus. *Exp Brain Res*, 75(2): 441-5.

Trejo, J., Piriz, J., Llorens-Martin, M.V., Fernandez, A.M., Bolos, M., LeRoith, D., Nunez, A., and Torres-Aleman, I. (2007). Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol. Psychiatry* 12: 1118-1128.

Trejo, J.L., Carro, E., Garcia-Galloway, E., and Torres-Aleman, I. (2004). Role of insulin-like growth factor I signaling in neurodegenerative diseases. *J. Mol. Med.* 82: 156-162.

Isackson, P.J. (1995). Trophic factor response to neuronal stimuli or injury. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 350-357.

Kurmasheva, R.T. and Houghton, P.J. (2006). IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1766: 1-22.

Lopez-Lopez, C., LeRoith, D., and Torres-Aleman, I. (2004). Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101: 9833-9838.

McMorris, F.A., Mozell, R.L., Carson, M.J., Shinar, Y., Meyer, R.D., and Marchetti, N. (1993). Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 692: 321-334.

Acsády L., Kamondi A., Sík A., Freund T., Buzsáki G. (1998). GABAergic Cells Are the Major Postsynaptic Targets of Mossy Fibers in the Rat Hippocampus. *Neuroscience*, May, 18(9):3386.

Nicoll R.A, Schmitz D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci*, 6(11):863-76.

Kobayashi K. (2010). Hippocampal mossy fiber synaptic transmission and its modulation. *Vitam Horm.* 82:65-85.

Jonas J., Major G, Sakmann B. (1993). Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J Physiol.* 472:615-63.

Zucker R.S., Regehr W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol.* 64, 355-405.

Salin, P. A., Scanziani, M., Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. (1996). Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 13304–13309.

Harris, E.W., Cotman, C.W. (1986). Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber response is not blocked by N-methyl d-aspartate antagonists. *Neurosci. Lett.* 70, 132e137.

Galván E.J., Cosgrove K.E., Barrionuevo G. (2011). Multiple forms of long-term synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses on interneurons. *Neuropharmacology*. 60(5):740-7.

Lawrence, J.J., McBain, C.J. (2003). Interneuron diversity series: containing the detonation feedforward inhibition in the CA3 hippocampus. *Trends Neurosci*. 26, 631e640.

McBain, C.J. (2008). Differential mechanisms of transmission and plasticity at mossy fiber synapses. *Prog. Brain Res*. 169, 225e240.

Jung, M. W. & McNaughton, B. L. (1993). Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus* 3, 165–182.

Henze, D. A., Urban, N. N. & Barrionuevo, G. (2000). The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* 98, 407–427.

Mori, M., Abegg, M. H., Gähwiler, B. H., and Gerber, U. (2004). A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature* 431, 453–456.

Deng W., Aimone J.B., Gage F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*. 11(5):339-50.

Witter M. P., Groenewegen H. J., Lopes da Silva F. H., Lohman A. H. M. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog. Neurobiol*. 33:161– 253.

Van Groen T (2001). The entorhinal cortex of the mouse. *Cytoarchitectonical organization*. *Hippocampus*. 11:397–407.

Van Groen T., Kadish I., Wyss J. M. (2002). Species differences in the projections from the entorhinal cortex to the hippocampus. *Brain Research Bulletin*, Vol. 57, Nos. 3/4, pp. 553–556.

Bondy, C.A. (1991). Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J. Neurosci.* 11: 3442-3455.

Bondy, C.A. and Lee, W.H. (1993). Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 692: 33-43.

Bach, M.A., Shen-Orr, Z., Lowe, W.L., Jr., Roberts, C.T., Jr., and LeRoith, D. (1991). Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 10: 43-48.

Dudek S. M. and Bear M. F. (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 4363–4367.

Dunwiddie T. and Lynch G. (1978) Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: localization and frequency dependency. *J. Physiol.* 276, 353–367.

O'Kusky J. R., Ye P. and D'Ercole A. J. (2000) Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J. Neurosci.* 20, 8435–8442.

Paulsen O. and Moser E. I. (1998) A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 21, 273–278.

Man H. Y., Lin J. W., Ju W. H., Ahmadian G., Liu L., Becker L. E., Sheng M. and Wang Y. T. (2000) Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25, 649–662.

Marks J. L., Porte D., Jr, Stahl W. L. and Baskin D. G. (1990) Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127, 3234–3236.

Lizcano J. M. and Alessi D. R. (2002) The insulin signalling pathway. *Curr. Biol.* 12, R236–R238.

Lu Y. M., Roder J. C., Davidow J. and Salter M.W. (1998) Src activation in the induction of long-term potentiation in CA1 hippocampal neurons. *Science* 279, 1363–1367.

Lee CC, Huang CC, Wu MY, Hsu KS. Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biol Chem.* 2005; 280: 18543-550.

Hori K, Yasuda H, Konno D, Maruoka H, Tsumoto T, Sobue K. NMDA receptor-dependent synaptic translocation of insulin receptor substrate p53 via protein kinase C signaling. *J Neurosci.* 2005; 25: 2670-81.

Kandel ER. Cellular mechanisms of learning and biological basis of individuality. En: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM editors. *Principles of neural sciences.* New York: McGraw-Hill; 2000. p. 1247-79.

Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Braunton J, Lu WY, et al. Recruitment of functional GABAA receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature.* 1997; 338: 686-90.

Kelly A. and Lynch M. A. (2000) Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Neuropharmacology* 39, 643–651.

Adamo M., Raizada M. K. and LeRoith D. (1989) Insulin and insulinlike growth factor receptors in the nervous system. *Mol. Neurobiol.* 3, 71–100.

Reyes Olivares, J. A. & Arellano Plancarte, A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev. Educ. Bioquímica* 27, 9–18 (2008).

Sweatt J. D. (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* 76, 1–10.

Sweatt J. D. (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 311–317.

Schulingkamp, R.J., Pagano, T.C., et al. (2000) Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24: 855-872.

Zhao W. Q. and Alkon D. L. (2001) Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol. Cell Endocrinol.* 177, 125–134.

Coffer P.J., Jin J. and Woodgett J.R. (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.* 335, 1–13.

Rommel C., Clarke B. A., Zimmermann S., Nunez L., Rossman R., Reid K., Moelling K., Yancopoulos G.D. and Glass D.J. (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286, 1738–1741.

Sweatt J.D. (2001). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* 76, 1–10.

White, M. F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* 182, 3–11 (1998).

Engelman, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer* 9, 550–562 (2009).

Liu, X.-J., He, A.-B., Chang, Y.-S. & Fang, F.-D. Atypical protein kinase C in glucose metabolism. *Cell. Signal.* 18, 2071–2076 (2006).

Vannucci, S. J. et al. Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Dev. Neurosci.* 20, 369–379 (1998).

McNay, E. C. & Recknagel, A. K. Reprint of: “Brain insulin signaling: A key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes”. *Neurobiology of Learning and Memory* 96, 517–528 (2011).