

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Biomedicina



“REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO IGF-I SINTETIZADO EN EL CEREBRO ADULTO”

Autor: **Brenda Carolina Rincón Villarreal**

Tutor Externo: **Carlos Vicario Abejón**

Tutor: **Iván Fernández de Lamo; Beatriz Martín**

Villaviciosa de Odón,
23 de mayo de 2025

ANEXO IX

**Título del Trabajo: “REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS POR EL FACTOR DE
CRECIMIENTO IGF-I SINTETIZADO EN EL CEREBRO ADULTO”**

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto Cajal (CSIC) en el laboratorio “Células Madre, Neurogénesis y Neurodegeneración” C05 a cargo del Dr. Carlos Vicario-Abejón



Tutor/es: Carlos Vicario Abejón; Iván Fernández de Lamo; Beatriz Martín

A mis papás y a mi Keki
Los quiero mucho.

Índice

Abstract	5
Introducción	5
Conceptos generales sobre la neurogénesis	5
Células Madre Neurales y Neurogénesis	5
Neurogénesis Adulta	6
Nichos Neurogénicos	7
Neurogénesis en la Zona Subventricular- Bulbo Olfatorio	8
Neurogénesis en el Hipocampo	10
Regulación de la neurogénesis	12
Interneuronas Parvalbúmina	15
Hipótesis y Objetivos	15
Metodología del Trabajo	16
Líneas de Ratón	16
Ratón Nestina-	16
Ratón Igf-I LoxP	17
Ratón Nestina-Cre/Igf-I LoxP (Δ/Δ)	17
Genotipado	17
Extracción de ADN	17
PCR	18
Electroforesis.....	18
Caracterización morfológica y Contaje Celular	19
Corte en Vibratomo	19
Inmunohistoquímica.....	19
Microscopía Confocal y Análisis de Imagen	20
Análisis Estadístico	21
Resultados y Discusión	21
Análisis de densidad neuronal en el BO	21
Papel del Igf-I en la orientación de las neuronas en el BO y en el HP	23
Papel del Igf-I en la morfología de las IN-PV en el BO y en el HP	27
Conclusiones	30
Bibliografía	31
Anexos	33
1. Listado de Abreviaturas	33
2. Anexos Introducción	35
3. Anexos Material y Métodos	37
4. Anexos Resultados y Discusión	40

Abstract

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (Igf-I) ejerce un papel importante en la neurogénesis adulta, especialmente en la generación, migración y organización de las neuronas. Este trabajo se ha centrado en el estudio de los efectos provocados por la delección condicional del gen *Igf-I* cerebral en ratones (*Igf-I*^{Δ/Δ}), con especial énfasis en la densidad de interneuronas parvalbúmina (IN-PV) en el bulbo olfatorio (BO) y en su disposición y morfología en el BO y en el hipocampo (HP). Se realizó un estudio de densidad para observar la cantidad de neuronas en un volumen determinado en la Capa Plexiforme Externa (CPE) y en la Capa Glomerular (CGL) del BO. En la CGL se observó un aumento significativo de IN-PV en el grupo mutante (*Igf-I*^{Δ/Δ}), lo cual indica que existe un aumento de la cantidad de neuronas por volumen frente al grupo control (*Igf-I*^{+/+cre}). La clasificación de la disposición neuronal se basó en cuatro orientaciones: radial, horizontal, oblicua y no asignable (NA) en *Igf-I*^{Δ/Δ} frente a los *Igf-I*^{+/+cre}. En el BO, se observó un incremento significativo de IN-PV con disposición desorganizada (oblicua, no asignable) en individuos *Igf-I*^{Δ/Δ}. En el HP también se observaron diferencias significativas, en este caso con predominancia radial, indicando un patrón de reorganización distinto al BO. Asimismo, se compararon parámetros morfológicos como el área y volumen del soma y la longitud y número total de dendritas. Se encontró un aumento significativo de la longitud total de las dendritas en el HP de los individuos *Igf-I*^{Δ/Δ}. Esto sugiere una posible alteración en la migración y localización de las IN-PV provocado por la deficiencia condicional de *Igf-I*, sugiriendo un posible efecto región-específico.

Introducción

Conceptos generales sobre la neurogénesis

Células Madre Neurales y Neurogénesis

Se define como neurogénesis a la formación de neuronas a partir de sus células precursoras, las células madre neurales (CMN) también llamadas células tipo B1 en la zona subventricular (ZSV) y células tipo I en el hipocampo (HP) (1,2). Las CMN hacen referencia a las células progenitoras primarias multipotentes que son responsables de iniciar los linajes celulares que

terminan en la formación de células especializadas o diferenciadas, siendo estas las neuronas y las células de la glía. Sin embargo, estas células especializadas pueden ser formadas a través de la amplificación de células progenitoras intermedias (CPI), que carecen del potencial completo de diferenciación de las CMN, pero pueden resultar en la generación de neuronas o células de la glía (3). (Ver *Anexo 2.1 “Desarrollo embrionario neuronal en el humano”*) Antiguamente se creía que la neurogénesis ocurría únicamente durante el desarrollo embrionario y perinatal de los mamíferos, sin embargo, evidencias más recientes han apuntado que una pequeña parte de neuronas son generadas en determinadas áreas del cerebro adulto, especialmente en roedores y en primates no humanos. Estas áreas específicas en donde ocurre la neurogénesis adulta se denominan nichos (4).

Neurogénesis Adulta

Se le conoce como neurogénesis adulta al proceso de creación de nuevas neuronas, las cuales se integran en el circuito neuronal preexistente del cerebro adulto (4). Se ha demostrado en distintos tipos de animales, en este caso mamíferos como ratones y ratas, el continuo nacimiento de neuroblastos procedentes de las CMN en nichos específicos del SNC, como lo son la ZSV-BO y la zona subgranular (ZSG) del HP. Concretamente, los neuroblastos de la ZSV migran a lo largo de la corriente migratoria rostral (CMR), dirigiéndose hacia el BO, en donde migran radialmente para diferenciarse en distintos tipos de neuronas. La gran mayoría de estas nuevas neuronas se establecen en el BO y así, se diferencian en distintos subtipos de interneuronas GABAérgicas y dopaminérgicas, las cuáles son de naturaleza inhibitoria. En el BO se pueden observar distintas subpoblaciones de interneuronas que pueden distinguirse por su localización, morfología, conectividad y, especialmente, marcadores moleculares. Algunos de los ejemplos más destacados son las interneuronas calretinina (Calr), calbindina (Calb) y, con especial interés en este trabajo, las parvalbúmina (PV)(2).

La incorporación de nuevas neuronas a los circuitos del cerebro adulto es un enfoque primordial de investigación, el cual podría revelar funciones esenciales de las nuevas neuronas generadas en ámbitos como la memoria y el comportamiento. Especialmente, la integración de neuronas, post natales y adultas, en el hipocampo confiere un grado adicional de plasticidad en algunos mecanismos de memoria contextual (5).

Nichos Neurogénicos

Se denomina nicho al microambiente anatómico que alberga células madre y controla su desarrollo funcional *in vivo*. Entre las células que componen estos nichos en los cerebros de mamíferos adultos, se encuentran: las células endoteliales, células endimarias, astrocitos, microglía, y neuronas maduras e inmaduras formados por sus CMNs (1). La neurogénesis adulta ocurre principalmente en dos áreas específicas del SNC, siendo estas, la zona subgranular (ZSG) del giro dentado (GD) del hipocampo, en donde se generan nuevas células granulares, y la zona subventricular- zona ventricular de los ventrículos laterales (ZSV-ZV) donde las nuevas neuronas que se forman migran a través de la CMR hacia el BO donde se convertirán en interneuronas (1). A pesar de que la fuente principal de nuevas neuronas del BO es la ZSV, se ha demostrado que también existen CMN locales en el BO de ratones y humanos. Aunque se ha avanzado en su estudio, las características específicas y el potencial neurogénico de estas células no se han definido completamente (2,6).

Entre las claras diferencias que existen entre ambos nichos neurogénicos destaca principalmente la localización en donde se lleva a cabo el proceso completo. Cuando se habla del hipocampo, todo el proceso de neurogénesis ocurre en la ZSG del GD. Esta zona se encuentra cargada de terminales nerviosos que llevan a cabo distintos circuitos dinámicos de regulación por distintos neurotransmisores (**Fig.1**).

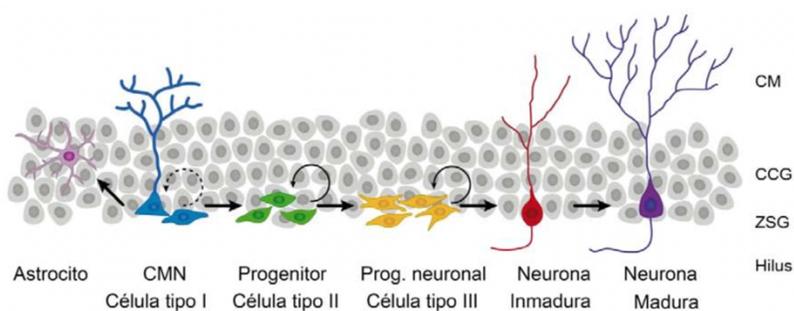


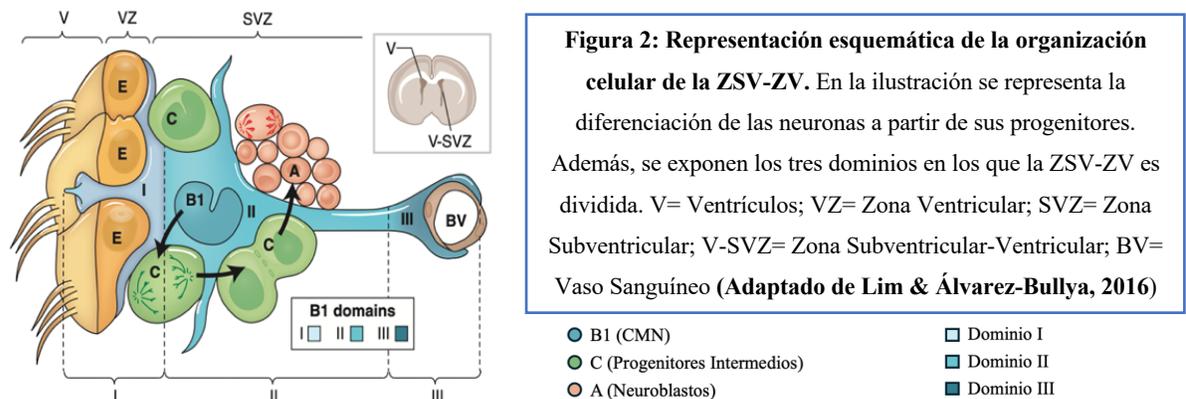
Figura 1: Representación esquemática de la neurogénesis adulta del GD en el HP. En la ilustración se representa la formación de neuronas, pasando por sus distintas etapas de maduración a partir de las CMN. CM= capa molecular; CCG= capa de células grano; ZSG= zona subgranular. (Adaptado de Nieto-Estévez, 2016)

Por otra parte, la ZSV se encuentra anatómicamente segregada del BO, donde ocurre la integración de estas nuevas neuronas, aunque se comunican a través de la CMR. Los progenitores neuronales también parecen estar dispuestos de maneras específicas y altamente organizadas según la región donde se encuentren. Esta heterogeneidad podría explicarse por el alto dinamismo bioquímico del nicho (1,7).

Neurogénesis en la Zona Subventricular- Bulbo Olfatorio

Como mencionado anteriormente, uno de los nichos neurogénicos más importantes se encuentra en la ZSV-ZV, localizado exactamente a lo largo de las paredes de los ventrículos laterales. Estudios sobre la distribución de células tipo B1 indican que esta región tiene algunas características parecidas a la ZV y a la ZSV embrionarias, por esto, actualmente se le denomina a esta zona ZSV-ZV. Es aquí donde son generados los neuroblastos, el producto de las CMN, y a partir de donde migrarán a través de la CMR hacia el BO (8).

Las células B1 mantienen contacto directo con los ventrículos cerebrales y pueden existir en estados activados o quiescentes. Un marcador importante de las CMN es la nestina, un filamento intermedio proteico. Es importante destacar que las células B1 en estado quiescente no expresan esta proteína (8,9). Una vez activadas, las células B1 originan progenitores de amplificación, llamadas células tipo C, que, a su vez, dan lugar a neuroblastos o células tipo A, las cuales migran finalmente hacia el BO (**Fig.2**). Además, las CMN son capaces de someterse a procesos de autorrenovación y producción de células tipo C. Las similitudes morfológicas y espaciales entre las células B1 y la glía radial embrionaria conservan sus características a lo largo de la vida del individuo (8).



La corriente migratoria rostral es la ruta por la cual los neuroblastos recorren una larga distancia desde la ZSV-ZV, en donde se originan, hacia la capa de células granulares (CCG) del BO para poder diferenciarse en interneuronas locales (10,11). La CMR de los roedores está dispuesta alrededor de una extensión tubular continua de los ventrículos laterales que conectan con el BO. Presenta cadenas de agregados celulares alargados, las cuales son recubiertas por células GFAP positivas. Así, las células son capaces de migrar a través de

ella, ya que, esta disposición determina la orientación de migración (11). Ver *Anexo 2.2 “Representación del origen y migración de los neuroblastos hacia el BO”*.

Bulbo Olfatorio

El sistema olfativo juega un papel muy importante en la fisiología de los mamíferos, cuya función es crucial en ámbitos de salud y comportamiento. Entre sus funciones principales destaca el reconocimiento de amenazas en el entorno, de sentimientos de placer e influencia en la sexualidad, fomentar una alimentación adecuada y el mantenimiento del estado de ánimo (12). La información olorosa es captada por neuronas receptoras olfativas, cuyos axones abandonan el epitelio olfativo y convergen para formar un gran número de haces que, sumados, componen el nervio olfatorio. Dicho nervio tiene proyecciones ipsilaterales, que finalmente desembocan en cada uno de los BO (13). Esta estructura se localiza en la superficie ventral del lóbulo frontal y se une al resto del cerebro a través del tracto olfatorio. En el aspecto histológico, el BO se organiza en distintas capas (**Fig. 3**). Se ha descubierto que dentro de las capas existen células que difieren en su morfología según su localización, por esto, las neuronas que habitan esta estructura se clasifican según la capa que las aloja (15). En orden de aparición desde la superficie hacia la profundidad están: la capa del nervio olfatorio (CNO), la capa glomerular (CGL), la capa plexiforme externa (CPE), la capa de células mitrales (CCM), la capa plexiforme interna (CPI), la capa de células granulares (CCG) y, por último, el centro o *core* del BO (CBO) donde confluye la CMR.

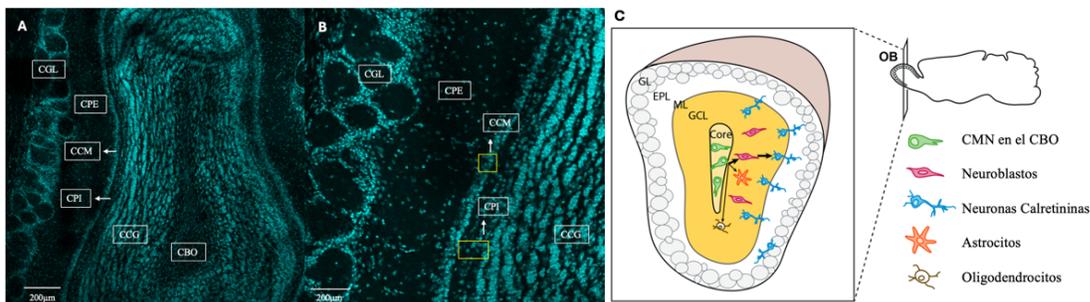


Figura 3: Capas del BO. Se muestran las distintas capas del BO. (A, B) Obtenidas a partir de inmunotinción (Hoechst) (200µm) (C) (Adaptado de Deferali, 2021(2)) Se muestra una representación de las capas del BO y la ubicación de los tipos celulares que las habitan. CGL= Capa Glomerular; CPE= Capa Plexiforme Externa; CCM= Capa de Células mitrales; CPI= Capa Plexiforme Interna; CCG= Capa de Células Granulares; CBO/Core= Centro del BO.

Como su nombre lo indica, la CGL alberga a las estructuras más características del BO, conocidas como glomérulos. Distintas en su morfología, se identifican tres poblaciones celulares que, en conjunto, pueden denominarse células yuxtglomerulares (JG). Estas células suelen ser interneuronas de dendritas cortas y densas que se extienden profusamente por el glomérulo, invadiendo regiones dentro del BO (15).

La CPE está formada por los cuerpos celulares y dendritas basales y apicales de las células JG. Además, existen distintos tipos de neuronas locales, las cuales suelen expresar proteínas de unión al calcio (PV, CalR, CalB). La gran mayoría de las neuronas expresan CalR y aproximadamente un tercio de las neuronas son PV positivas (15).

La CCM es la capa delgada que contiene principalmente los cuerpos celulares de las células mitrales y axones de las células de la CPE y de la CGL. La CPI es una capa delgada que actúa de manera similar a la CPE, contiene células y prolongaciones de estructuras que la atraviesan. Más internamente, se encuentra la CCG, la cual contiene los cuerpos celulares de las células granulares (CGBO). Las CGBO son las interneuronas predominantes y más importantes en el BO, sin embargo, se caracterizan por no presentar axones en su estructura. Finalmente, el CBO es la porción más interna del BO. Como se ha mencionado, los neuroblastos que proceden de la ZSV-ZV atraviesan la CMR, conectándola directamente con el CBO. Además, se ha comprobado que en el CBO existen células que presentan características de autorrenovación y multipotencialidad (16). Estudios de nuestro grupo de investigación demuestran que el CBO genera IN-CalR capaces de establecer sinapsis e integrarse en los circuitos neuronales preexistentes, confirmando la existencia de neurogénesis adulta local in vivo (2). Finalmente, se demostró que también existe una pequeña porción de CMN locales que residen en la CMR (17).

Neurogénesis en el Hipocampo

El hipocampo constituye otra de las áreas específicas más importantes donde ocurre neurogénesis en el cerebro adulto. En concreto, la neurogénesis tiene lugar en la ZSG del GD del HP (4). La neurogénesis adulta hipocampal comienza con CMN quiescentes (CMNq) localizadas en la ZSG del GD (**Fig.4**). Estas células tienen una actividad metabólica reducida y son extremadamente sensibles a cambios en el microambiente local y a estímulos fisiológicos y patológicos. Cuando son activadas, las CMN son capaces de autorrenovarse y

generar progenitores intermedios. Después, estos progenitores se diferencian en neuronas inmaduras y finalmente, a neuronas maduras funcionales que se integran al circuito del hipocampo (1,4).

Los precursores primarios de la ZSG son los astrocitos radiales que, cuentan con un proceso predominante que atraviesa la ZSG y zona de células granulares (ZCG). Este nicho se encuentra cerca de vasos sanguíneos los cuáles influyen en el comportamiento de las CMN (3). Las nuevas neuronas que son integradas a estos circuitos en el GD están ampliamente implicadas en el aprendizaje y memoria del cerebro adulto del roedor. Con similitud a la neurogénesis adulta en la ZSV-ZV, esta puede desencadenarse aberrantemente en condiciones patológicas como la depresión, neuro inflamación y epilepsia (3).

El hipocampo se localiza en la profundidad del cerebro, incrustado dentro del lóbulo temporal de la corteza cerebral de los humanos y otros mamíferos. Esta estructura pertenece al sistema límbico y juega un papel clave en la consolidación de la información de la memoria a corto plazo, en el proceso de aprendizaje y en las emociones (18). Además, el HP es clave en la formación de procesos cognitivos y el almacenamiento de la información espacial. Esto da al individuo la capacidad de orientación y coordinación (19). La formación hipocampal está compuesta por tres estructuras: el subículo, el Asta de Amón (AA) y el GD. El GD y el AA están compuestos por tres capas. La primera, la capa molecular (CM), que contiene axones aferentes y dendritas de células grano y rodea a la capa granular del GD y la capa piramidal en el AA, que contienen neuronas eferentes. Finalmente, la capa multiforme es la más interna, contiene axones de las células piramidales en el hilo de la AA. En la interfaz entre el hilo y la capa granular, se encuentra la ZSG.

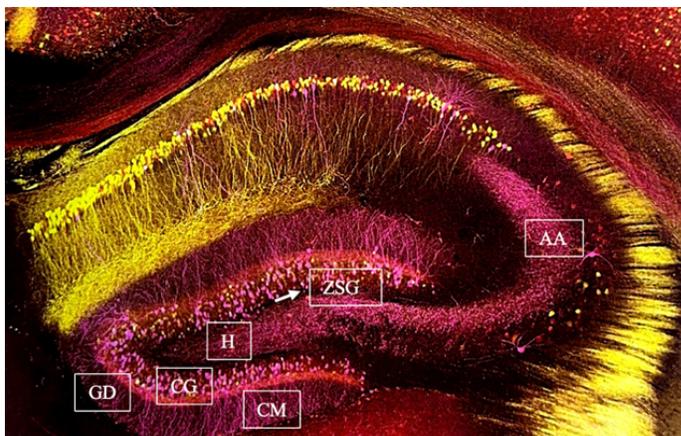


Figura 4: Tinción de la formación del hipocampo. Se representa la disposición anatómica de la formación del hipocampo a través de fluorescencia. AA=Asta de Amón; ZSG=Zona Subgranular; H= Hilo; GD= Giro Dentado; CGHP= Capa Granular; CM= Capa Molecular (Adaptado de Weissman y Lichtman, 2006).

Regulación de la neurogénesis

La neurogénesis es ampliamente regulada por su entorno. El microambiente de los nichos neurogénicos compromete directamente la capacidad de autorrenovación y diferenciación que poseen las CMN, la correcta migración de los neuroblastos y su integración en circuitos funcionales. Este mecanismo de maduración neuronal es, en parte, el mismo para el cerebro adulto que para el cerebro en desarrollo. Por tanto, la regulación de la transcripción génica y dinámica molecular coincide parcialmente, aunque a una escala temporal más lenta en el cerebro adulto (20).

La regulación de la migración y posicionamiento neuronal es controlada de manera muy precisa por dos rutas bioquímicas principales, la vía mediada por reelina y la vía de CDK5. La unión a sus respectivos receptores desencadena una serie de señales que produce la activación de la ruta de señalización PI3K/Akt que finalmente regula el posicionamiento neuronal. Se han propuesto algunos roles que pueden desempeñar PI3K y P-Dab1 en la ZSV-ZV y en la CMR independientes de reelina, sugiriendo la posibilidad de involucramiento de otros posibles ligandos o efectores en la migración de los neuroblastos (21). En este trabajo nos enfocamos principalmente en factores de crecimiento, los cuales se caracterizan por activar a las CMNq para su subsecuente diferenciación. Especialmente, se detalla el factor de crecimiento similar a la insulina (Igf-I) (22).

Igf-I

El Igf-I es un factor de crecimiento que se encuentra abundantemente en el cerebro embrionario, sin embargo, su expresión disminuye después del nacimiento, lo que puede sugerir que su actividad podría estar relacionada con la formación de esta estructura, sin descartar una función en el cerebro adulto (21).

Este factor pertenece a la familia de la insulina, la cual se divide en dos grupos peptídicos. El primer grupo se caracteriza por presentar una afinidad muy específica a sus receptores, aunque también pueden ser capaces de unirse a los receptores del segundo grupo, pero con menor afinidad. El Igf-IR es un receptor tipo tirosina quinasa, el cual está compuesto por tetrámeros: dos subunidades α y dos subunidades β (22).

Expresión de Igf-I

La expresión de Igf-I es muy abundante en el desarrollo embrionario, no solo en el tejido cerebral, también en múltiples órganos y tejidos. Su expresión desciende considerablemente después del nacimiento. En el organismo adulto, este factor es sintetizado predominantemente en el tejido hepático, este proceso es regulado por la hormona del crecimiento (GH). No obstante, existe producción local de Igf-I en el cerebro adulto, principalmente en las áreas de la ZSV, el BO, el HP y el cerebelo, en donde su producción es independiente de la acción de la GH. El Igf-I producido fuera del cerebro viaja a través de la circulación sistémica, accediendo al LCR por los receptores de lipoproteínas LRP2. Del mismo modo, el Igf-I es capaz de atravesar la BHE al unirse a Igf-IR presentes en células endoteliales. Posteriormente, los astrocitos pueden recoger este factor y transferirlo directamente a las neuronas. Es, por tanto, que el Igf-I puede actuar en el cerebro a través de una señalización autocrina, paracrina o endocrina (22).

La unión específica de Igf-I con su Igf-IR desencadena la autofosforilación de este y la subsecuente activación de los sustratos del receptor de insulina (IRS). Del mismo modo, los IRS activados son auto fosforilados y así, producen la activación de diversas cascadas de señalización intracelular, destacando, la ruta de PI3K y de las MAPK (22). Ver **Anexo 2.3 “Vías de señalización activadas tras la unión de Igf-I a su receptor”**.

Al ser un factor pleiotrópico, el Igf-I está involucrado en numerosos procesos en toda la extensión del organismo. Por tanto, sus efectos son dependientes directamente de su concentración, el tipo celular que está estimulando y la etapa del desarrollo del individuo (22). En primera instancia, Igf-I es necesario para la correcta implantación del embrión en el útero. Posteriormente, es un factor indispensable en el crecimiento de este y su supervivencia después del nacimiento. Como se explica en el artículo (22), se han comparado varios parámetros, entre ellos el tamaño, de ratones *Igf-I Knockout (KO)* e *Igf-IR KO* con controles en la etapa postnatal. Además, se han analizado camadas de ratones deficientes selectivamente de Igf-I hepático (*ratones LID*), lo que resulta en un tamaño similar a los animales controles. Esto comprueba la acción paracrina que posee Igf-I. A pesar de esto, la gran mayoría de ratones con *Igf-I KO global* mueren a los pocos días de su nacimiento, generalmente, a causa de falta de maduración pulmonar. Asimismo, hipoplasia muscular, un

tamaño de cerebro reducido, osificación y engrosamiento de la piel son otros efectos reflejados en estos ratones por la deficiencia de Igf-I. En los ratones sobrevivientes se han observado estos efectos sumados a la reducción del tamaño corporal, infertilidad y sordera (21,22).

Papel de IGF-1 en la neurogénesis

Durante el desarrollo del SNC y en la neurogénesis adulta, el Igf-I/Igf-IR regula principalmente la proliferación y supervivencia de los progenitores neurales, al igual que regula la producción, diferenciación y maduración de las neuronas (22).

Al interactuar con su receptor, Igf-I promueve la proliferación de células neurales, activando las vías de PI3K/AKT y MAPK. Esta proliferación de los progenitores neuroepiteliales se observa tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (23,24).

Se han observado efectos de Igf-I sobre los progenitores neurales y distintos subtipos neuronales como células corticales, motoneuronas, células de Purkinje y neuronas ópticas, aumentando su supervivencia al inhibir la apoptosis (22,25,26).

El Igf-I también es responsable de la regulación de la migración de algunos tipos celulares, como los son las líneas celulares de neuroblastoma y los neuroblastos. En el trabajo realizado por el laboratorio del Dr. Carlos Vicario (21) se describió por primera vez el papel de Igf-I en la regulación del posicionamiento neuronal *in vivo*, utilizando ratones con genotipo *Igf-I KO*. Se demostró que este factor de crecimiento es fundamental para la migración tangencial de los neuroblastos y neuronas radiales desde la ZSV-ZV hacia el BO y la migración radial de las neuronas dentro del BO. Estos hallazgos señalan que Igf-I promueve la neurogénesis adulta al regular a la población de CMN en su diferenciación y migración de los neuroblastos y el posicionamiento neuronal en las capas del BO (21,22).

El Igf-I/Igf-IR regula la diferenciación y maduración de las neuronas que son formadas a través de las CMN y sus progenitores neurales, a través de la ruta de señalización bioquímica de PI3K/AKT. También estimulan el desarrollo de otros tipos celulares como los astrocitos y oligodendrocitos, células productoras de mielina.

En las líneas de ratones *Igf-I KO*, se ha descrito una notable disminución en el número de neuronas en la ZSV-BO y HP. El Igf-I podría estar relacionado con el crecimiento axonal y dendrítico, y así, con el establecimiento de sinapsis en distintas áreas cerebrales (27).

Interneuronas Parvalbúmina

Las interneuronas parvalbúmina (IN-PV) o interneuronas parvalbúmina positivas son un subtipo de neuronas GABAérgicas inhibitorias que expresan PV. La PV es una proteína que se caracteriza por unirse al ion calcio (28,29). Las IN-PV representan la mayor subpoblación de neuronas inhibitorias en el neocórtex de los mamíferos, pueden dividirse en dos clases: las células en cesta y en candelabro, ambas presentan perfiles electrofisiológicos que les permiten generar potenciales de acción rápidos. Esta propiedad eléctrica se debe principalmente a una combinación de propiedades activas, concretamente, a la combinación de receptores de membrana que posee este tipo celular y a las propiedades pasivas, como la morfología de estas (29,30).

Una de las principales funciones de las IN-PV radica en la modulación de la actividad de las proyecciones de las neuronas piramidales (30). En el BO, las IN-PV se encargan de producir la inhibición dendrodendrítica en la CPE. Este tipo de inhibición se produce cuando dos neuronas interactúan entre ellas a través de sus dendritas, ocasionando la inhibición de la otra. Estudios como los realizados por Kato, H., sugieren que las IN-PV en el BO pueden estar relacionadas no solo con la respuesta cerebral a olores, si no que pueden estar involucradas en el control de la frecuencia respiratoria (31). Se pueden agrupar todas las IN-PV en la categoría de neuronas de descarga rápida, ya que generan potenciales de acción de alta frecuencia, lo cual proporciona una inhibición más rápida y precisa (20). En el HP, las IN-PV son importantes para la generación del ritmo intrínseco, actividad cerebral producida sin necesidad de recibir señales externas, y para coordinar a las neuronas piramidales (32).

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis: Basándonos en los hallazgos de otros artículos, proponemos que el Igf-I cerebral podría regular a la población de IN-PV en el BO y en el HP.

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es evaluar el impacto de la deficiencia de *Igf-I* cerebral sobre las IN-PV en regiones cerebrales específicas como el BO y el HP.

Objetivos secundarios:

- Analizar el número de IN-PV en el BO de ratones con genotipo *KO* condicional para *Igf-I* (*Igf-I*^{Δ/Δ}) y controles (*Igf-I*^{+/+ cre}).

- Estudiar la diversidad morfológica, orientación y localización en capas de las IN-PV en el BO y en el HP de ratones *Igf-I*^{Δ/Δ} y controles (*Igf-I*^{+/+ cre}).

Metodología del Trabajo

Líneas de Ratón

Para la ejecución de esta investigación se ha utilizado una línea de ratón que posee un genotipo de *knockout* (KO) condicional para *Igf-I*, estos denominados delta-delta (Δ/Δ). Al ser KO condicional, esta línea carece de *Igf-I* únicamente en células nerviosas (27). El propósito principal de esto, en vez de utilizar una línea de *Igf-I* KO global, fue prevenir la muerte de los ratones por falta de maduración pulmonar y delimitar el estudio de este factor en el SNC. La obtención de esta línea se basó en el apareamiento de ratones *nestina/cre* con ratones *Igf-I/LoxP*.

Ratón Nestina- Cre

Para la correcta creación del genotipo Δ/Δ , se necesita una línea que exprese la enzima Cre recombinasa exclusivamente en células nerviosas, por lo tanto, se utilizaron los ratones *nestina-Cre*. Esta línea murina se crea al modificar genéticamente a individuos *wild-type* e insertar el gen de la enzima Cre recombinasa bajo el control del promotor. La expresión de esta enzima se rige por el *enhancer* específico, el cual, se localiza en el intrón dos del gen de la *nestina*, dirigiendo la expresión de esta hacia el SNC (27). La expresión de la *nestina* no es exclusiva del SNC, sino que también se expresa en precursores de células musculares. Para poder evitar este problema y crear un ratón específico, se utilizó un vector que portaba un fragmento del promotor basal de la *nestina* y, además, un pequeño fragmento muy conservado del segundo intrón de esta que proporciona específicamente su expresión en progenitores nerviosos. Así, fue posible eliminar la expresión ectópica de la *nestina* y dirigir la expresión de la enzima cre recombinasa (Cre) al SNC.

Ratón Igf-I LoxP

La línea murina *Igf-I LoxP* se caracteriza por contener dos secuencias *LoxP*, una flanqueando cada extremo del exón 4 del gen de *Igf-I*. Las secuencias *LoxP* son reconocidas por la enzima cre recombinasa, derivada del bacteriófago P1, para cortar el ADN en estos sitios específicos y su posterior unión. De este modo ocurre la eliminación específica del exón 4 de *Igf-I* en las células que co-expresen la enzima cre y producir finalmente, una proteína no funcional (27).

Ratón Nestina-Cre/Igf-I LoxP (Δ/Δ)

Se cruzaron machos y hembras Nestin ($cre^{+/+}$) con *Igf-I Lox P* ($Igf-I^{fl/fl}$) de manera que algunas de sus crías carecieran de las dos copias de *Igf-I* en células nerviosas. Para comprobar el genotipo resultante, se utilizó la técnica de genotipado por PCR.

Genotipado

Extracción de ADN

Los genotipados se realizaron a partir de la extracción de ADN proveniente de un pequeño fragmento de la cola de los individuos, el procesamiento fue realizado de manera paralela en los animales de la misma camada. El primer paso de la extracción del ADN consistió en la digestión enzimática de dichos fragmentos con proteinasa K (Roche, 3115879) y tampón de lisis “*Salting Out*” incubados a 55°C durante toda la noche en agitación suave (300 rpm) (Ver **Anexo 3.1 Materiales y reactivos necesarios para formular el tampón de lisis “*Salting Out*”**).

Al día siguiente, se agregó NaCl (5M; Merck, 1.06404.1000) para precipitar las proteínas. Después las muestras fueron centrifugadas, se añadió etanol 96% y se volvió a centrifugar. Se retiró el sobrenadante, se añadió etanol 70% y se centrifugó una vez más. A continuación, se agregaron H₂O milliQ para re suspender el ADN, que se dejó incubar en agitación suave. Se almacenan las muestras a 4°C o bien, en congelador, hasta su uso.

PCR

Una vez obtenidas las muestras de ADN, se amplificaron por PCR. Se realizaron 3 protocolos de PCR distintas por cada muestra para poder amplificar y posteriormente, observar mediante un gel de electroforesis, las bandas correspondientes a los tamaños del ADN *wild-type*, ADN *Igf-I* mutante y presencia de Cre recombinasa.

En primer lugar, se realizaron 3 “*PCR Master Mix*”, cada una con un par de cebadores distinto según el volumen necesario, teniendo en cuenta: el número de muestras, control positivo, control negativo y un pequeño volumen extra por si existe algún error de pipeteo (Ver *Anexo 3.2 “Componentes utilizados en la PCR Master Mix”*). Se colocaron las muestras en el termociclador (Techne, TC-312) y se eligió el programa correspondiente (Ver “*Anexo 3.3: Cebadores utilizados en las PCR y controles positivos*”). Al finalizar, se congelaron las muestras hasta su uso.

Electroforesis

Con el propósito de determinar la presencia de las bandas de ADN se corrió un gel de electroforesis. El gel estaba compuesto por agarosa al 1.2% (1.2 g Agarosa (Condalab, 8010.00) en 100mL de H₂O milliQ). Se mezcló cada muestra con 6x *Loading Dye* (Ver “*Anexo 3.4: Componentes del Tampón de Carga (Loading Dye) 6X.*”). Posteriormente, se cargaron en los pocillos del gel además de la escalera de tamaños moleculares (1Kb+, Invitrogen 10787-018) para poder identificar correctamente el fragmento de interés. Después, revelamos el gel utilizando un dispositivo transiluminador (Analytikjena; LM-26 Transilluminator) (Ver “**Anexo 3.5: Imagen de un gel de electroforesis realizada para determinar el genotipo de las camadas de ratones.**”). Finalmente, con los resultados de las bandas se realizó un análisis genotípico de las camadas (Ver “**Anexo 3.6: Tabla con los resultados del genotipado de camadas de ratón**”).

Caracterización morfológica y Contaje Celular

Para cumplir con los objetivos del trabajo, compañeros del laboratorio del Dr. Carlos Vicario perfundieron a 5 ratones con genotipo Δ/Δ y a 5 ratones con genotipo $cre^{+/+}$, los segundos actuarían como controles. Más tarde, se retiraron los cerebros de los individuos y se almacenaron en tubos tipo Falcon con azida en PBS (Sigma, S8032-25GR). Los cerebros se cortaron empleado un vibratomo (Leica VT1000S) para poder realizar su subsecuente inmunohistoquímica y así, fotografiar los cortes vía microscopía confocal directa y después, analizar los campos con los programas Fiji Image J (MPI-CBG) e IMARIS (Oxford Instruments).

Corte en Vibratomo

En primer lugar, se preparó una disolución de agarosa al 3%. Se atemperó y se vertió sobre los cerebros formando bloques individuales. Posteriormente se colocó el bloque de agarosa en el vibratomo y se cortaron numerosas secciones seriadas de tejido de $40\mu\text{m}$ de grosor que se almacenaron en una placa multi pocillos con PBS azida hasta su uso.

Inmunohistoquímica

Se utilizó la técnica de la inmunohistoquímica para teñir las secciones de los individuos a estudiar. Se prepararon dos secciones por individuo, 5 con genotipo Δ/Δ y 5 con genotipo $Cre^{+/+}$ como controles.

Se retiraron los cortes de la solución de PBS azida y se colocaron en una nueva. Cada pocillo contenía las secciones del mismo animal. Después, se añadió solución de bloqueo (Tritón X 0.4%, Suero 10% (NDS Donkey, Sigma-Aldrich, 566460), PBS). Posteriormente, se retiró la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario. Se utilizó el anticuerpo PV 235 *monoclonal anti parvalbumin* (SWANT, PV235) el cual es una IgG1 murina producida por la hibridación de células de mieloma con células de ratones inmunizados con parvalbúmina de ratón. Este anticuerpo se diluyó en solución de bloqueo (dilución 1:750). Se incubó toda la noche a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, se retiró la solución de anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados. Se procedió a añadir un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo. El anticuerpo utilizado fue el AlexaFluor® 488 *donkey-anti-mouse IgG* (Thermo-Fisher, R37114) diluido en solución de

bloqueo (dilución 1:1000). A partir de este paso, el resto del proceso se realizó en oscuridad para evitar excitar el fluorocromo del anticuerpo. Se incubó por 4 horas a temperatura ambiente y con agitación suave. En seguida, se retiró la solución del anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados. El segundo lavado consistió en Hoechst (Sigma, 861405) diluido en PBS (dilución 1: 750) como contra tinción. Finalmente, se procedió a montar las secciones en portaobjetos utilizando el medio de montaje Mowiol® (Merck, 475904). Se montaron dos secciones de dos animales en cada portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos de vidrio y se organizaron en carpetas.

Microscopía Confocal y Análisis de Imagen

Para observar y fotografiar las secciones de la inmunohistoquímica, se hizo uso de un microscopio confocal directo (Leica, SP5). Se realizaron tomas de por lo menos 5 campos de la CPE y 5 campos de la CGL de cada una de las dos secciones de cada animal. Las fotografías se realizaron a 63X y con 1.5 de Z-step size (espacio entre cada uno de los planos). Las imágenes del GD fueron proporcionadas por compañeros del laboratorio para su análisis.

FIJI IMAGE J

Una vez obtenidos los campos, se utilizó el programa Fiji Image J para realizar el conteo de IN-PV. Se utilizaron las herramientas de “*Brightness/Contrast*” y “*Channel Tools*” para ajustar los parámetros visuales y de fluorescencia en la imagen y la herramienta “*Cell Counter*” para realizar en conteo celular.

IMARIS

Para poder realizar el análisis morfológico y de disposición celular se utilizó el software IMARIS para reconstruir las neuronas seleccionadas. Se reconstruyó el soma de cada neurona para determinar el volumen y el área de este. Se utilizó la herramienta “*Filaments*” para poder reconstruir y contar las dendritas primarias, sus ramificaciones y su longitud. Después, se obtuvo la longitud total de cada neurona y se realizó un análisis de Sholl para poder saber el número de interacciones dendríticas en función de la distancia al soma.

Análisis Estadístico

Posteriormente al análisis morfológico y conteo celular, los datos se organizaron en una plantilla de Excel (Microsoft). Para poder interpretar los hallazgos, fue necesario realizar análisis estadísticos de diferentes grupos de datos utilizando el software GraphPad 8.0 (Dotmatics), así como para poder realizar representaciones gráficas de los mismos.

El estudio se basó en la comparación de dos grupos, por tanto, se utilizó la prueba estadística de *t de Student* de dos colas. Se utilizaron dos variaciones de este estudio, el test no pareado si las tendencias se mantenían entre los experimentos o el test pareado con corrección de Welch para cuando las varianzas resultaron distintas significativamente según el test F. Para poder considerar los resultados como estadísticamente significativos, se tuvo en cuenta el valor de *p* menor a 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados y Discusión

La realización de las prácticas y obtención de resultados para este TFG se basó principalmente en cumplir con el objetivo 3: “Salud y Bienestar” del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) de la Organización de las Naciones Unidas (ONU).

Análisis de densidad neuronal en el BO

En primer lugar, se realizó un análisis de la densidad de IN-PV en dos capas distintas del BO: la Capa Plexiforme Externa (CPE/EPL) y la Capa Glomerular (CGL/GL). Este análisis se basó en el conteo de los cuerpos celulares presentes en los distintos campos microscópicos obtenidos, después ese número se dividió por el volumen de la suma de las imágenes en 3D y después, se obtuvieron las medias de este resultado por animal. Primero, se agruparon todos los datos en un Excel y posteriormente, se analizaron las medias utilizando la prueba de *t student* no pareado (**Fig.5A**).

Capa Plexiforme Externa

La media de la densidad del grupo *Igf-I^{+/+cre}* fue de 7.00e-06 frente a la media del grupo *Igf-I^{Δ/Δ}* que fue de 8.72e-06 (diferencia: +1.72e-06 *Igf-I^{Δ/Δ}* frente a *Igf-I^{+/+cre}*; $p= 0.2186$; todas las pruebas de normalidad aprobadas) Esto quiere decir que, no se encontraron diferencias significativas comparando ambos grupos en cuanto a densidad neuronal en la CPE (**Fig.5B**).

Capa Glomerular

La prueba realizada para la CGL fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Estos resultados fueron interesantes, resultando estadísticamente significativos (*) ($p= 0.0159$) (*Fig5B*). Esto sugiere que la densidad de neuronas en la CGL es mayor en los animales mutantes en comparación a los animales control. Esto podría sugerir que se trata de un posible efecto de la ausencia de *Igf-I* cerebral, afectando a la capacidad de migración de las neuronas y a la localización de estas.

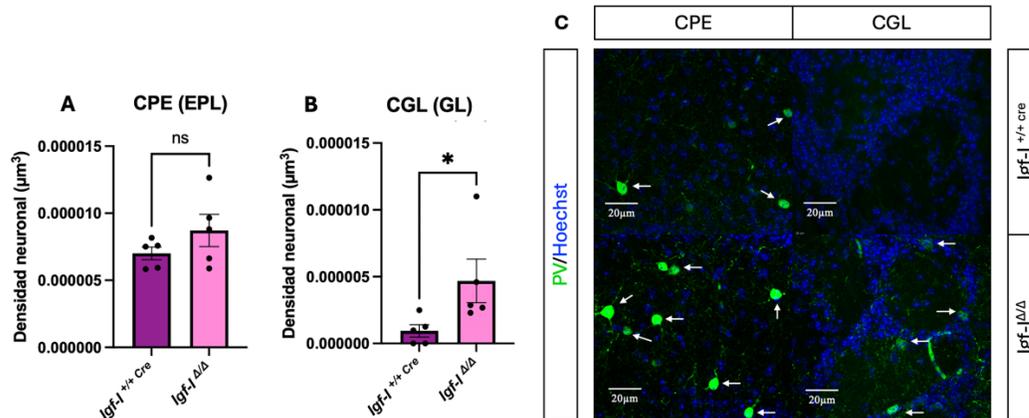


Figura 5: Análisis de densidad de IN-PV en el BO. Se analizan las medias de neuronas/volumen por animal en dos capas distintas del BO: CPE (A) y CGL (B) (n=5 animales). Resultados de la prueba t student. CPE/EPL= Capa Plexiforme Externa; CGL/GL= Capa Glomerular. (C) Inmunohistoquímica de la CPE y CGL del BO (Ac: mPV (1°), m488 (2°), Hoechst).

El artículo de Hurtado-Chong (21) demuestra que en ausencia de *Igf-I* las neuronas se colocan de manera desorganizada en la CPE y en la CCM. Esto, en concordancia parcial con los hallazgos de los experimentos realizados en este TFG (*Fig.5*), dado que, en la CPE no se encontró significancia estadística y en la CGL existe un claro aumento de la densidad de IN-PV de animales deficientes de *Igf-I* frente a los controles. En *Fig.5B* podemos prestar especial atención, teniendo en cuenta que los resultados del análisis estadístico señalan su significancia, y, por tanto, afirmando que existe un claro aumento de neuronas en la CGL *Igf-I^{Δ/Δ}* debido a la alteración migratoria causada probablemente por la falta de *Igf-I* cerebral. Es importante recordar que el genotipo *Igf-I^{Δ/Δ}* se caracteriza por presentar una condición de *KO* condicional para *Igf-I* cerebral, por esto, otro factor importante para tener en cuenta en los individuos *Igf-I^{Δ/Δ}*, es la posible compensación que podría presentar el *Igf-I* sistémico a falta de *Igf-I* cerebral. Esta puede ser una explicación para la falta de resultados significativos

en algunos de los parámetros medidos durante todo el estudio, esta limitación también estuvo presente en Nieto-Estévez, 2016 (27).

Papel del Igf-I en la orientación de las neuronas en el BO y en el HP

Se realizó un análisis morfológico y de disposición para determinar si existían diferencias entre las IN-PV del grupo control (*Igf-I^{+/+cre}*) y el grupo experimental (*Igf-I^{Δ/Δ}*). Se clasificaron las neuronas de cada grupo de ratones, y de cada área cerebral (BO y HP) en 4 orientaciones, siendo estas: Radial, Horizontal, Oblicua y No Asignable (NA).

Bulbo Olfatorio

Se analizó un total de 30 campos microscópicos pertenecientes a 5 animales para cada uno de los dos grupos: *Igf-I^{+/+cre}* e *Igf-I^{Δ/Δ}*. En primera instancia, se agruparon los datos en un Excel y se calcularon los porcentajes de cada una de las disposiciones por animal. Se obtuvieron los siguientes resultados: en el grupo control, el 20.77% de las neuronas contaban con disposición radial; el 23.37% de ellas se encontraban en orientación horizontal; 32.86% eran oblicuas y el 22.00% de ellas no pudieron ser asignadas a ninguna de estas categorías. Los hallazgos encontrados en los mutantes diferían un poco a comparación de los resultados control: el 15.92% de las neuronas eran radiales; 16.82% eran horizontales; 34.71% oblicuas y el 32.55% no asignables (Ver **Anexo 4.1: “Reconstrucción de IN-PV en el BO”**.)

A continuación, para validar estos datos, se realizó una prueba *one-way ANOVA* para las 4 categorías de *Igf-I^{+/+cre}* y otra distinta para *Igf-I^{Δ/Δ}* y su subsecuente *Test de Tukey*. También se efectuó un análisis de comparaciones múltiple para comparar los resultados de cada columna entre sí (**Fig. 6**). En el grupo control, la disposición oblicua mostró un fuerte incremento frente al resto al resultar con un valor de p muy cercano a la significancia estadística (p= 0.0509; F ANOVA= 3.219; R²= 0.3764; normalidad cumplida). A pesar de no resultar significativo, esta tendencia sugiere preferencia por la disposición oblicua en condiciones *wild-type* (WT). Por otra parte, al analizar el grupo experimental *Igf-I^{Δ/Δ}* encontramos un patrón opuesto, demostrando significativamente que las IN-PV adoptaron una posición predominantemente no asignable a ninguna de las orientaciones, en especial, que las radiales y horizontales (p= <0.0001; **/**; F=15.59; R²=0.7451; normalidad cumplida). Estos datos revelan que existe un patrón de disposición neuronal claramente desorganizado en ausencia de *Igf-I*.

Después, se analizaron por medio del estudio paramétrico *t student*, cada una de las categorías individuales, comparándose entre el grupo control y el experimental. Se observó una disminución significativa en la cantidad de neuronas horizontales en los animales mutantes ($p= 0.0216$) (**Fig. 6C**), mientras que, para el resto de las orientaciones no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (radial $p= 0.2102$; oblicua $p= 0.5079$; p valor NA= 0.2031). Por tanto, los resultados demuestran que la orientación horizontal de las IN-PV es sensible a la influencia por la ausencia de *Igf-1*. Ver **Anexo 4.2: “Comparación de la disposición de las neuronas del BO entre el grupo control ($n=5$ animales) y el grupo experimental ($n=5$ animales)”**.

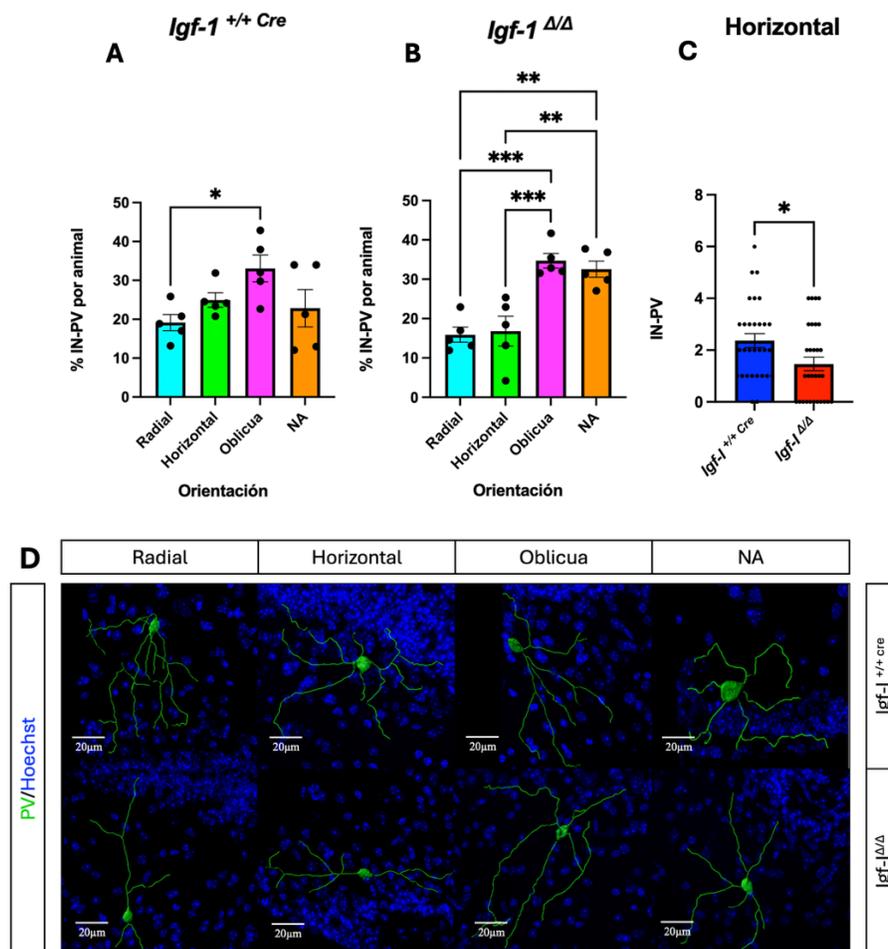


Figura 6: Comparación de la orientación de las IN-PV del BO entre el grupo control y el grupo experimental.

Representación del porcentaje de la orientación que siguen las IN-PV ($n_{AB}= 5$ animales). **(A)** Gráfico de columna que expone los resultados del grupo control ($+/+$ cre). **(B)** Gráfico de columna expone los resultados del grupo experimental (Δ/Δ). **(C)** ($n=30$ IN-PV) Gráfico de columna que expone el resultado significativo de las IN-PV horizontales del grupo mutante frente al grupo control. Gráficos realizados con el programa GraphPad tras haber hecho la prueba de one-way ANOVA (\pm SEM) con Test de Tukey. **(D)** Reconstrucción morfológica de IN-PV entre del grupo control y experimental. NA= No Asignado.

Estudios realizados por el grupo del Dr. Carlos Vicario (21), proponen que la falta de Igf-I afecta negativamente al posicionamiento de nuevas neuronas GABAérgicas provenientes de la SVZ y a su correcto establecimiento en las distintas capas del BO. En presencia de este factor, las neuronas migran hacia la capa más interna y re-posicionan el soma en una orientación horizontal antes de adaptar su posicionamiento final en orientación radial. Sin embargo, cuando este factor no está presente en el espacio, las neuronas tienden a posicionarse de una manera desorganizada, justificando así, los resultados de los individuos experimentales cuya gran mayoría de neuronas se encontraba de manera oblicua.

Hipocampo

En este caso, se analizaron 11 campos procedentes de 3 animales para el grupo control y 15 campos procedentes de 6 animales experimentales. El procedimiento de análisis se realizó de la misma manera que para los campos del BO. Se observó que en el grupo control, el 38.78% de las IN-PV eran radiales, el 30.61% eran horizontales, el 10.42% eran oblicuas y el 20.19% NA. En el grupo experimental, se observó un claro aumento de IN-PV radiales (47.59%) en comparación con el resto de las orientaciones: el 25.10% eran horizontales, el 26.38% eran oblicuas y el 14.66% NA. Los resultados del *one-way ANOVA* en el grupo control *Igf-I^{+/+cre}* señalaron que no había diferencias estadísticamente significativas. ($p= 0.1021$; $F ANOVA= 2.892$; $R^2= 0.5203$; normalidad cumplida) Ver **Anexo 4.3: “Reconstrucción de IN-PV en el HP”**. Se exhibe un ejemplo de cada una de las orientaciones posibles: Radial, Horizontal, Oblicua, No Asignable (NA) analizadas, tanto para el grupo control, como para el experimental (**Fig7D**).

Por tanto, se puede observar una mayor tendencia hacia la orientación radial pero la variabilidad y el reducido tamaño de las muestras disminuyen la potencia de la prueba. En cuanto al grupo experimental *Igf-I^{ΔΔ}*, al igual que en el BO, sí se encontraron diferencias significativas entre las distintas orientaciones ($p= 0.0010$ (*); $F ANOVA= 8.063$; $R^2= 0.5474$; normalidad cumplida). El análisis post hoc demostró diferencias significativas entre la orientación radial y el resto, esto indica que las IN-PV se reorganizan de manera radial en ausencia de *Igf-I*.

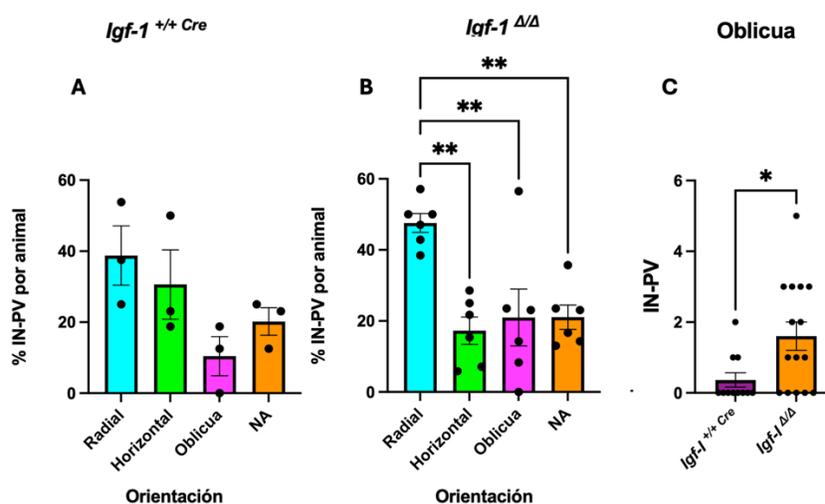
En el HP se observó una mayor tendencia hacia la disposición radial en comparación con el grupo experimental del BO (**Fig. 7**). Esto podría sugerir que en la ausencia de *Igf-I*, las

neuronas hipocampales tienden a reorganizarse en orientación radial, además podría verse afectado el patrón de migración y así, el posicionamiento final de ellas.

También se realizó una prueba de t student para analizar cada una de las categorías individuales del grupo control contra el grupo experimental, y en este caso, sí se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en la orientación oblicua, incrementado en ausencia de *Igf-I* (**Fig.7C**) ($p= 0.0154$). El resto de las categorías no mostraron diferencias significativas (radial $p= 0.0708$; horizontal $p= 0.5276$; NA $p= 0.2087$). (Ver **Anexo 4.4: “Comparación de la disposición de las neuronas del HP entre el grupo control (n=11) y el grupo experimental (n=15)”**)

Nieto-Estévez, V., relata en su artículo (27) cómo la ausencia de *Igf-I* puede ser la causa de la desorganización del posicionamiento neuronal en el GD. Además, propone como en ausencia de este factor, las dendritas suelen presentar un tamaño reducido (Véase más adelante). Aquí, se relata como los progenitores neurales se ven afectados en su morfología y posicionamiento desorganizado. En nuestro estudio, podemos observar como la distribución de la organización, en esencia, sigue un patrón muy parecido entre los animales *Igf-I* ^{Δ/Δ} y los *Igf-I* ^{$+/+cre$} , señalando una fuerte tendencia hacia la disposición radial. De hecho, se puede observar que parte de estas asumen disposiciones desorganizadas.

En ambas áreas cerebrales, podemos observar, en menor o mayor medida, diferencias en disposición entre las muestras *Igf-I* ^{Δ/Δ} y las *Igf-I* ^{$+/+cre$} , sugiriendo así, la clara importancia que presenta el factor *Igf-I* en la correcta migración y posicionamiento final de las neuronas generadas postnatalmente (21,27).



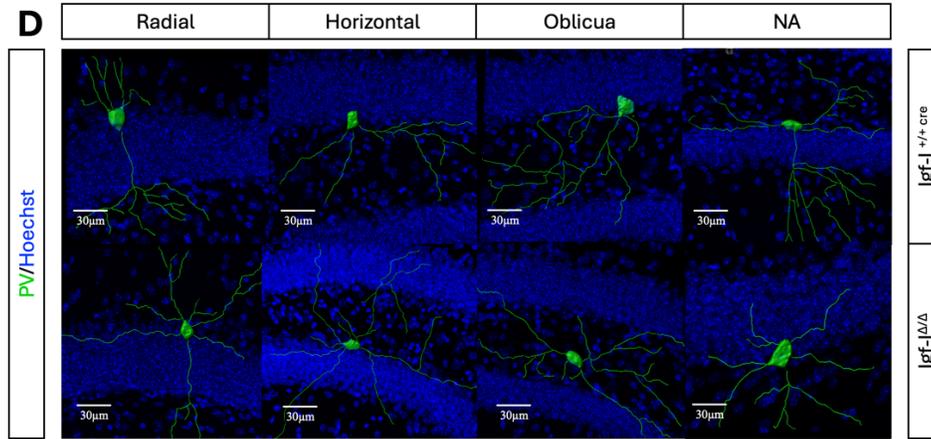


Figura 7: Comparación de la orientación de las IN-PV del HP entre el grupo control y el grupo experimental. Representación del porcentaje de la orientación que siguen las IN-PV (n=5 animales). **(A)** Gráfico de columna que expone los resultados del grupo control (+/+ cre). **(B)** Gráfico de columna expone los resultados del grupo experimental (Δ/Δ). **(C)** (n=15-11 IN-PV) Gráfico de columna que expone el resultado significativo de las IN-PV oblicuas del grupo mutante frente al grupo control. Gráficos realizados con el programa GraphPad tras haber hecho la prueba de one-way ANOVA (\pm SEM) con Test de Tukey. **(D)** Reconstrucción morfológica de IN-PV entre del grupo control y experimental. NA= No Asignado.

Papel del Igf-I en la morfología de las IN-PV en el BO y en el HP

Como sabemos, el *Igf-I* es un factor que regula la diferenciación y supervivencia de las IN-PV, por esto, se optó por analizar distintos parámetros de la morfología de las neuronas del grupo experimental (*Igf-I* Δ/Δ) frente a neuronas del grupo control (*Igf-I* $^{+/+cre}$) con el fin de reconocer si existen diferencias significativas en parámetros como volumen y área del soma, número de dendritas totales por neurona y su longitud. Para poder analizar estos datos, se agruparon los datos en un Excel. Se realizó la prueba de *t student* para comparar cada uno de los parámetros del grupo control con los del grupo experimental.

IN-PV del Bulbo Olfatorio

Primero, se analizó el cuerpo celular de las neuronas, en concreto, su área y volumen. En ninguno de los dos casos se encontraron diferencias significativas del grupo experimental frente al grupo control. La media del volumen del soma neuronal de los individuos *Igf-I* $^{+/+cre}$ resultó ser de $466.4 \mu\text{m}^3$, mientras que la media del grupo *Igf-I* Δ/Δ fue de $432.3 \mu\text{m}^3$ ($p = 0.2003$). En cuanto al área, la media del grupo control fue de $359.0 \mu\text{m}^2$, mientras que la media del grupo mutante era de $368.4 \mu\text{m}^2$ ($p = 0.5776$). Indicando que no existen cambios relevantes en la morfología del cuerpo celular entre un genotipo y otro.

Después, se analizó el número total de dendritas por neurona y su longitud total, en cuanto al número total de dendritas (dendritas primarias + ramificaciones) se detectó una diferencia significativa en la varianza entre ambos grupos (p valor= 0.0457) por lo que se aplicó la corrección de Welch. Se pudo observar una ligera tendencia a una menor cantidad de dendritas en el grupo experimental, sin embargo, no resultó tener significancia estadística (p valor Welch= 0.5997).

En cambio, la longitud total de dendritas del grupo control fue de 669.8 μm como valor medio y el de los mutantes fue de 643.3 μm (p = 0.6803) señalando que tampoco hay una diferencia significativa de la longitud dendrítica de un grupo frente al otro. (Ver **Anexo 4.5: “Comparación de distintos parámetros morfológicos de las neuronas del BO entre el grupo control ($n=30$ IN-PV) y el grupo experimental ($n=30$ IN-PV)”**).

Además, se realizó un análisis de Sholl comparando la complejidad dendrítica entre el grupo experimental y el grupo control, en conjunto con un ANOVA de dos vías. Esta prueba concluyó que la distancia radial desde el soma explicó un 44.02% de la variación total ($p < 0.0001$) lo que determina que las intersecciones varían con la distancia. Por el contrario, el genotipo no resultó estadísticamente significativo (p = 0.1360), por tanto, no existe diferencia en la complejidad dendrítica global entre ambos grupos y se concluye que el genotipo no afecta significativamente la complejidad dendrítica en el BO. (Ver **Anexo 4.6: “Análisis de Sholl para las IN-PV del BO”**.)

IN-PV del Hipocampo

En semejanza a los resultados del BO, las IN-PV hipocampales tampoco mostraron diferencias significativas en los parámetros analizados del cuerpo celular: Volumen del soma (p = 0.3452), Área del soma (p =0.5962). Por el contrario, el análisis de la longitud de las dendritas sí mostró diferencia estadísticamente significativa (p =0.0329), presentando una longitud mayor en los individuos mutantes frente a los controles. Esto sugiere un posible efecto en el crecimiento dendrítico de las IN-PV en ausencia de Igf-I. Finalmente, en el número total de dendritas por neurona, se utilizó la prueba paramétrica de Mann-Whitney debido al incumplimiento de la normalidad. Se encontró una ligera tendencia a un mayor número de dendritas en el grupo experimental, sin embargo, no se alcanzó a la significancia estadística (p = 0.1811). (Ver **Anexo 4.7: “Comparación de distintos parámetros**

morfológicos de las neuronas del HP entre el grupo control (n=11 IN-PV) y el grupo experimental (n=15 IN-PV)”.

Estudios previos demuestran resultados no concluyentes con los resultados presentados en este trabajo, especialmente sobre los individuos experimentales. En el artículo de Nieto-Estévez, V., (27) se estudió el efecto de neuronas granulares, glutamatérgicas, en el HP y relata como las neuronas de los animales experimentales presentan un tamaño y longitud de dendritas menor que los animales control. La diferencia entre las evidencias de los distintos trabajos que ha realizado nuestro grupo, incluyendo este, podrían sugerir que el efecto de la ausencia de Igf-I podría tener un efecto distinto entre diferentes poblaciones neuronales. Para futuras investigaciones se recomienda ampliar el tamaño muestral, tanto de imágenes obtenidas, como de individuos a analizar.

El análisis de Sholl (**Fig. 8**) concluyó que existe una clara diferencia entre los mutantes y los controles ($p < 0.0001$), explicando un 29.35% de variación en la distancia radial y un 10.68% de variación en el genotipo. En el HP, la arborización dendrítica varía en función de la distancia como en el genotipo del individuo. Los mutantes muestran una mayor complejidad dendrítica en cuanto a intersecciones a lo largo de distancias que las del grupo control.

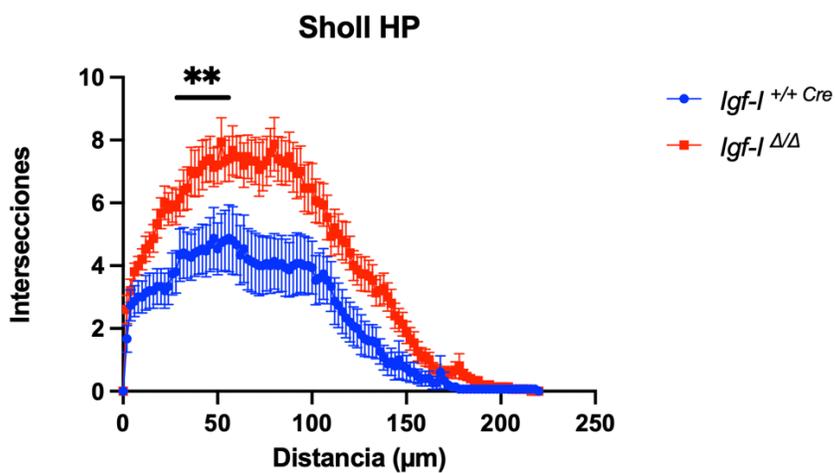


Figura 8: Anexo 4.8: Análisis de Sholl para las IN-PV del HP. Se analizan las intersecciones a lo largo de las distancias tomando en cuenta dos factores: la distancia radial (factor fila) y el genotipo (factor columna). Realizado con GraphPad.

Conclusiones

A lo largo de este trabajo se ha demostrado el papel fundamental que desempeña el factor de crecimiento Igf-I en la regulación de la neurogénesis adulta, sobre todo en la migración y posicionamiento neuronal, así como las características morfológicas de las IN-PV en el BO y el HP. Los resultados obtenidos, a pesar de que no en todos los casos se alcanzó una significancia estadística, muestran tendencias consistentes que señalan un impacto funcional importante de Igf-I en estas regiones.

En condiciones deficientes de este factor (*Igf-I*^{Δ/Δ}) las neuronas presentan un comportamiento desorganizado que, en esencia, impiden su migración adecuada y fomentan su posicionamiento incorrecto, tanto en localización espacial como en su orientación, posiblemente afectando la integración de estas neuronas a los circuitos preexistentes en el BO. En el HP, se detectó una tendencia especial a la orientación radial, lo que podría sugerir que el efecto de Igf-I podría ser región-específica. Asimismo, los análisis morfológicos no revelaron diferencias significativas en parámetros del cuerpo celular de las IN-PV como volumen y área del cuerpo celular en el BO. La longitud de las dendritas demostró un aumento en el grupo experimental del HP. Esto podría demostrar ligeros cambios en la maduración estructural de las neuronas influidos por la ausencia de Igf-I. La limitación estadística podría atribuirse al limitado tamaño muestral, por ello, se recomiendan futuras investigaciones ampliando el número de muestras.

Bibliografía

1. Ming G li, Song H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* [Internet]. 2011 May 26 [cited 2025 May 15];70(4):687–702. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21609825/>
2. Defterali Ç, Moreno-Estellés M, Crespo C, Díaz-Guerra E, Díaz-Moreno M, Vergaño-Vera E, et al. Neural Stem Cells in the Adult Olfactory Bulb Core Generate Mature Neurons in Vivo. *Stem Cells* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2025 May 15];39(9):1253–69. Available from: <https://dx.doi.org/10.1002/stem.3393>
3. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 2009 Jun [cited 2025 May 15];32:149. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3086722/>
4. Kim TA, Syty MD, Wu K, Ge S. Adult hippocampal neurogenesis and its impairment in Alzheimer’s disease. *Zool Res* [Internet]. 2022 [cited 2025 May 15];43(3):481–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35503338/>
5. Office FP. Erratum on: Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 Apr 23 [cited 2025 May 15];9(APR):160. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4407576/>
6. Fernández Acosta FJ, Luque-Molina I, Vecino R, Díaz-Guerra E, Defterali Ç, Pignatelli J, et al. Morphological Diversity of Calretinin Interneurons Generated From Adult Mouse Olfactory Bulb Core Neural Stem Cells. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2022 Jun 29 [cited 2025 May 18];10:932297. Available from: www.frontiersin.org
7. Dionne O, Sabatié S, Laurent B. Deciphering the physiopathology of neurodevelopmental disorders using brain organoids. *Brain* [Internet]. 2025 Jan 7 [cited 2025 May 16];148(1):12–26. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/brain/awae281>
8. Lim DA, Alvarez-Buylla A. The Adult Ventricular–Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2025 May 15];8(5):a018820. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4852803/>
9. Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Dec 14 [cited 2025 May 15];101(50):17528–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15574494/>
10. Alonso M, Ortega-Pérez I, Grubb MS, Bourgeois JP, Charneau P, Lledo PM. Turning Astrocytes from the Rostral Migratory Stream into Neurons: A Role for the Olfactory Sensory Organ. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. 2008 Oct 22 [cited 2025 May 15];28(43):11089. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6671355/>
11. Curtis MA, Monzo HJ, Faull RLM. The rostral migratory stream and olfactory system: smell, disease and slippery cells. *Prog Brain Res* [Internet]. 2009 [cited 2025 May 15];175:33–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19660647/>
12. Patel RM, Pinto JM. Olfaction: Anatomy, physiology, and disease. *Clinical Anatomy* [Internet]. 2014 Jan [cited 2025 May 15];27(1):54–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24272785/>
13. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, et al. *The Olfactory Bulb*. 2001 [cited 2025 May 15]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11158/>
14. Price JL, Powell TP. The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* [Internet]. 1970 Jul 1 [cited 2025 May 15];7(1):91–122. Available from: <https://dx.doi.org/10.1242/jcs.7.1.91>
15. Nagayama S, Homma R, Imamura F. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits* [Internet]. 2014 Sep 3 [cited 2025 May 15];8(SEP):98. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4153298/>
16. Liu Z, Martin LJ. Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *Journal of Comparative Neurology* [Internet]. 2003 May 12 [cited 2025 May 15];459(4):368–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12687705/>
17. Mendoza-Torreblanca JG, Martínez-Martínez E, Tapia-Rodríguez M, Ramírez-Hernández R, Gutiérrez-Ospina G. The rostral migratory stream is a neurogenic niche that predominantly engenders periglomerular cells: In vivo evidence in the adult rat brain. *Neurosci Res* [Internet]. 2008 Mar 1 [cited 2025 May 15];60(3):289–99. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168010207018354?via%3Dihub>
18. Zhu H, Wang S, Qu L, Shen D. Hippocampus segmentation in MR images: Multiatlas methods and deep learning methods. *Big Data in Psychiatry and Neurology* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2025 May 15];181–

215. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128228845000192?via%3Dihub>
19. Shrager Y, Bayley PJ, Bontempi B, Hopkins RO, Squire LR. Spatial memory and the human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Feb 20 [cited 2025 May 15];104(8):2961. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1815289/>
 20. Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH. Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. *Physiol Rev* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2025 May 15];94(4):991. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4280160/>
 21. Hurtado-Chong A, Yusta-Boyo MJ, Vergaño-Vera E, Bulfone A, De Pablo F, Vicario-Abejón C. IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *European Journal of Neuroscience* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2025 May 15];30(5):742–55. Available from: [/doi/pdf/10.1111/j.1460-9568.2009.06870.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06870.x)
 22. Nieto-Estévez V, Defferali Ç, Vicario-Abejón C. IGF-I: A key growth factor that regulates neurogenesis and synaptogenesis from embryonic to adult stages of the brain. *Front Neurosci*. 2016 Feb 23;10(FEB):181135.
 23. Vicario-Abejón C, Yusta-Boyo MJ, Fernández-Moreno C, De Pablo F. Locally Born Olfactory Bulb Stem Cells Proliferate in Response to Insulin-Related Factors and Require Endogenous Insulin-Like Growth Factor-I for Differentiation into Neurons and Glia. *Journal of Neuroscience* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2025 May 15];23(3):895–906. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/23/3/895>
 24. Hu Q, Lee SY, O’Kusky JR, Ye P. Signalling through the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) interacts with canonical Wnt signalling to promote neural proliferation in developing brain. *ASN Neuro* [Internet]. 2012 [cited 2025 May 15];4(5):253–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22625652/>
 25. Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid- β levels. *Nat Med* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2025 May 15];8(12):1390–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm793>
 26. *NeuroReport* [Internet]. [cited 2025 May 15]. Available from: https://journals.lww.com/neuroreport/abstract/2004/12220/mice_lacking_igf_i_and_lif_have_motoneuron.16.aspx
 27. Nieto-Estévez V, Oueslati-Morales CO, Li L, Pickel J, Morales A V., Vicario-Abejón C. Brain Insulin-Like Growth Factor-I Directs the Transition from Stem Cells to Mature Neurons During Postnatal/Adult Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2025 May 15];34(8):2194–209. Available from: <https://dx.doi.org/10.1002/stem.2397>
 28. Druga R, Salaj M, Al-Redouan A. Parvalbumin - Positive Neurons in the Neocortex: A Review. *Physiol Res* [Internet]. 2023 [cited 2025 May 15];72(Suppl 2):S173. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10660579/>
 29. Afrasiabi M, Gupta A, Xu H, Swietek B, Santhakumar V. Differential Activity-Dependent Increase in Synaptic Inhibition and Parvalbumin Interneuron Recruitment in Dentate Granule Cells and Semilunar Granule Cells. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. 2022 Feb 9 [cited 2025 May 15];42(6):1090. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8824497/>
 30. Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience* 2004 5:10 [Internet]. 2004 Oct [cited 2025 May 15];5(10):793–807. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrn1519>
 31. Kato HK, Gillet SN, Peters AJ, Isaacson JS, Komiyama T. Parvalbumin-expressing interneurons linearly control olfactory bulb output. *Neuron* [Internet]. 2013 Dec 4 [cited 2025 May 15];80(5):10.1016/j.neuron.2013.08.036. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3884945/>
 32. Amilhon B, Huh CYL, Manseau F, Ducharme G, Nichol H, Adamantidis A, et al. Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency. *Neuron* [Internet]. 2015 Jun 3 [cited 2025 May 15];86(5):1277–89. Available from: <https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S0896627315004341>
 33. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell* [Internet]. 2008 Feb 22 [cited 2025 May 18];132(4):645–60. Available from: <https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S0092867408001347>

Anexos

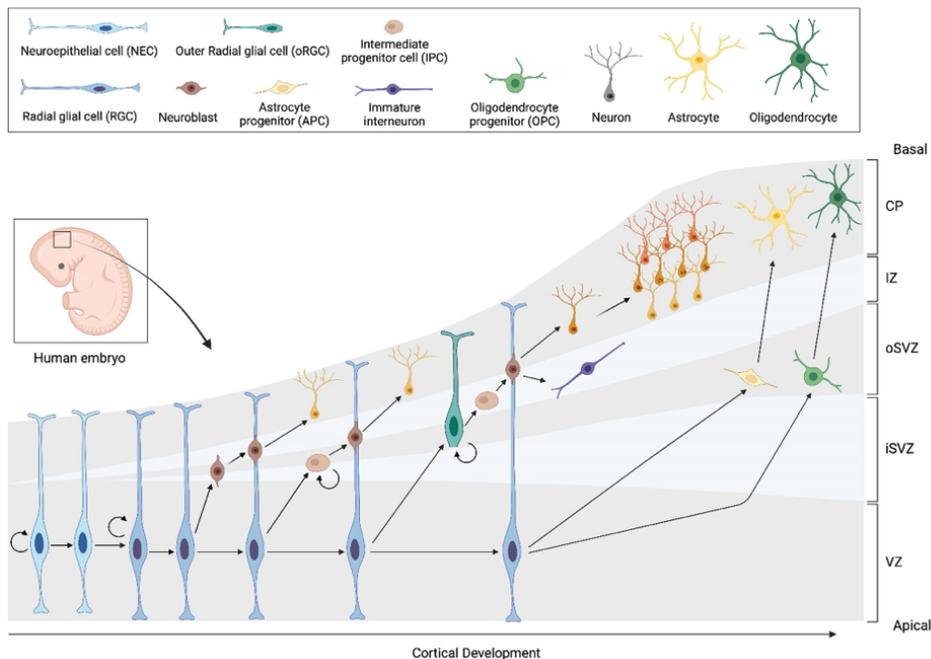
1. Listado de Abreviaturas

AA	Asta de Amón
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BHE	Barrera hematoencefálica
BO	Bulbo olfatorio
BV	Vaso sanguíneo
CalB	Calbindina
CalR	Calretinina
CBO	Centro del BO
CCG	Capa de células granulares del BO
CCM	Capa de células mitrales del BO
CDK5	Proteína quinasa dependiente de ciclina 5
CGHP	Capa granular del HP
CGBO	Células granulares del BO
CGL	Capa glomerular del BO
CM	Capa molecular del HP
CMI	Células mitrales del BO
CMN	Células madre neurales
CMNq	Células madre neurales quiescentes
CMR	Corriente migratoria rostral
CNO	Capa del nervio olfatorio del BO
CP	Células principales
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GH	Hormona del Crecimiento
H	Hilo del HP
HP	Hipocampo

Igf-I	<i>Insulin-like growth factor I</i>
Igf-IR	Receptor de <i>Insulin-like growth factor I</i>
IN-PV	Interneuronas Parvalbúmina
IRS	Insulin receptor substrates
JG	Células yuxtglomerulares
KO	<i>Knockout</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LRP2	Proteína 2 relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
NaCl	Cloruro de Sodio
NAH	Neurogénesis adulta hipocampal
NE	Neuroepitelio
PBS	Tampón salino fosfato
PC	Placa cortical
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIn	Progenitor Intermedio neuronal
PIo	Progenitor Intermedio de oligodendrocitos
PV	Parvalbúmina
RPM	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
TFG	Trabajo de fin de grado
ZI	Zona intermedia
ZM	Zona marginal
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular
ZSV-ZV	Zona subventricular- Zona ventricular
ZV	Zona ventricular
NA	No Asignable
WT	Wild-Type

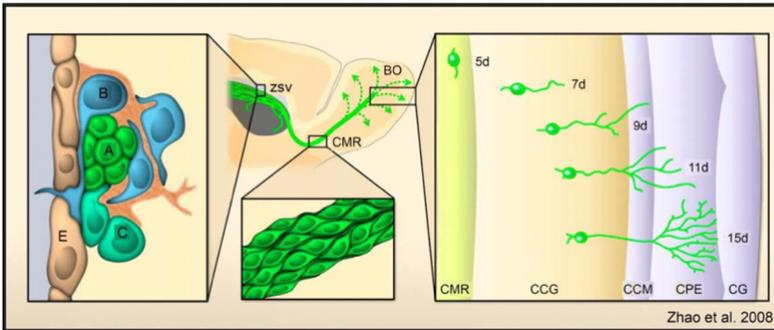
2. Anexos Introducción

Anexo 2.1: Representación esquemática de la neurogénesis embrionaria. En la ilustración se muestra de manera resumida la formación de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos durante el desarrollo embrionario a partir de CPI o CMN. NEC= células neuroepiteliales; oRGC= Células de la glía radial externas; IPC= Célula progenitora intermedia; RGC= Célula de la glía radial; APC= Progenitor astrocítico; OPC= Progenitor oligodendrocítico; CP= Placa cortical; IZ= zona intermedia; Pln= progenitor intermedio neuronal; Plo= progenitor intermedio de oligodendrocitos; oSVZ= zona subventricular externa; iSVZ= zona subventricular interna; ZV= Zona Ventricular. (Adaptado de Dionne, O. 2025 (7))



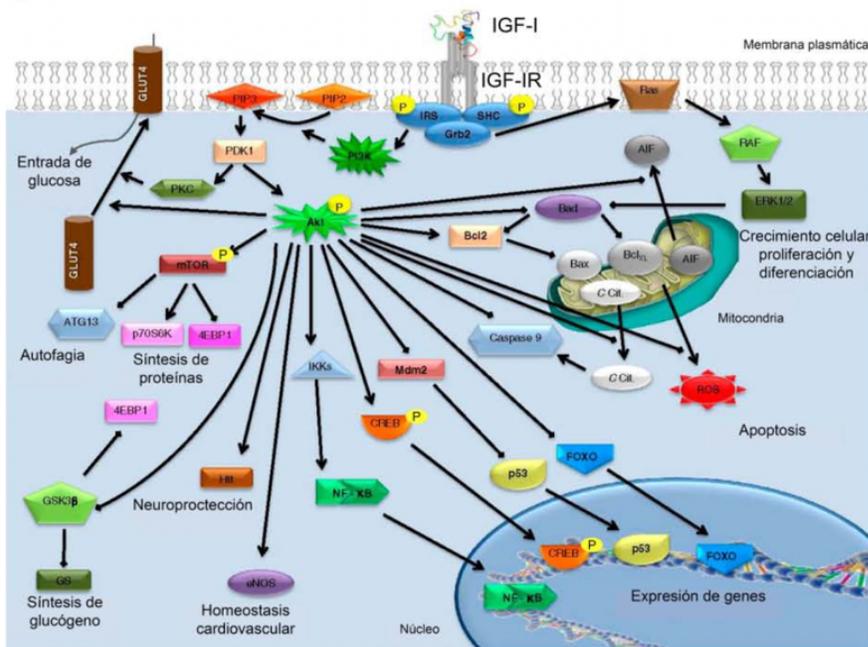
Anexo 2.2: Representación del origen y migración de los neuroblastos hacia el BO.

Se representa el camino que siguen los blastos desde la ZSV-ZV, avanzando a través de la CMR hacia el BO. En esta imagen se muestran los días del desarrollo neurogénico adulto en los que ocurre este proceso. Este proceso ocurre de manera similar en la neurogénesis adulta. ZSV= Zona subventricular; CMR= Corriente migratoria rostral; BO= Bulbo olfatorio; CCG= Capa de células granulares; CCM= Capa de células mitrales; CPE= Capa plexiforme externa; CG= Capa glomerular (Adaptado de Zhao, 2008 (33)).



Anexo 2.3: Vías de señalización activadas tras la unión de Igf-I a su receptor

Se muestra de manera esquematizada las rutas de señalización activadas tras esta unión. Las más relevantes para este trabajo siendo la ruta de PI3K/Akt y la ruta de MAPK (Puche y Castilla-Cortazar, 2012 (22)).



3. Anexos Material y Métodos

Anexo 3.1: Materiales y reactivos necesarios para formular el tampón de lisis “Salting Out”.

500mL	“Salting Out” Buffer	Casa Comercial	Nº Catálogo
20mL	1M Tris-HCl pH 8.0	Roche	03118142001
20mL	0,5M EDTA pH 8.5	Sigma	E5134
25mL	10% SDS	Bio-Rad	161-0418
20mL	5M NaCl	Merck	1.06404.1000
412,5mL	H2O	-	-

Anexo 3.2: Componentes utilizados en la “PCR Master Mix”.

Además, se detallan las cantidades utilizadas más comúnmente en este TFG: 8, 9 y 10 volúmenes en función de las muestras a analizar.

Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Vol. 8 (µl)	Vol. 9 (µl)	Vol. 10 (µl)
Agua destilada	-	Gibco	142	159,75	177,5
10x Buffer II	1x	Applied	20	22,5	25
MgCl2 25mM	2mM	Biosystems	16	18	20
dNTPs 10 mM	0,2mM	Invitrogen	4	4,5	5
Cebadores Sentido 10 µM	0,2µM	Sigma	4	4,5	5
Cebadores Antisentido	0,2µM		4	4,5	5
Taq-Polimerasa	2,5 U	Applied Biosystems	2	2,25	2,5

Anexo 3.3: Cebadores utilizados en las PCR y controles positivos.

Todos los cebadores provienen de la casa comercial Sigma. Las dos primeras PCR, WT e Igf-I Mut pueden realizarse a la vez en el termociclador, ya que, se utiliza el mismo programa y la misma duración.

Banda	Cebadores	Control +	Programa PCR	Duración
WT	VN-1 + ID3	7A78 (WT)	IGF-1 LoxP	2:20 horas
IGF-1 Mut	IA-6 + ID3	D283 (Δ/Δ)	IGF-1 LoxP	2:20 horas
Cre	CreS + CreAS	D283 (Δ/Δ)	CRE	2:05 horas

Anexo 3.4: Componentes del Tampón de Carga (Loading Dye) 6X.

Se exponen los componentes necesarios para producir el Tampón de Carga para la electroforesis en gel.

Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Nº Catálogo
H2O MilliQ	-	Gibco	10977-035
Azul de Bromofenol	0,25%	Bio-Rad	161-0404
PBS	0,25%	Bio-Rad	161-0423
	30%	Sigma	G8773

Anexo 3.5: Imagen de un gel de electroforesis realizada para determinar el genotipo de las camadas de ratones.

(A) expone los resultados para las camadas I218 e I219. (B) expone los resultados para las camadas I220, I221 e I222.



Anexo 3.6: Tabla con los resultados del genotipado de camadas de ratón.

Tabla realizada a partir de las bandas marcadas en (Anexo 3.4A) y (Anexo3.4B) para determinar el genotipo de las camadas de ratones. (A) expone los resultados para las camadas I218 e I219. (B) expone los resultados para las camadas I220, I221 e I222. (+) presencia de la banda; (-) ausencia de la banda.

A

Muestra	ID Ratón	IGF1 VN-1	IGF1 IA-6	Cre	Genotipo
1	218.1	+	-	+	+/+ <i>Cre</i>
2	218.2	-	-	-	<i>WT</i> (+/+)
3	218.3	-	-	-	<i>WT</i> (+/+)
4	218.4	+	-	+	+/+ <i>Cre</i>
5	219.1	+	-	+	+/+ <i>Cre</i>

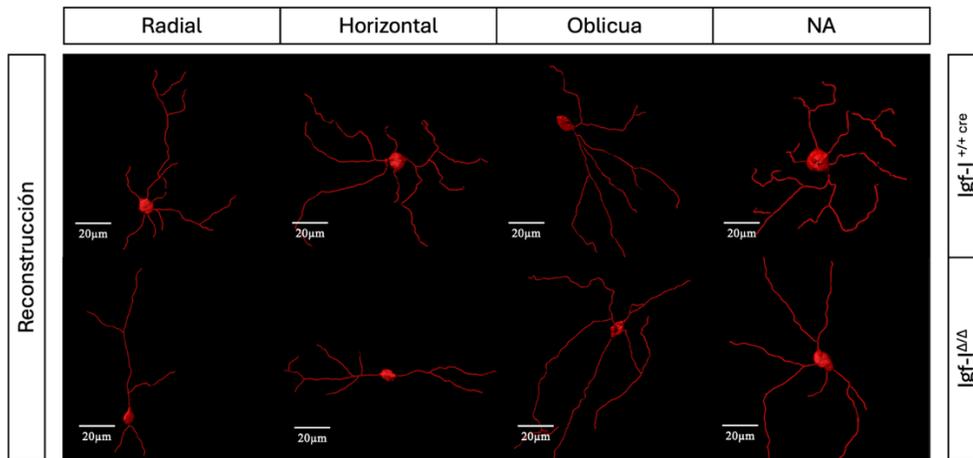
B

Muestra	ID Ratón	IGF1 VN-1	IGF1 IA-6	Cre	Genotipo
1	220.1	+	-	+	+/+ <i>Cre</i>
2	221.1	-	+	+	<i>Igf-1^{Δ/Δ}</i>
3	221.2	+	+	+	<i>Igf-1^{+Δ}</i>
4	222.1	+	-	+	+/+ <i>Cre</i>
5	222.2	+	-	+	+/+ <i>Cre</i>
6	222.3	+	-	+	+/+ <i>Cre</i>
7	222.4	+	-	+	+/+ <i>Cre</i>

4. Anexos Resultados y Discusión

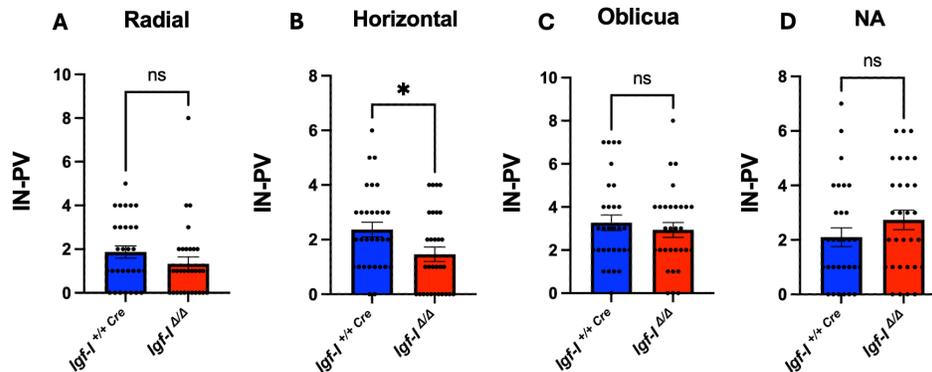
Anexo 4.1: Reconstrucción de IN-PV en el BO.

Se exhibe un ejemplo de cada una de las orientaciones posibles: Radial, Horizontal, Oblicua, No Asignable (NA) analizadas, tanto para el grupo control, como para el experimental. Reconstrucción realizada con IMARIS.



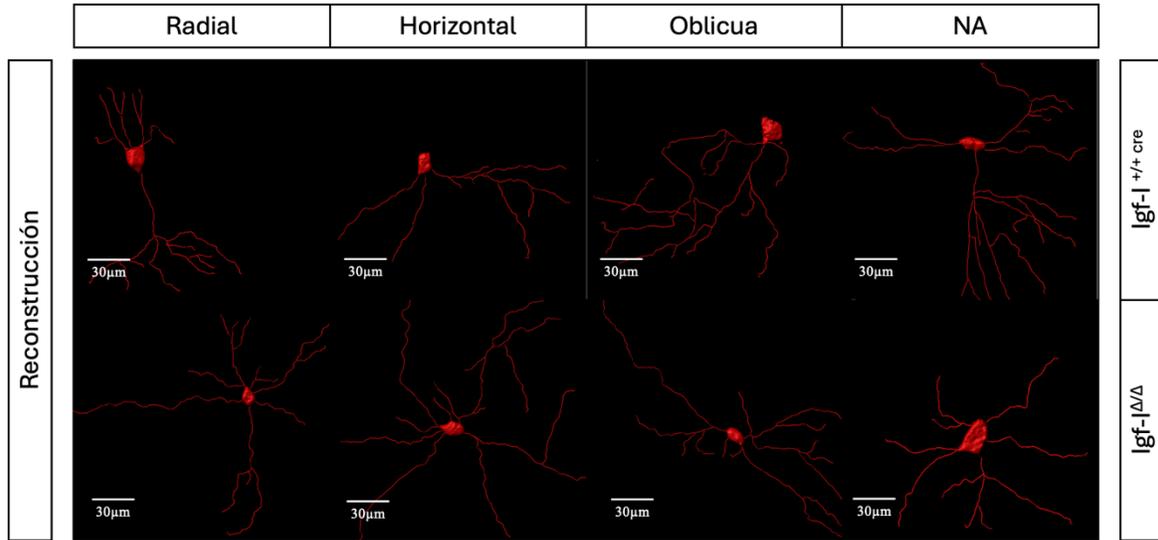
Anexo 4.2: Comparación de la orientación de las neuronas del BO entre el grupo control ($n=30$ IN-PV) y el grupo experimental ($n=30$ IN-PV).

Gráfico de columna que mide la media \pm SEM de cada uno de los animales dividido en cuatro categorías según su orientación: Radial (A), Horizontal (B), Oblicua (C) y No Asignada NA (D). Gráficos realizados con GraphPad tras haber hecho la prueba de t student.



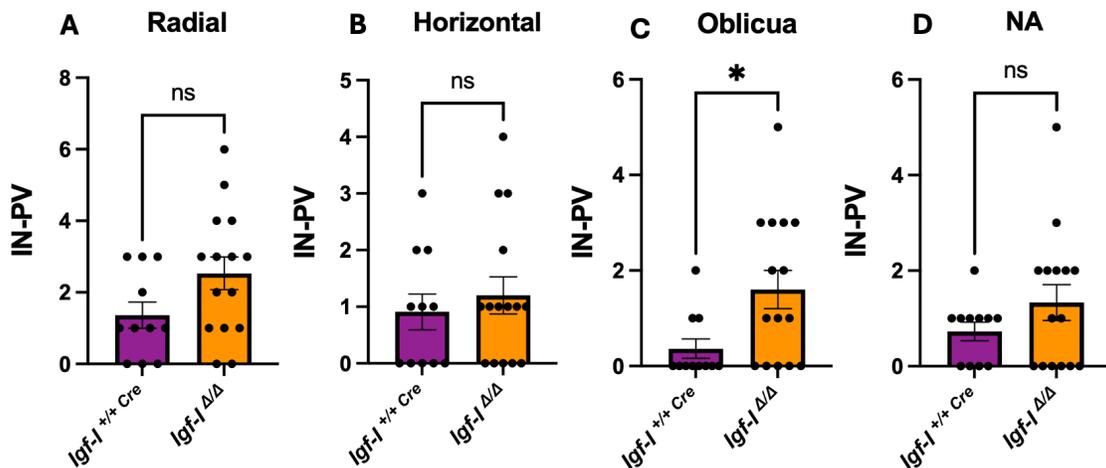
Anexo 4.3: Reconstrucción de IN-PV en el HP.

Se exhibe un ejemplo de cada una de las orientaciones posibles: Radial, Horizontal, Oblicua, No Asignable (NA) analizadas, tanto para el grupo control, como para el experimental. Reconstrucción realizada con IMARIS.



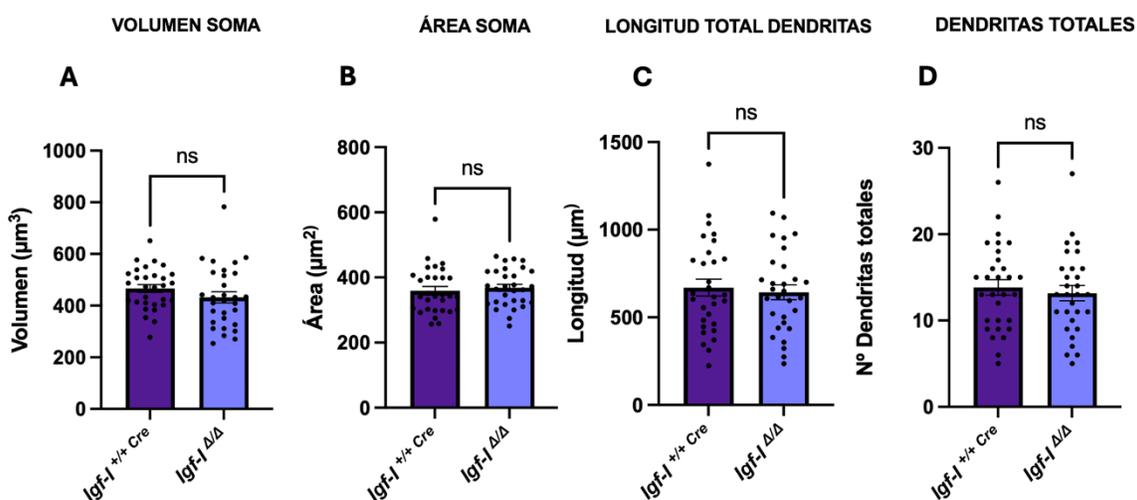
Anexo 4.4: Comparación de la orientación de las neuronas del HP entre el grupo control (n= 11 IN-PV) y el grupo experimental (n= 15 IN-PV).

Gráfico de columna que mide la media ± SEM de cada uno de los animales dividido en cuatro categorías según su orientación: Radial (A), Horizontal (B), Oblicua (C) y No Asignada NA (D). Gráficos realizados con GraphPad tras haber hecho la prueba de t student.



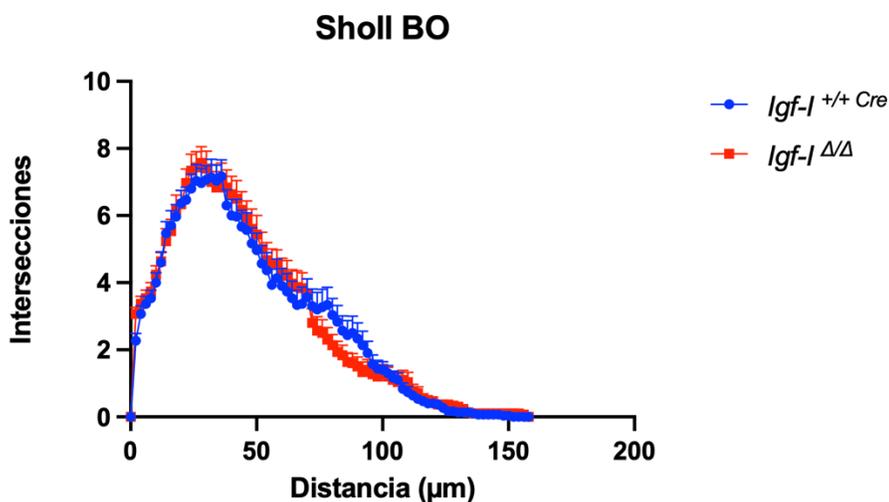
Anexo 4.5: Comparación de distintos parámetros morfológicos de las neuronas del BO entre el grupo control (n= 30 IN-PV) y el grupo experimental (n= 30 IN-PV).

Gráfico de columna que exhibe cada uno de los parámetros asignado: Volumen del Soma (A), Área del Soma (B), Longitud Total de las Dendritas (C) y el Número de Dendritas Totales (D) para cada una de las IN-PV analizadas. Gráficos realizados con GraphPad tras haber hecho la prueba de t student.



Anexo 4.6: Análisis de Sholl para las IN-PV del BO.

Se analizan las intersecciones a lo largo de las distancias tomando en cuenta dos factores: la distancia radial (factor fila) y el genotipo (factor columna).



Anexo 4.7: Comparación de distintos parámetros morfológicos de las neuronas del HP entre el grupo control (n=11) y el grupo experimental (n=15).

Gráfico de columna que exhibe cada uno de los parámetros asignado: Volumen del Soma (A), Área del Soma (B), Longitud Total de las Dendritas (C) y el Número de Dendritas Totales (D) para cada una de las IN-PV analizadas. Gráficos realizados con GraphPad tras haber hecho la prueba de t student.

