



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

EFECTO DE LA DIABETES MATERNA EN EL NIVEL  
DE HISTAMINA Y LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR H<sub>1</sub>  
EN LA CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA NEONATA

**TESIS**

Que presenta:

**PSIC. ROCÍO VALLE BAUTISTA**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR  
Y MOLECULAR**

Directores:

**Dr. José Antonio Arias Montaña**

**Dra. Anayansi Molina Hernández**

**Ciudad de México**

**Agosto 2016**

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

Al Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario No. 339239).

A mis tutores el Dr. José Antonio Arias Montaña y a la Dra. Anayansi Molina Hernández.

A mis revisores de tesis el Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez y el Dr. Gerardo Contreras Patiño.

Al Prof. Jorge Fernández Hernández, al MVZ. Carlos Giovanni Sam Miranda, al MVZ. Ricardo Gaxiola Centeno y al Téc. Jaime Cruz Rubio de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL), del CINVESTAV por su apoyo técnico.

## DEDICATORIAS

A mis padres Lidia y Vicente y a mis hermanos Sergio, Fernando y Malena por el cariño y apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos de la Maestría Omar, Luís, Iván, Paulina, Carlos e Isabel por hacer que estos dos años tuvieran sentido y por brindarme el sentido de pertenecía.

A mis compañeros del laboratorio Bere, Kary, Sarahí y Rafa por apoyarme en el desarrollo de este proyecto y aceptarme como parte del equipo.

Al Wilber, Memo, Cecilia y Raúl por su ayuda con los experimentos, por su apoyo y compañía.

A mis amigas de la facultad de psicología Ángel, Aketzali y Janin, mujeres excepcionales a quienes admiro profundamente y que me enseñaron diferentes maneras de ser y de sentir, por compartir la pasión por la ciencia y una amistad sin fronteras, las quiero.

A mis amigos de la prepa 9, Aketzali, Alejandro, Rodrigo y Juan Manuel, por ser mis compañeros de vida, por su amistad y apoyo incondicional, por crecer juntos y seguir compartiendo experiencias, risas, miedos, alegrías y sobre todo ganas de vivir, los quiero.

A Ramón Letipichia por crecer juntos y seguir compartiendo las peculiaridades de la vida, por acompañarme siempre y darme ánimos para seguir adelante, por tu amor y comprensión gracias.

A Atza Salazar por acompañarme en los momentos difíciles, por las caminatas y las pláticas interminables.

A Isabel Romero, porque el tiempo y el espacio permitieron nuestro encuentro. Gracias por compartir tus conocimientos, cariño y amistad. Te quiero.

Resumen .....	1
Abstract .....	3
1. Introducción.....	4
1.1 La histamina en el sistema nervioso central (SNC).....	4
1.1.1 Receptor a histamina H <sub>1</sub> (RH <sub>1</sub> ).....	5
1.1.2 Receptor a histamina H <sub>2</sub> (RH <sub>2</sub> ).....	6
1.1.3 Receptor a histamina H <sub>3</sub> (RH <sub>3</sub> ).....	7
1.2 Desarrollo del sistema histaminérgico .....	8
1.3 Expresión de los receptores a histamina durante el desarrollo embrionario	9
1.3.1 Receptor H <sub>1</sub> (RH <sub>1</sub> ) .....	9
1.3.2 Receptor H <sub>2</sub> (RH <sub>2</sub> ) .....	10
1.3.3 Receptor H <sub>3</sub> (RH <sub>3</sub> ) .....	10
1.4 Ontogenia y función del RH <sub>1</sub> en la corteza cerebral.....	11
1.5 Diabetes Mellitus .....	13
1.6 Diabetes mellitus gestacional (DMG).....	13
1.7 Modelos animales de diabetes materna.....	14
1.8 Diabetes gestacional y desarrollo del SNC.....	15
1.9 Problemas cognitivos asociados a la diabetes gestacional.....	16
2. Justificación.....	18
3. Hipótesis.....	19
4. Objetivos .....	19
4.1 Objetivo general .....	19
4.2 Objetivos específicos.....	19
5. Métodos.....	20
5.1 Determinación del nivel de histamina .....	22
5.2 Determinación de la expresión del RH <sub>1</sub> .....	23
5.2.1 Extracción de RNA total y RT-qPCR.....	23
5.2.2 Ensayo de unión a radioligando ([ <sup>3</sup> H]-mepiramina) .....	25
5.3 Análisis de resultados.....	25
6. Resultados .....	26
6.1 Establecimiento del modelo de diabetes materna .....	26

6.1.1	Inducción en ratas gestantes.....	26
6.1.2	Glucemia de los neonatos .....	26
6.1.3	Tasa de natalidad y mortalidad de las crías.....	28
6.1.4	Ganancia de peso corporal de las ratas gestantes.....	29
6.1.5	Peso corporal y cerebral de las crías.....	30
6.2	Niveles de HA en la corteza frontal de ratas neonatas (P0) .....	30
6.3	Expresión del RNAm del RH <sub>1</sub> .....	31
6.3.1	Rangos dinámicos y validación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ .....	32
6.3.2	qRT-PCR.....	34
6.4	Ensayos de unión para el RH <sub>1</sub> .....	35
7.	Discusión.....	38
8.	Conclusiones .....	44
9.	Perspectivas .....	45
10.	Referencias .....	46

## Resumen

La diabetes materna (DM) afecta la proliferación y diferenciación neuronales en el telencéfalo dorsal de los embriones de roedor de 12 y 14 días de gestación (E12 y E14), periodo en el que tiene lugar la formación de las capas profundas de la corteza cerebral. Recientemente se describió que la activación del receptor a histamina H<sub>1</sub> (RH<sub>1</sub>) aumenta la diferenciación neuronal *in vitro*, y el bloqueo farmacológico *in vivo* del receptor disminuye la diferenciación de neuronas de las capas profundas de la corteza cerebral.

En el neuroepitelio cortical de los embriones E12 de ratas diabéticas aumenta la expresión del RH<sub>1</sub> y en E14 se observa un aumento en el nivel de la histamina, coincidente con el inicio de la formación de las capas profundas y con el pico neurogénico corticales. El tratamiento en E12 con un antagonista del RH<sub>1</sub> previene el aumento en la neurogénesis en los embriones E14. Lo anterior sugiere que los cambios en los niveles del RH<sub>1</sub> y de la histamina en los embriones de las ratas diabéticas participan en el incremento de la neurogénesis de las capas profundas de la corteza cerebral, lo que podrían reflejar cambios en la expresión cortical del RH<sub>1</sub> y su posición laminar post-natal.

Por lo anterior, el propósito de este estudio fue determinar el efecto de la diabetes materna en el nivel de la histamina y en la expresión del RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral frontal de los productos en el día post-natal 0 (P0).

El nivel de histamina no presentó cambios en el tejido cortical post-natal. La expresión del RH<sub>1</sub>, evaluada a nivel del RNAm y de sitios de unión de un radioligando selectivo, aumentó significativamente en la corteza frontal de las crías de madres diabéticas, y este efecto fue prevenido por el bloqueo farmacológico del receptor con el antagonista selectivo clorfeniramina, administrado durante el periodo de formación de las capas profundas de la corteza cerebral.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que la diabetes gestacional resulta en una mayor expresión post-natal del RH<sub>1</sub> en la corteza frontal y que este efecto podría estar relacionado con un aumento en la neurogénesis de las capas profundas de la corteza cerebral.

## **Abstract**

Maternal diabetes affects neuronal proliferation and differentiation in the rodent dorsal telencephalon at 12 and 14 embryo days (E12 and E14), period in which the formation of the cerebral cortical deep layers occurs. It was recently reported that the histamine H<sub>1</sub> receptor (H<sub>1</sub>R) regulates the differentiation of deep layer cortical neurons. H<sub>1</sub>R activation increases neuronal differentiation *in vitro*, and *in vivo* the pharmacological H<sub>1</sub>R blockade reduces the differentiation of neurons located in the cortical deep layers.

In the cortical neuroepithelium of diabetic embryos an increase in both H<sub>1</sub>R expression and histamine is observed at E12 and E14, respectively. The first event is related to the beginning of the formation of the cortical deep layers, while the second coincides with the neurogenic peak during corticogenesis. The treatment with a H<sub>1</sub>R antagonist prevents the increase in neuronal differentiation reported in E14 diabetic embryos, suggesting that changes in H<sub>1</sub>R and histamine levels in embryos from diabetic rats are involved in increased neurogenesis in the cortical deep layers, which may lead to postnatal changes in cortical expression and the laminar location of H<sub>1</sub>R.

The aim of this work was therefore to determine the effect of maternal diabetes on histamine levels and H<sub>1</sub>R expression in the frontal cortex at postnatal day 0 (P0).

Whereas histamine levels did not change in the cortical tissues, an increase in H<sub>1</sub>R mRNA and binding sites was observed in the frontal cortex of pups from diabetic rats. Both effects were prevented by pharmacological H<sub>1</sub>R blockade with the selective antagonist chlorpheniramine, administered during the development of the cortical deep layers. The increase in H<sub>1</sub>R expression in the frontal cortex of pups from diabetic rats could be related to augmented neurogenesis in the cortical deep layers.

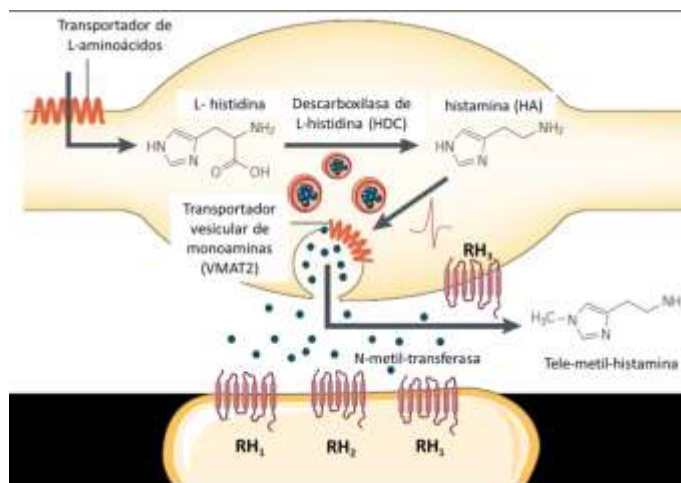


## 1. Introducción

### 1.1 La histamina en el sistema nervioso central (SNC)

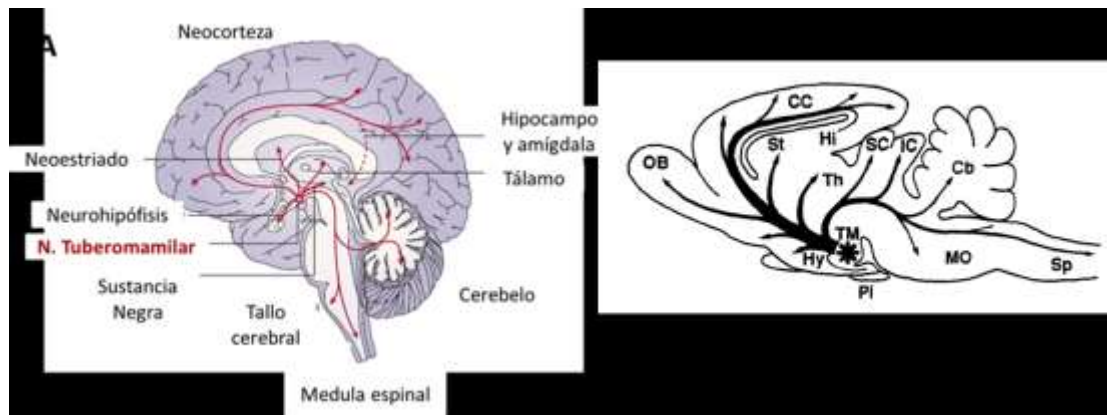
La histamina (HA) es un neuromodulador que participa en la regulación de diferentes procesos fisiológicos como el estado de vigilia, la ingesta de alimentos y líquidos, el mantenimiento de la temperatura corporal, la analgesia, la actividad motora, el aprendizaje y la memoria. El efecto de la HA en el SNC es mediado por la activación de tres (RH<sub>1</sub>, RH<sub>2</sub> y RH<sub>3</sub>) de los cuatro receptores acoplados a proteínas G descritos a la fecha (Haas y Panula, 2003).

La HA se sintetiza a partir del aminoácido L-histidina por la acción de la enzima descarboxilasa de histidina (HDC, E.C. 4.1.1.22), utilizando como cofactor al fosfato de piridoxal (Figura 1). Una vez sintetizada, la HA es introducida a las vesículas sinápticas por el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), y es liberada por el arribo de potenciales de acción. En el espacio sináptico la amina es degradada por la enzima N-metil-transferasa a tele-metil-histamina (EC 2.1.1.8; Haas *et al.*, 2008).



**Figura 1. Síntesis y metabolismo de la histamina.** El amino ácido L-histidina ingresa a las neuronas por acción del transportador de L-aminoácidos, y es descarboxilado a histamina por la enzima descarboxilasa de L-histidina (HDC). La HA es vesiculada por el transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT2). Después de su liberación la amina es degradada a tele-metil-histamina por la acción de la enzima N-metil-transferasa. Modificado de Haas y Panula, 2003.

En los vertebrados las neuronas histaminérgicas se localizan en el núcleo tuberomamilar (NTM) del hipotálamo basal posterior, desde donde envían aferencias a prácticamente todas las regiones del SNC (Figura 2). Entre las estructuras que reciben una mayor inervación están la neocorteza, la amígdala, la sustancia negra y el neostriado (Siegel, 2006).



**Figura 2. El sistema histaminérgico en el cerebro humano y de la rata.** Se muestran las regiones del cerebro del humano (A) y de la rata (B) inervadas por el núcleo tuberomamilar (círculo rojo en A y asterisco en B). Abreviaturas. B: CC, corteza cerebral; OB, bulbo olfatorio; Hi, hipocampo; ST, neostriado; Th, tálamo; SC, colículo superior; IC, colículo inferior; Cb, cerebelo; TM, núcleo tuberomamilar; Hy, hipotálamo; Pi, hipófisis; MO, bulbo raquídeo; Sp, médula espinal. Modificado de Haas y Panula, 2003 (A) y de Wada *et al.*, 1991 (B).

## Receptores a histamina

Como se mencionó, en el SNC la HA ejerce sus efectos por medio de la activación de receptores acoplados a proteínas G (RH<sub>1</sub>, RH<sub>2</sub> y RH<sub>3</sub>).

### 1.1.1 Receptor a histamina H<sub>1</sub> (RH<sub>1</sub>)

El RH<sub>1</sub> es una proteína de 486 y de 487 amino ácidos (aa) en la rata y en el humano, respectivamente. Interactúa con proteínas G $\alpha_{q/11}$  que activan a la fosfolipasa C (PLC), promoviendo la formación de dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) y 1,4,5 trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>). El IP<sub>3</sub> promueve la

liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de reservorios intracelulares, mientras que el DAG activa a la cinasa C de proteína, PKC (Haas *et al.*, 2008)

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares provoca varios efectos como: 1) apertura de canales iónicos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que promueven la despolarización neuronal; 2) activación del intercambiador sodio/calcio (NCX), que también provoca despolarización de neuronas como las del núcleo supraóptico; 3) formación de óxido nítrico (NO); 4) síntesis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc); y 4) apertura de canales de  $\text{K}^{+}$  de conductancia pequeña que promueven hiperpolarización en las células gliales y en las neuronas piramidales del hipocampo, disminuyendo la excitabilidad y el disparo neuronal. El  $\text{RH}_1$  se distribuye ampliamente en el cerebro de los mamíferos, siendo las regiones relacionadas con el control neuroendocrino, conductual y nutricional las que presentan una mayor densidad del receptor como el hipotálamo, los núcleos aminérgicos y colinérgicos del tallo cerebral, el tálamo y las láminas III y IV la corteza cerebral (Haas y Panula, 2003; Molina-Hernández *et al.*, 2012).

### **1.1.2 Receptor a histamina $\text{H}_2$ ( $\text{RH}_2$ )**

El  $\text{RH}_2$  es una proteína de 358 y de 359 aa en la rata y en el humano, respectivamente. El receptor está acoplado a proteínas  $\text{G}\alpha_s$ , por lo que su activación aumenta la actividad de las adenilil ciclasas (ACs), que forman 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Este segundo mensajero estimula a la cinasa A de proteínas (PKA), que activa diversas proteínas, como CREB (del inglés, *cAMP-response element-binding protein*), modula canales catiónicos activados por hiperpolarización, y reduce las corrientes de  $\text{K}^{+}$  activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  responsables del disparo neuronal que sigue a la hiperpolarización en las neuronas piramidales (Haas, 2008; Tabarean, 2016)

De manera semejante al  $\text{RH}_1$ , el  $\text{RH}_2$  presenta una amplia distribución en el cerebro, aunque la mayor densidad del receptor se encuentra en los ganglios

basales, la amígdala, el hipocampo y en las láminas I-III de la corteza cerebral (Arrang, *et al.*, 1995; Sadek *et al.*, 2016).

### 1.1.3 Receptor a histamina H<sub>3</sub> (RH<sub>3</sub>)

El RH<sub>3</sub> se expresa únicamente en las neuronas como auto o heteroreceptor y se distribuye de manera heterogénea en áreas que reciben proyecciones histaminérgicas, existiendo una alta densidad en la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, el núcleo accumbens, el neocórtex, el tubérculo olfatorio, el cerebelo, la sustancia negra y el tallo cerebral (Pollard, *et al.*, 1993; Ryu, *et al.*, 1995).

La activación de autorreceptores localizados en las dendritas y en los axones de las neuronas del NTM inhibe el disparo neuronal y la síntesis y la liberación de HA. Como resultado del procesamiento alternativo del ARN mensajero (ARNm) precursor del RH<sub>3</sub> existen diferentes isoformas con un número distinto de aminoácidos (326-453 aa). En el humano y en la rata se han identificado 20 y 6 isoformas, respectivamente; sin embargo, no todas son funcionales (García-Gálvez y Arias-Montaño, 2016).

El RH<sub>3</sub> interactúa con proteínas G $\alpha_{i/o}$  las cuales desencadenan diferentes vías de señalización intracelular promoviendo los siguientes eventos: 1) inhibición de la formación de AMPc; 2) activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>; 3) inhibición de la apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje (N y P/Q), lo que inhibe la liberación de neurotransmisores; 4) activación de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPK); 5) activación de la fosfolipasa C, conduciendo a la movilización de Ca<sup>2+</sup> desde depósitos intracelulares; 6) inhibición del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>; y 7) activación de canales de K<sup>+</sup> rectificadores entrantes (Sadek *et al.*, 2016; García-Gálvez y Arias-Montaño, 2016).

## 1.2 Desarrollo del sistema histaminérgico

La HA es uno de los primeros neurotransmisores en aparecer durante el desarrollo del SNC de los mamíferos, lo que sugiere que esta amina podría participar en el neurodesarrollo. A partir del día embrionario 12 (E12) se puede detectar a la HA en el cerebro de los roedores, con un pico máximo del E14 al E16. En E20 la concentración de HA disminuye hasta cinco veces y alcanza la concentración basal reportada para el adulto en el prosencéfalo (Vanhala *et al.*, 1994). El inicio del pico de HA coincide con el pico neurogénico, sugiriendo que la HA modula la neurogénesis en el cerebro embrionario, como lo han planteado algunos estudios *in vivo* e *in vitro* (Molina-Hernández y Velasco, 2008; Molina Hernández *et al.*, 2013).

En el periodo E14-E18 se puede observar la presencia de un sistema histaminérgico transitorio, conformado por una gran población de neuronas y fibras inmunorreactivas a HA procedentes del mesencéfalo y del rombencéfalo. Durante este periodo, las neuronas inmunorreactivas a HA tienen una distribución espacio-temporal que coincide con la de las neuronas serotoninérgicas que integrarán a los núcleos del rafé. También se ha descrito que en esta misma región existe una subpoblación de neuronas que son inmunorreactivas a HA y a serotonina. Es importante destacar que las neuronas inmunorreactivas a HA que componen el sistema histaminérgico transitorio no son las que conformarán el núcleo TM en el cerebro adulto, ya que estas últimas se originan a partir del E20 (Wallace y Lauder, 1983; Auvinen y Panula, 1988; Vanhala *et al.*, 1994).

Durante el desarrollo del SNC, las fibras inmunorreactivas del sistema transitorio se distribuyen ampliamente en el hipotálamo a partir del E15. Entre E14 y E18 se detectan de manera transitoria en el puente y en el área tegmental ventral, y en este mismo periodo, las fibras ascienden en conjunto

con el haz prosencefálico medial y el tracto óptico a las cortezas prefrontal y parietal en desarrollo (Auvinen y Panula 1988; Vanhala *et al.*, 1994).

Es posible que el sistema histaminérgico transitorio no sea la única fuente de HA prenatal para el SNC. Distintos órganos producen HA durante el desarrollo y es posible que la HA pudiera atravesar la barrera hematoencefálica inmadura por difusión y entrar en contacto con el tejido cerebral embrionario. Por otra parte, aunque a partir del E18 se han detectado mastocitos productores de HA en la superficie del cerebro, la HA producida por estas células no contribuye a los niveles detectados antes del E18, pero sí al pico de HA que se produce en P5 (Kahlson *et al.*, 1960; Auvinen y Panula, 1988; Panula *et al.*, 1989). En el día P0, el RNAm de la HDC se expresa tanto en las neuronas histaminérgicas del núcleo TM como en los mastocitos presentes en la fisura coroidea; sin embargo, la expresión de la enzima en los mastocitos disminuye a partir del P2 y desaparece después del P5 (Lambratcht-Hall *et al.*, 1990).

### **1.3 Expresión de los receptores a histamina durante el desarrollo embrionario**

#### **1.3.1 Receptor H<sub>1</sub> (RH<sub>1</sub>)**

Kinnunen y cols. (1998) determinaron por primera vez la distribución del RNA mensajero (RNAm) del RH<sub>1</sub> durante el desarrollo embrionario del SNC de la rata, mediante hibridación *in situ*. Estos investigadores reportaron la expresión del RH<sub>1</sub> a partir del E14 en los núcleos del rafé, el neuroepitelio tectal superior, el tálamo, el funículo ventral de la medula espinal, el neuroepitelio ventricular y la subplaca; estas dos últimas estructuras originan a la corteza cerebral.

En el E18 la señal para el RNAm del RH<sub>1</sub> continúa presente en la corteza cerebral en desarrollo, en el neuroepitelio ventricular y en la zona marginal, mientras que la pre-placa cortical y la zona intermedia permanecen sin el

receptor. En el E20, la señal de hibridación estratificada para el RH<sub>1</sub> disminuye en la corteza cerebral; sin embargo, en el neuroepitelio y en la sub-placa cortical la señal permanece constante (Kinnunen *et al.*, 1998).

Molina-Hernández y Velasco (2008) reportaron que *in vitro* las células troncales neurales (NSC, *del inglés neural stem cells*) procedentes del neuroepitelio cortical del embrión de la rata en el E14, expresan al RNAm y a la proteína del RH<sub>1</sub>, y que la activación del receptor aumenta la diferenciación neuronal. Este trabajo mostró que la HA induce la diferenciación de una población de NSC a neuronas maduras, inmunorreactivas a la proteína asociada a microtúbulos (MAP+) mediante la activación del RH<sub>1</sub>.

### **1.3.2 Receptor H<sub>2</sub> (RH<sub>2</sub>)**

Se ha reportado que en el cerebro de la rata la expresión del RH<sub>2</sub> es muy uniforme a partir del E15. A semejanza del RH<sub>1</sub>, el RH<sub>2</sub> se expresa en los núcleos del rafé rostral y caudal, pero en contraste aparece en el hipotálamo ventral y en la placa cortical hasta el E17. No obstante, se ha reportado la presencia del RH<sub>2</sub> en las NSC aisladas del neuroepitelio cortical y mesencéfalo en los estadios E14 y E12, respectivamente, lo que sugiere que el RH<sub>2</sub> está presente en el SNC antes del E15 (Molina-Hernández y Velasco, 2008; Molina-Hernández *et al.*, 2012).

### **1.3.3 Receptor H<sub>3</sub> (RH<sub>3</sub>)**

A partir del E15, el RH<sub>3</sub> se expresa en el epitelio ventricular del mesencéfalo, en el tallo cerebral y en la médula espinal. En el E16 ya no se detecta en el techo del mesencéfalo, en el hipotálamo y en el núcleo *accumbens*. A diferencia del RH<sub>1</sub> y del RH<sub>2</sub>, el RH<sub>3</sub> se expresa tardíamente en la placa cortical y en las capas profundas de la corteza cerebral (E19). Sin embargo, la expresión del RH<sub>3</sub> en este periodo coincide con la maduración de las fibras histaminérgicas y aunque se ha descrito la presencia de este receptor en las

NSC derivadas del neuroepitelio cortical y mesencéfalo, no se han reportado efectos funcionales del mismo (Molina-Hernández *et al.*, 2012).

#### **1.4 Ontogenia y función del RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral**

Como se mencionó, el RH<sub>1</sub> tiene una aparición temprana en el neuroepitelio cortical (E12), lo que sugiere que a través de su activación la HA podría estar participando en el desarrollo de la corteza cerebral (Solís *et al.*, 2015).

Molina-Hernández y Velasco (2008) reportaron que las NSC provenientes del neuroepitelio cortical de la rata en E14 expresan tanto al RNAm como a la proteína del RH<sub>1</sub>, y que la activación de este receptor aumenta la diferenciación neuronal *in vitro*. En trabajos más recientes (Molina-Hernández *et al.*, 2013; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2012) se ha reportado que la HA promueve un incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en respuesta a la activación del RH<sub>1</sub> en las NSC y que la exposición a la HA en la fase proliferativa del cultivo aumenta la diferenciación de las NSC a neuronas corticales positivas al marcador de capas profundas FOXP2 (FOXP2+, del inglés *Forkhead box protein P2*). Este hallazgo se confirmó utilizando un modelo *in vivo* en el que el bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> con clorfeniramina en el E12 disminuyó el número de neuronas FOXP2+ en la corteza cerebral en desarrollo, sugiriendo que la HA es un factor neurotrófico que regula la diferenciación neuronal por medio del RH<sub>1</sub> (Molina-Hernández *et al.*, 2013). FOXP2 es un factor de transcripción que se expresa en las neuronas de proyección de las capas corticales profundas (V y VI) que ha sido relacionado funcionalmente con la ejecución vocal en roedores y en aves cantoras, y con el procesamiento del lenguaje y funciones cognitivas en el humano (Enard *et al.*, 2002; Ferland *et al.*, 2003; Shu *et al.*, 2005).

El aumento en la concentración de HA y la presencia del RNAm del RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral durante el pico neurogénico de la rata en el E14, sugieren que la HA podría modular los procesos de proliferación y diferenciación



neuronal de las capas profundas de la corteza cerebral, que son precisamente las que se están formando en ese momento (Gaspard *et al.*, 2008; Molina-Hernández *et al.*, 2012). También se ha mostrado que la HA incrementa el compromiso neuronal de NSC corticales al aumentar el factor neurogénico neurogenina1 (Ngn1) y prospero1 (Prox1), un factor de transcripción específico de la diferenciación glutamatérgica (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2012). Estos antecedentes sugieren que la HA, mediante la activación del RH<sub>1</sub>, participa en la diferenciación neuronal durante la corticogénesis temprana (E12-E14), periodo en el que se establecen las capas profundas de la corteza cerebral.

En los neonatos, el RH<sub>1</sub> presenta un patrón de distribución laminar característico en la corteza cerebral tanto de la rata como del humano. En la rata, en P0 se detecta el RNAm del RH<sub>1</sub> en las capas profundas de la corteza cerebral (V y VI), patrón similar al observado en la corteza cerebral del humano (Lintunen *et al.*, 1998; Jin y Panula, 2005). A diferencia del RNAm la proteína del receptor RH<sub>1</sub> se localiza principalmente en las capas intermedias III y IV, las cuales se caracterizan por recibir una gran inervación por parte del tálamo, y en las dendritas apicales de las neuronas piramidales de las capas profundas. La localización específica del RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral sugiere que la HA podría regular los circuitos tálamo-corticales y cortico-corticales a través de la activación de dicho receptor (Panula *et al.*, 2014).

En apoyo a la hipótesis anterior, se ha reportado que los ratones “*knockout*” (KO) del RH<sub>1</sub> presentan alteraciones en el aprendizaje y la memoria en tareas que dependen del funcionamiento correcto de la corteza frontal en coordinación con estructuras como el hipocampo y la amígdala, como la prueba de reconocimiento de objeto, el laberinto de Barnes, el laberinto radial de ocho brazos y el laberinto de Morris, entre otros, en los que los procesos de aprendizaje sensorial-motor, memoria de trabajo y memoria de referencia se encuentran comprometidos, lo que sugiere que el RH<sub>1</sub> participa en la

regulación de dichas funciones corticales (Dai *et al.*, 2007; Ambrée *et al.*, 2014).

### **1.5 Diabetes Mellitus**

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas que se caracterizan por presentar concentraciones elevadas de glucosa en sangre, debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina. De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes se clasifica en:

- a. Diabetes mellitus tipo 1
- b. Diabetes mellitus tipo 2
- c. Otros tipos específicos de diabetes
- d. Diabetes mellitus gestacional (DMG)

### **1.6 Diabetes mellitus gestacional (DMG)**

La DMG es un padecimiento caracterizado por la intolerancia a los carbohidratos con diversos grados de severidad que se reconoce por primera vez durante el embarazo, y que puede o no remitir después del parto. La prevalencia de DMG varía entre el 1 y el 17% dependiendo de la población estudiada y de la prueba diagnóstica utilizada. En el año 2015 se reportaron a nivel mundial 20.9 millones de nacimientos afectados por la diabetes durante el embarazo, lo que representa al 16.2% del total de los nacimientos (*International Diabetes Federation*, 2015). En México en el año 2013, el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes (INPer) reportó una prevalencia del 17.2% de mujeres que padecieron DMG, siendo la alteración metabólica más frecuente durante el embarazo.

La DMG expone al feto a las concentraciones elevadas de glucosa plasmática de la madre durante el segundo y tercer trimestres, lo que resulta en un crecimiento fetal excesivo, hipoglucemia, hiperinsulinemia, hipoxia, ictericia, hipocalcemia, policitemia, enfermedad por deficiencia de surfactante pulmonar en el neonato y aumento en el índice de muertes perinatales (Silverman *et al.*, 1998; Garcia-Carrapato, 2003; Polanco *et al.*, 2005; Font-López *et al.*, 2010). En la etapa final de la gestación la muerte intrauterina y perinatal es cuatro veces más frecuente. Las principales causas de morbilidad y mortalidad perinatal son la hipoxia y la acidosis fetal, la hipoglucemia e hipocalcemia (Garcia-Carrapato, 2003; Polanco *et al.*, 2005).

### **1.7 Modelos animales de diabetes materna**

Las características metabólicas que se presentan durante el embarazo que se asocian a la DMG en los humanos y la imposibilidad ética de realizar estudios directamente en los mismos, hace necesario recurrir al uso de modelos animales de diabetes materna. A pesar de que no existe un modelo que reproduzca con precisión las características de la DMG, gran parte del conocimiento sobre algunos mecanismos fisiopatológicos de la misma y sus efectos en el desarrollo intrauterino se han obtenido por medio de modelos animales.

Existen diferentes métodos para inducir diabetes durante la gestación, siendo la administración de estreptozotocina (STZ) el más utilizado. La STZ es una nitrosourea aislada del hongo *Streptomyces achromogenes* que destruye selectivamente a las células pancreáticas  $\beta$ , generando hiperglucemia e hipoinsulinemia. Este modelo de diabetes ha sido ampliamente utilizado en la rata para evaluar defectos del desarrollo embrionario temprano, la inducción de malformaciones, anormalidades placentarias, defectos durante el desarrollo fetal y la transmisión intrauterina de enfermedades metabólicas (Jawerbaum y White, 2010).

Para estudiar los efectos de la diabetes durante la gestación utilizando STZ se debe considerar la dosis de STZ, la especie a evaluar, la edad de los animales y el periodo de administración del fármaco. En particular para estudiar el desarrollo fetal de la rata, el fármaco se administra antes de la implantación del embrión, en el día 5 de gestación. De esta manera las alteraciones observadas en los embriones serán consecuencia de la hiperglucemia materna (López-Soldado y Herrera, 2003). Se ha reportado que la administración de una sola dosis de 50 mg/kg de STZ durante la gestación produce hiperglucemia severa (>200 mg/dL) que se mantiene durante toda la gestación, y de esta forma se obtiene de manera simple un modelo animal de diabetes materna. Una desventaja de este modelo es que la destrucción irreversible de las células pancreáticas  $\beta$  lo hace más parecido a la diabetes mellitus tipo 1 (Jawerbaum y White, 2010; Salazar *et al.*, 2015).

### **1.8 Diabetes gestacional y desarrollo del SNC**

Existe un número reducido de estudios que abordan el efecto de la diabetes gestacional en el desarrollo del SNC de los productos y sus secuelas a largo plazo. Utilizado un modelo de diabetes gestacional Liao y cols. (2004) reportaron que los fetos de ratonas diabéticas presentaron alteraciones en el neuroepitelio prosencefálico que incluyen engrosamiento y fusión del telencéfalo ventral en E11.5, así como un aumento en la expresión de factores de transcripción que regulan la diferenciación neuronal y glial como Shh, Nkx2.1, Ngn1 y 2, Olig1, Ascl1 y BF1. Con el mismo modelo Fu y cols. (2006) mostraron que los productos de madres diabéticas presentan un aumento en la diferenciación neuronal en las regiones ventral y dorsal del telencéfalo en E11.5, evento relacionado con un aumento en la expresión de Ngn1 y con el engrosamiento del telencéfalo dorsal.

A nivel post-natal, Steculorum y Bouret (2011) estudiaron los efectos de la diabetes gestacional en la organización de los circuitos hipotalámicos que

regulan el balance energético de las crías. A nivel central, en las neuronas que integran al núcleo arqueado de los productos de la ratona diabética presentaron resistencia a la leptina, además de una menor densidad de fibras que proyectan de esta región al núcleo paraventricular. Estos núcleos forman parte de una compleja red neuronal que regula el metabolismo energético y la conducta alimentaria, razón por la cual los productos de madres diabéticas presentaron un mayor consumo de alimento e incremento en el peso corporal con respecto al grupo control, sugiriendo que los cambios generados durante el desarrollo en la citoarquitectura de este circuito por efecto de la diabetes materna tienen consecuencias funcionales a corto y largo plazo.

De manera interesante, en un modelo de DMG de la rata se encontró que los embriones de madres diabéticas además de presentar neurogénesis incrementada como lo reportaron Fu y cols. (2006), presentan un aumento en la concentración de HA en E14 y en la expresión del RH<sub>1</sub> en el prosencéfalo dorsal en E12 (Solís *et al.*, 2016). Los efectos de la HA reportados *in vivo* e *in vitro*, en conjunto con los cambios en la expresión del RH<sub>1</sub>, el nivel de HA y la neurogénesis durante el desarrollo cortical en el modelo de DMG en la rata, sugieren la participación de la HA y del RH<sub>1</sub> en la formación de las capas profundas de la corteza cerebral.

### **1.9 Problemas cognitivos asociados a la diabetes gestacional**

En varios estudios realizados en humanos se ha planteado que la diabetes puede generar alteraciones en el desarrollo del SNC en el segundo trimestre de gestación, lo que podría generar disfunciones cognitivas debido a que en este periodo tienen lugar la mayoría de los eventos que originan a la corteza cerebral, como la migración y la diferenciación neuronales necesarias para la formación de los estratos corticales (Ornoy *et al.*, 1999; Clausen *et al.*, 2013; Camprubi *et al.*, 2015).

Ornoy y cols. (1999) reportaron que los hijos menores de 9 años de edad de madres que presentaron DMG tuvieron un menor desempeño en tareas verbales y un menor dominio de la motricidad fina y gruesa, concluyendo que la DMG puede inducir un ligero déficit neurológico a largo plazo en los hijos de madres diabéticas. Recientemente Bolaños y cols. (2015) realizaron un estudio en el que se evaluó el neurodesarrollo de niños de 7-9 años de edad cuyas madres presentaron DMG. Se reportó que los hijos de madres diabéticas presentaron en promedio un menor IQ (96.8) en comparación con el grupo control (102.5). También se encontró que estos niños presentaron una pobre ejecución en tareas gráficas y viso-espaciales, así como en actividades que requieren del uso de la memoria de trabajo, considerada un tipo de memoria a corto plazo, que resulta de la coordinación adecuada de la corteza prefrontal y del hipocampo. Estos estudios sugieren que la DMG alteró el proceso normal de maduración de estas estructuras, generando un déficit neurológico, si bien menor, en los hijos de madres diabéticas.

## 2. Justificación

La DMG es un padecimiento que desarrollan del 1 al 17% del total de mujeres embarazadas. Los hijos de madres diabéticas presentan déficits cognitivos como coeficiente verbal disminuido, alteraciones en la memoria de trabajo y una pobre ejecución en tareas gráficas espaciales y/o bimanuales, procesos que dependen de la integridad funcional de la corteza cerebral.

En embriones de ratas diabéticas el RH<sub>1</sub> se encuentra sobre-expresado en el prosencéfalo dorsal en E12 y se observa un aumento en la concentración de HA en esta misma región en E14, lo que sugiere que la desregulación del sistema histaminérgico en la corteza cerebral embrionaria podría generar cambios en la citoarquitectura cortical de los productos.

Dado que la activación del RH<sub>1</sub> aumenta la diferenciación de las neuronas corticales FOXP2+ de la capa VI, la cual expresa al RH<sub>1</sub>, se propone que la HA favorece la diferenciación prematura de dicho linaje neuronal, lo que podría generar cambios discretos pero persistentes en esta lámina cortical que se reflejarían en el perfil de expresión del RH<sub>1</sub> cortical en el estadio post-natal.

Por lo anterior, el propósito de la presente tesis fue evaluar el efecto de la diabetes materna en el perfil de expresión del RH<sub>1</sub> y en el nivel de HA cortical en neonatos en el día post-natal 0 (P0) y determinar si el tratamiento con un antagonista del RH<sub>1</sub> en el periodo E12-E14 previene dichos efectos. Para este fin se utilizó un modelo de diabetes materna en la rata, inducido por la administración sistémica de estreptozotocina (STZ).

### **3. Hipótesis**

La diabetes materna modifica el nivel de histamina y la expresión del RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral frontal de ratas neonatas.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de la diabetes materna en el nivel de histamina y la expresión del RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral frontal de los productos en el día post-natal 0 (P0).

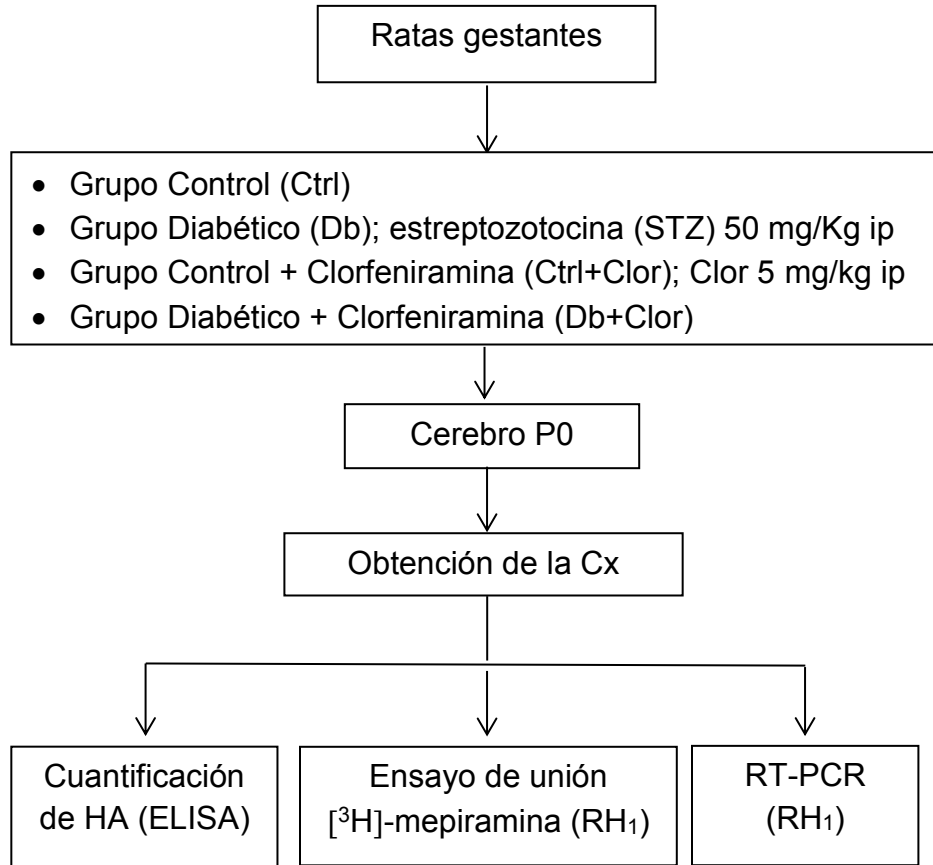
#### **4.2 Objetivos específicos**

1. Determinar si la diabetes materna modifica el nivel de HA en la corteza cerebral frontal de los productos (P0).
2. Determinar si la diabetes materna altera la expresión del receptor RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral frontal de los productos (P0).
3. En su caso, determinar si los cambios en el nivel de HA y la expresión del receptor RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral frontal de los productos (P0) son prevenidos por el bloqueo farmacológico del receptor RH<sub>1</sub> durante la formación de las capas profundas de la corteza cerebral (E12-E14).



## 5. Métodos

Para abordar los objetivos antes mencionados, se diseñó la siguiente estrategia experimental.



Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Se utilizaron ratas hembra adultas (Wistar, 230-300 g), las cuales se mantuvieron en condiciones de temperatura constante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y ciclo luz:oscuridad de 12:12 h, así como agua y alimento *ad libitum*.

Las hembras se colocaron con un macho sexualmente maduro dentro de una caja-habitación durante la fase oscura. A la mañana siguiente se determinó la

presencia de espermatozoides y células cornificadas en un frotis vaginal (Marcondes *et al.*, 2002); este punto se consideró como E0.5, y las hembras fueron separadas del macho y colocadas en cajas individuales en donde permanecieron durante toda la gestación.

Cinco días posteriores a la cópula (E5), el grupo diabético recibió una dosis única de STZ (50 mg/kg) disuelta en solución de citratos (pH 6.4) por vía intraperitoneal (ip), mientras que al grupo control únicamente se administró el vehículo. La glucemia fue determinada en ambos grupos 48 h después de la inducción, utilizando una gota de la sangre obtenida por punción de la vena caudal y un glucómetro electrónico (ACCU-CHEK, Roche, Basilea, Suiza). Se consideró como rata diabética a aquella que presentara una glucemia  $\geq 200$  mg/dL, y los animales que presentaron una glucemia inferior a dicho valor fueron descartados del experimento. Para el grupo control sólo se incluyeron a las ratas inyectadas con vehículo con glucemia de 90-120 mg/dL.

Los grupos control y diabético fueron divididos en hembras tratadas con clorfeniramina (Clor; 5 mg/kg, ip; Naranjo y Naranjo, 1968; *National Toxicology Report*, 1986) y vehículo (agua inyectable). Los tratamientos fueron administrados del día E12 al E14, para un total de cuatro grupos experimentales con un tamaño de muestra (n) mínimo de tres hembras gestantes: Control (Ctrl), Control + Clorfeniramina (Ctrl+Clor), Diabético (Db) y Diabético + Clorfeniramina (Db+Clor).

Las crías de todos los grupos experimentales fueron sacrificadas dentro de las primeras 12 h después del nacimiento (P0). Para la determinación de la HA y los ensayos de unión y de expresión del RH<sub>1</sub>, las ratas (P0) fueron sacrificadas por decapitación y se extrajo el cerebro para diseccionar la corteza frontal.

## 5.1 Determinación del nivel de histamina

Para cuantificar la HA en la corteza frontal se utilizaron ensayos de ELISA siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor del estuche (Alpco® Immunoassays, Salem, EU). El tejido se homogenizó en 100 µL de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) a 4°C utilizando un homogenizador (Polytron® PT 2100 Homogenizers, Kinematica, Lucerna, Suiza). El homogenado se centrifugó a 10,500xg durante 5 min a 4°C, y se recuperó el sobrenadante.

Para la preparación y acilación de las muestras, se tomaron 25 µL de la muestra, 25 µL del estándar y 25 µL de los controles, se colocaron en los pozos respectivos de la placa de reacción y se agregaron 25 µL de la solución de acilación. Se incubó por 45 min con agitación (20-25°C), y posteriormente se tomaron 25 µL de la muestra, 25 µL del estándar y 25 µL de los controles acilados y se colocaron en los pozos correspondientes de las tiras de microtitulación para histamina; se agregaron 100 µL del antisuero contra histamina (generado en cabra) a todos los pozos y se incubó durante 20 h con agitación (20-25°C).

Una vez alcanzado el equilibrio, se eliminó el contenido de cada pozo, y se lavó cuatro veces con la solución de lavado. Se secó la placa en posición invertida sobre papel absorbente, se añadieron 100 µL del conjugado de la enzima (inmunoglobulinas anti cabra generadas en conejo y conjugadas con peroxidasa) a todos los pozos y se incubó durante 30 min con agitación (20-25°C); se eliminó el contenido de cada pozo, y se lavó cuatro veces con la solución de lavado. Se secó la placa en posición invertida sobre papel absorbente, se añadieron 100 µL de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) como sustrato de la reacción colorimétrica y se incubó durante 30 min con agitación (20-25°C).

La concentración de HA se determinó tomando como referencia la curva con concentraciones conocidas (0, 0.5, 1.5, 5, 15, 50 ng/mL). La absorbancia se

determinó a 495 nm de longitud de onda en un sistema de detección múltiple (GloMax®, Promega, Madison, EU). El rango de detección reportado es 0.3- 125 ng/ml. Los resultados fueron normalizados con base en la cantidad ( $\mu\text{g}$ ) de proteína presente en cada muestra, determinada por el método de Bradford (Friedenauer y Berlet 1989; Bradford, 1976).

## **5.2 Determinación de la expresión del RH<sub>1</sub>**

### **5.2.1 Extracción de RNA total y RT-qPCR**

Después de su disección, la corteza frontal fue colocada en 1 mL del reactivo TRIZOL® (Life Technologies, Bartlesville, EU) y almacenada hasta su uso a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para la extracción de RNA total se siguió el protocolo indicado por el proveedor. El tejido fue homogenizado utilizando jeringas de insulina, se incubó durante 15 min a  $30^{\circ}\text{C}$ , se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 s y se incubó por 3 min a  $30^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a 1,700xg durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y la fase superior de cloroformo se transfirió a un tubo de 1.5 mL, al que se le adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol; se agitó vigorosamente durante 15 s y se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Se centrifugó a 11,000xg durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ; se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados por centrifugación de 5 min cada uno (11,000xg,  $4^{\circ}\text{C}$ ) con 1 mL de etanol; el primero con etanol al 100% y el segundo al 75%. El sobrenadante fue eliminado y después del segundo lavado la pastilla se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente.

El RNA total fue resuspendido en 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas y se incubó durante 10 min a  $60^{\circ}\text{C}$ ; se cuantificó y se determinó la integridad del RNA por la presencia de los RNAs ribosomales 18S, 28S y 5S, mediante la electroforesis de 1  $\mu\text{L}$  del RNA total en geles de agarosa al 2% (Chomczynski y Sacchi, 1987).

Para las reacciones de retrotranscripción (RT) se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, en presencia de 0.5  $\mu\text{g}$  de hexámeros aleatorios, 1 mM de la mezcla de

dinucleótidos trifosfatados (dNTPs), 2  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de retrotranscripción (10x), 0.5  $\mu\text{L}$  de inhibidor de ribonucleasas (40 U/ $\mu\text{L}$ ), 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM) y 15 U de la enzima AMV Retrotranscriptasa (Promega, Madison, EU). La mezcla se llevó a un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  con agua libre de RNAsas y fue incubada por 60 min a 42°C. La reacción se inactivó durante 5 min a 95°C y el ADN complementario (ADNc) fue mantenido a -20°C hasta su uso.

Una vez verificado el tamaño del producto esperado por PCR de punto final y establecidos los rangos dinámicos para el RH<sub>1</sub> y el gen normalizador GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), se utilizaron 100 ng de cDNA, 10 pmoles de cada oligonucleótido y una mezcla comercial “master mix KAPA™ Syber Fast® qPCR (KAPA, Bartlesville, EU) para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . Las secuencias de los oligonucleótidos (orientación 5'-3') fueron las siguientes (Molina-Hernández *et al.*, 2008):

RH<sub>1</sub> sentido: CTTCTACCTCCCCACTTTGCT,  
RH<sub>1</sub> anti-sentido: TTCCCTTTCCCCCTCTTG;  
GAPDH sentido: GGACCTCATGGCCTACATGG,  
GAPDH anti-sentido: CCCCTCCTGTTGTTATGGGG.

La reacción se llevó a cabo con un periodo inicial de desnaturalización por 10 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización por 10 s a 95°C, de alineación durante 15 s a 56°C para el RH<sub>1</sub> y a 58°C para GAPDH, y de extensión por 20 s a 72°C. Al finalizar la reacción se realizaron curvas de desnaturalización para asegurar la amplificación de un solo producto (Kubista *et al.*, 2006). Los resultados fueron analizados utilizando el método de expresión relativa  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ , calculando el  $\Delta\text{CT}$ , que es ciclo umbral (CT) de cada muestra normalizado con el obtenido para GAPDH ( $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{muestra}} - \text{CT}_{\text{GAPDH}}$ ) mientras que el  $\Delta\Delta\text{CT}$  corresponde al  $\Delta\text{CT}$  del grupo experimental menos el  $\Delta\text{CT}$  del grupo control.

### **5.2.2 Ensayo de unión a radioligando ( $[^3\text{H}]$ -mepiramina)**

Se utilizó la preparación de membranas totales de la corteza frontal de ratas P0. El tejido se homogenizó en 10 mL de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4) y se centrifugó a 20,000xg durante 20 min a 4°C. La pastilla (membranas totales) se resuspendió en 400  $\mu\text{L}$  de solución de incubación (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4). Se utilizó la corteza cerebral de ratas adultas como control positivo.

La unión total del radioligando al receptor se determinó en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ , con  $[^3\text{H}]$ -mepiramina (10 nM) y membranas totales ( $\sim 20 \mu\text{g}$ ). La unión no específica se determinó en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de mepiramina. Se incubó durante 60 min a 30°C, y las muestras fueron filtradas utilizando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B previamente sumergidos en 0.3% de polietilimina (3 h). La radioactividad retenida en los filtros se determinó por centellometría, la unión específica se calculó restando la unión no específica de la unión total y los resultados fueron normalizados con base en el contenido de proteína, cuantificado por el método del ácido bicinconínico (ensayo BCA; Smith *et al.*, 1985).

### **5.3 Análisis de resultados**

Para los datos que cumplieron con los criterios de normalidad y homogeneidad de varianzas necesarios para realizar un análisis estadístico paramétrico, se usó la prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc DHS de Tukey; el nivel de significancia estadístico fue establecido en  $P < 0.05$ . Para aquellos datos que no cumplieron con los criterios para realizar un análisis estadístico paramétrico, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, y el nivel de significancia estadístico fue también establecido en  $P < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó con el programa Prism versión 5 (Graph Pad).

## **6. Resultados**

### **6.1 Establecimiento del modelo de diabetes materna**

#### **6.1.1 Inducción en ratas gestantes**

Con el propósito de determinar si en nuestro modelo de diabetes materna se indujo una hiperglucemia mayor a 200 mg/dL, que corresponde a diabetes severa, se registró el nivel de glucosa en sangre de las ratas gestantes 48 h después de la administración de STZ o del vehículo, y post-parto para establecer si la hiperglucemia se mantenía hasta dicho momento.

Cuarenta y ocho h después de la administración de STZ o del vehículo, las ratas que recibieron STZ de los grupos Db y Db+Clor presentaron glucemias de  $405 \pm 24$  y  $412 \pm 68$  mg/dL, respectivamente (promedio  $\pm$  error estándar, s.e.m.), mientras que las ratas de los grupos Ctrl y Ctrl+Clor a las que se les administró el vehículo presentaron glucemias de  $107 \pm 4$  y de  $105 \pm 3$  mg/dL, respectivamente (Tabla 1).

Con respecto a la glucosa post-parto, las ratas tratadas con STZ (grupos Db y Db+Clor) mantuvieron la hiperglucemia, con valores de  $401 \pm 70$  y  $432 \pm 82$  mg/dL, respectivamente, mientras que las ratas a las que se les administró el vehículo (grupos Ctrl y Ctrl+Clor) mostraron glucemias de  $102 \pm 7$  y  $108 \pm 6$  mg/dL, respectivamente (Tabla 1).

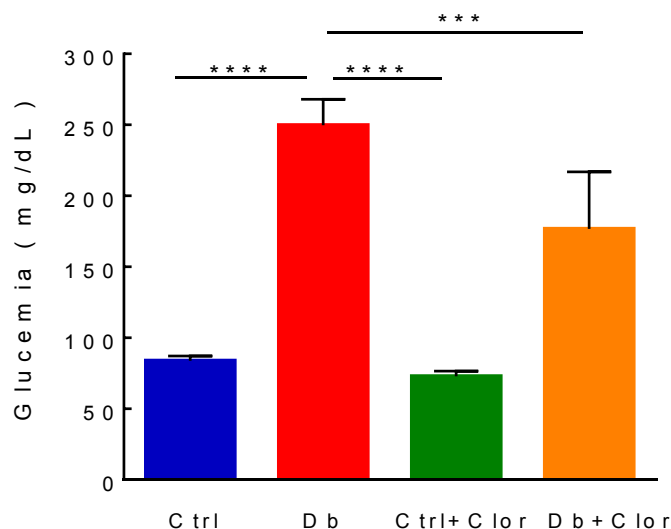
#### **6.1.2 Glucemia de los neonatos**

Los neonatos (P0) de las ratas diabéticas presentaron una hiperglucemia de  $250 \pm 18$  mg/dL, mientras que la glucemia de los neonatos del grupo Ctrl+Clor ( $73 \pm 4$  mg/dL) no fue estadísticamente diferente del grupo Ctrl ( $84 \pm 3$  mg/dL), y la glucemia del grupo Db+Clor ( $176 \pm 40$  mg/dL) fue significativamente menor que en el grupo Db (Figura 3).

**Tabla 1. Glucemia en ratas gestantes**

Grupo	n	Glucemia 48 h ( mg/dL )	Glucemia post-parto ( mg/dL )
Ctrl	7	107 ± 4	102± 7
Db	7	405 ± 24	401 ± 70
Ctrl + Clor	6	105 ± 3	108± 6
Db + Clor	5	412 ± 68	432 ± 82

Los valores corresponden al promedio ± error estándar (s.e.m) del número de ratas indicado (n). Control (Ctrl); Diabético (Db); Control + Clorfeniramina (Ctrl+Clor); Diabético + Clorfeniramina (Db+Clor).



**Figura 3. Glucemia de las ratas neonatas.** Los valores corresponden al promedio ± s.e.m de la glucemia (mg/dL) de los neonatos (P0). El número de animales fue: Control (Ctrl), 24; Diabético (Db), 29; Control + Clorfeniramina (Ctrl+Clor), 24; Diabético + Clorfeniramina (Db+Clor), 21. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , prueba de Kruskal-Wallis.



### 6.1.3 Tasa de natalidad y mortalidad de las crías

A fin de determinar si en el modelo de DMG aumentaba la mortalidad de los productos al nacimiento (P0), se contabilizó el número total de crías (tamaño de la camada), y se identificó a las crías que nacieron vivas o muertas.

En las crías de las ratas diabéticas (Db) se observó un mayor índice de mortalidad intrauterina, en comparación con los productos de las ratas Ctrl; las ratas diabéticas que recibieron clorfeniramina (Db+Clor) presentaron un menor número de productos muertos en comparación con las madres diabéticas (Tabla 2).

**Tabla 2. Natalidad y mortalidad de las crías por condición**

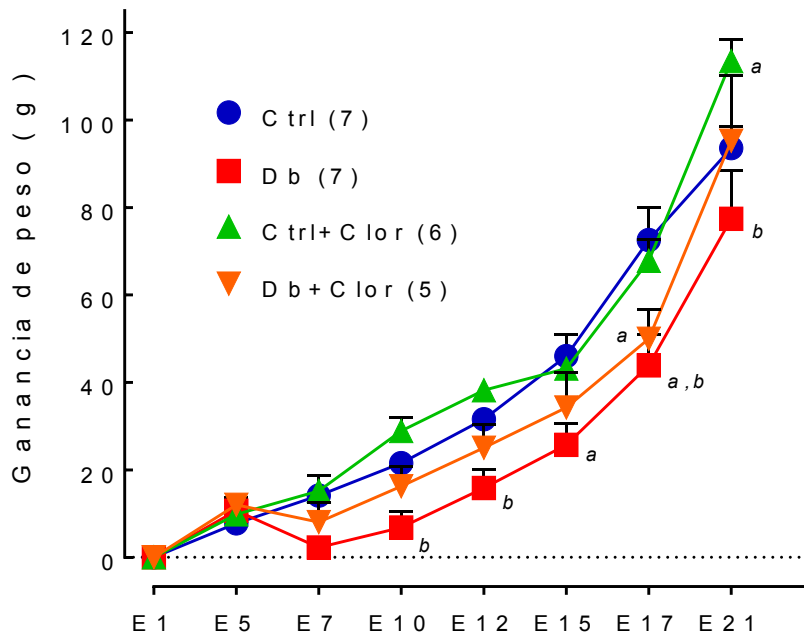
Grupo	Camadas	Crías por camada (total)	Crías vivas (total)	Crías muertas (total)
Ctrl	7	12.1 ± 1.5 (69)	12.0 ± 1.5 (68)	0.14 ± 0.14 (1)
Db	7	11.3 ± 2.0 (79)	7.4 ± 2.2 (52)	<b>3.9 ± 0.7<sup>a</sup></b> <b>(27)</b>
Ctrl + Clor	6	13.5 ± 0.7 (81)	13.3 ± 0.5 (80)	0.2 ± 0.2 (1)
Db + Clor	5	9.8 ± 2.3 (49)	8.2 ± 2.6 (41)	<b>1.6 ± 1.6<sup>b</sup></b> <b>(8)</b>

Control (Ctrl); Diabético (Db); Control + Clorfeniramina (Ctrl+Clor); Diabético + Clorfeniramina (Db+Clor). Los valores corresponden al promedio ± error estándar (s.e.m) del número total de crías indicado entre paréntesis. <sup>a</sup>*P* < 0.001 vs Ctrl; <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs Db; ANOVA de una vía y prueba DHS de Tukey.

#### 6.1.4 Ganancia de peso corporal de las ratas gestantes

El peso corporal de las hembras se registró cada 24 h a partir del E1 y hasta el E21. Para determinar la ganancia de peso por día se tomó en cuenta el peso inicial de la rata y este valor fue restado a cada uno de los pesos subsecuentes hasta el E21.

Las ratas gestantes del grupo Db presentaron una menor ganancia de peso corporal a partir del E10 y hasta el E21 con respecto a los grupos Ctrl y Ctrl+Clor. También se observó que las ratas del grupo Ctrl+Clor mostraron una mayor ganancia de peso al final de la gestación con respecto a los grupos Ctrl y Db+Clor. El grupo Db+Clor únicamente presentó una menor ganancia de peso corporal en el E17 con respecto al grupo Ctrl (Figura 4).



**Figura 4. Ganancia de peso corporal durante la gestación.** Se registró el peso corporal de las hembras gestantes por condición del E1 al E21. Control (Ctrl); Diabético (Db); Control + Clorfeniramina (Ctrl+Clor); Diabético + Clorfeniramina (Db+Clor). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  s.e.m. del número de ratas indicado. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Ctrl; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs Ctrl+Clor; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Db+Clor; ANOVA de Medidas Repetidas y prueba DHS de Tukey.

### 6.1.5 Peso corporal y cerebral de las crías

El peso cerebral y corporal de las crías en P0, fue menor en los neonatos de los grupos Db y Db+Clor con respecto a los neonatos de los grupos Ctrl y Ctrl+Clor. Los neonatos del grupo Db+Clor presentaron un peso corporal y cerebral menor con respecto al grupo Ctrl, pero mayor en relación al grupo Db (Tabla 3).

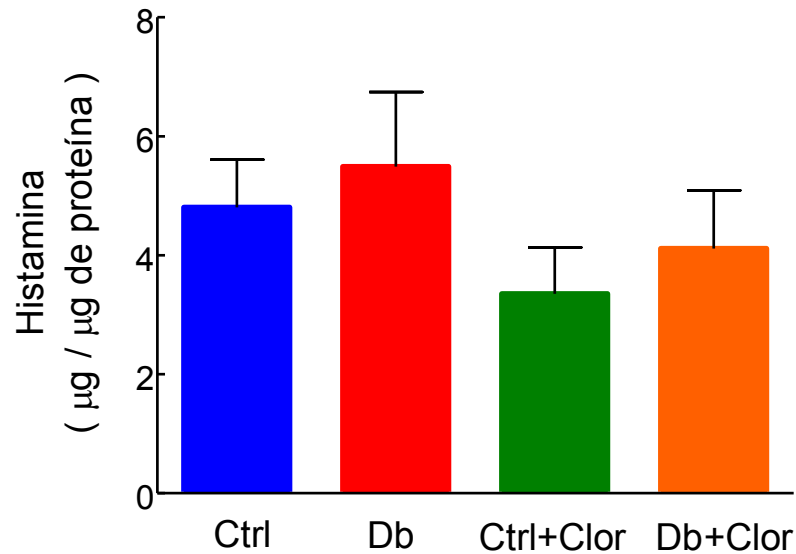
**Tabla 3. Peso cerebral y corporal de ratas neonatas (P0)**

Grupo	Camadas	Crías	Peso del cerebro (mg)	Peso corporal (g)
Ctrl	7	44	255 ± 3	6.2 ± 0.1
Db	7	32	<b>207 ± 4<sup>a,b</sup></b>	<b>5.0 ± 0.1<sup>a,b</sup></b>
Ctrl + Clor	6	31	251 ± 4	6.1 ± 0.1
Db + Clor	5	27	<b>229 ± 4<sup>a</sup></b>	<b>5.7 ± 0.1<sup>a</sup></b>

Control (Ctrl); Diabético (Db); Control + Clorfeniramina (Ctrl+Clor); Diabético + Clorfeniramina (Db+Clor). Los valores corresponden al promedio ± s.e.m. <sup>a</sup>*P* < 0.01 vs Ctrl y Ctrl+Clor; <sup>b</sup>*P* <0.01 vs Db+Clor. El análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA seguida de la prueba DHS de Tukey.

### 6.2 Niveles de HA en la corteza frontal de ratas neonatas (P0)

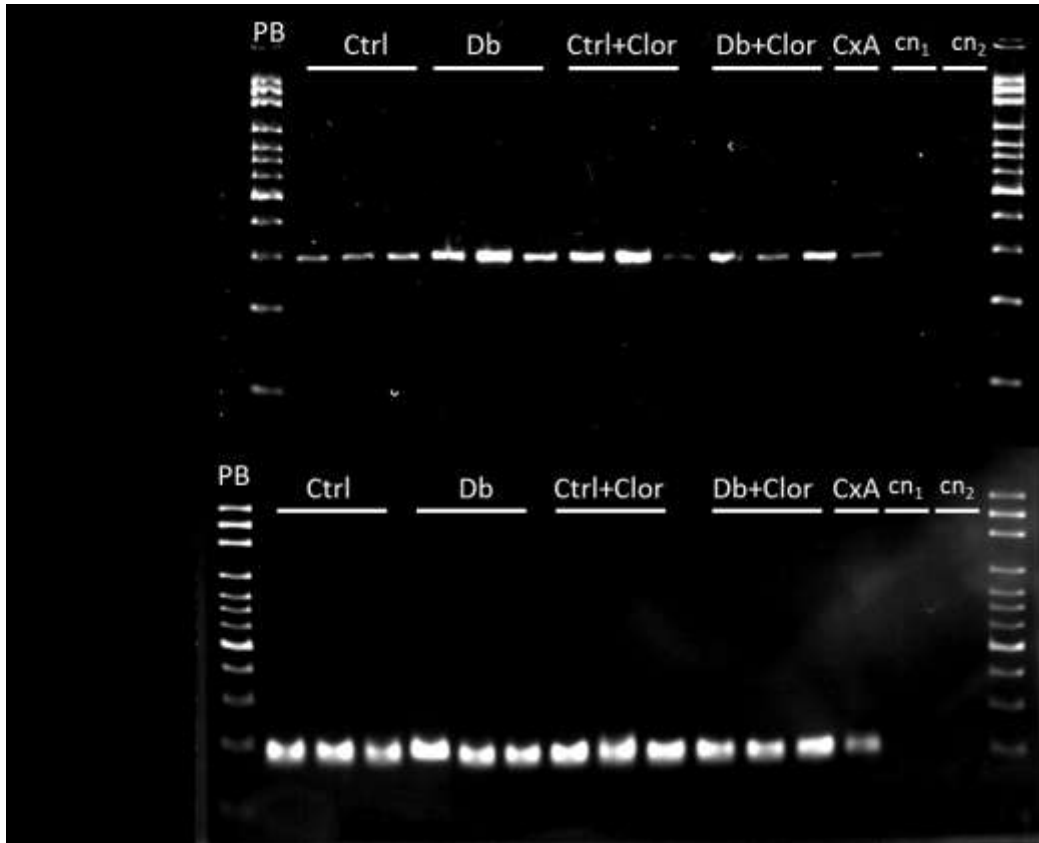
La Figura 5 muestra que los niveles de HA en la corteza frontal de las crías recién nacidas (P0) no fueron significativamente diferentes entre los cuatro grupos.



**Figura 5. Nivel de HA en la corteza frontal de las ratas neonatas (P0).** Los valores corresponden al promedio  $\pm$  s.e.m. del número de experimentos siguiente; Control (Ctrl), 5; Diabético (Db), 6; Control + Clorfeniramina (Ctrl+Clor), 8; Diabético + Clorfeniramina (Db+Clor), 7. Para cada experimento se realizaron determinaciones por triplicado. Ninguno de los valores fue estadísticamente diferente del control (ANOVA y prueba de Dunnett).

### 6.3 Expresión del RNAm del RH<sub>1</sub>

Con el propósito de analizar los posibles cambios en el nivel del RNAm del RH<sub>1</sub> en las crías en P0, se empleó inicialmente la técnica de PCR de punto final. La Figura 6 muestra la electroforesis de los productos en geles de agarosa que confirmó la amplificación de una sola banda próxima al estándar de DNA de 300 pares de bases (pb), y que corresponde al tamaño esperado (292 pb) para la amplificación específica del RNAm del RH<sub>1</sub>.

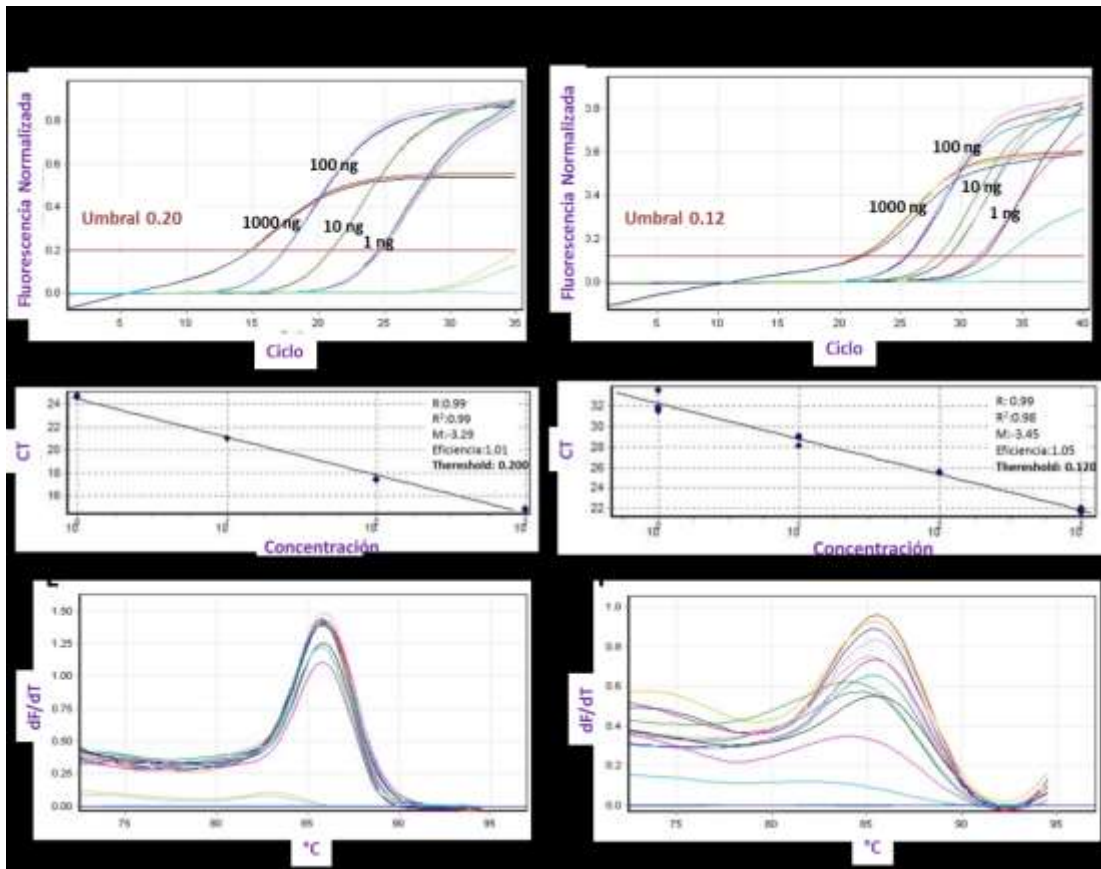


**Figura 6. Expresión del RNAm del RH<sub>1</sub> en la corteza frontal de ratas neonatas (P0).** Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa al 2%. A) Amplificación del producto esperado (292 pb) para el RH<sub>1</sub>. B) Amplificación del producto (180 pb) del gen constitutivo GAPDH. Control (Ctrl); Diabético (Db); Control + Clorfeniramina (Ctrl+Clor); Diabético + Clorfeniramina (Db+Clor); CxA, corteza cerebral de rata adulta (control positivo); cn<sub>1</sub>, control negativo con todos los componentes de la reacción excepto cDNA; cn<sub>2</sub>, control negativo con RNA; PB, marcadores estándar de DNA.

### 6.3.1 Rangos dinámicos y validación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$

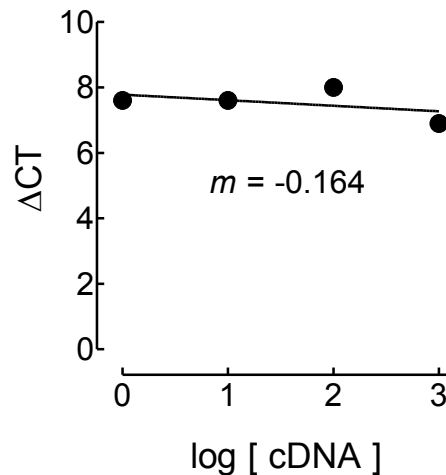
Para determinar la expresión del RNAm del RH<sub>1</sub> por PCR cuantitativa (qPCR), se establecieron los rangos dinámicos de amplificación para establecer la eficiencia, la especificidad y el umbral de fluorescencia para el análisis de qPCR. Para los rangos dinámicos de la amplificación del RNAm del RH<sub>1</sub> y de GAPDH se utilizaron 1, 10, 100 y 1000 ng de DNAc. Se obtuvo de manera automatizada la fluorescencia umbral, que para GAPDH fue 0.2 y para RH<sub>1</sub> 0.12. La eficacia de las reacciones para cada producto de

amplificación fue 1.05 para RH<sub>1</sub> y 1.01 para GAPDH, implicando una eficacia de la amplificación muy cercana al 100%. Al final de las reacciones de qPCR se realizaron curvas de fusión en las que se obtuvo un solo pico de amplificación, indicando la amplificación de un solo producto de PCR y por lo tanto una cuantificación confiable (Figura 7).



**Figura 7. Rangos dinámicos de la amplificación del RNAm de GAPDH y RH<sub>1</sub>.** Se muestran las curvas de amplificación en escala exponencial para los rangos dinámicos de GAPDH (A) y RH<sub>1</sub> (B). La línea roja representa el umbral de fluorescencia establecido en cada caso. El ciclo umbral para cada concentración de DNAc empleada es aquel en el que interceptan la línea roja y la curva de amplificación con respecto al eje de las abscisas (ciclo). Se muestran también la eficacia de la reacción para GAPDH (C) y RH<sub>1</sub> (D), y las curvas de fusión para la amplificación de GAPDH (E) y RH<sub>1</sub> (F), en las que se observa un solo pico indicando la amplificación de un solo producto de PCR.

Adicionalmente, a partir de los rangos dinámicos se validó la expresión del RNAm para RH<sub>1</sub> y GAPDH, utilizando el método reportado por Livak (1997 y 2001). Este método se basa en graficar el  $\Delta$ CT obtenido para cada producto contra la concentración de DNAc empleada en los rangos dinámicos y realizar el ajuste lineal de los valores obtenidos (Figura 8). Si el valor de la pendiente de la recta es menor a 0.1, se considera como valido el método para realizar el análisis (Livak y Schmittgen, 2001).

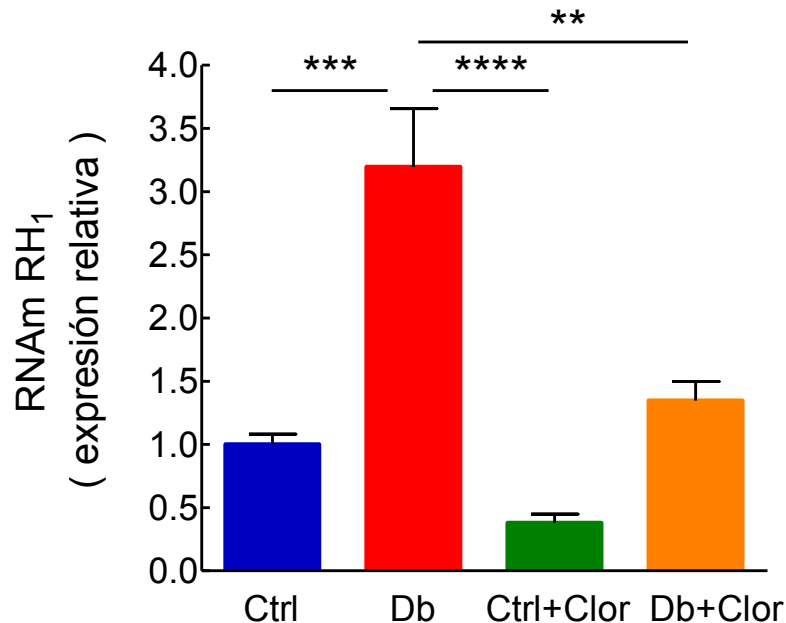


**Figura 8. Validación del método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  por el método de Livak *et al.*, 1997.** Gráfica de los valores de  $\Delta$ CT obtenidos para cada rango dinámico en relación al logaritmo de la concentración de DNAc. Los puntos corresponden a los valores de  $\Delta$ CT para cada concentración de DNAc empleada. La recta es el ajuste lineal de los puntos con pendiente ( $m$ ) < 0.1.

### 6.3.2 qRT-PCR

El análisis por qRT-PCR reveló un aumento significativo en el nivel de expresión del RNAm del RH<sub>1</sub> en el grupo Db de  $3.20 \pm 0.46$  veces en comparación con el grupo Ctrl. De manera relevante el tratamiento con clorfeniramina (Db+Clor) previno este efecto (Figura 9). Aunque se observó

una disminución del RNAm del RH<sub>1</sub> en el grupo tratado con clorfeniramina (Ctrl+Clor) con respecto al valor control, este efecto no fue estadísticamente significativo (Figura 9).



**Figura 9. Efecto de la diabetes gestacional y el tratamiento con clorfeniramina en el nivel de expresión del RNAm del RH<sub>1</sub> en ratas neonatas (P0).** Los valores se expresan en relación a la expresión control (1) y son el promedio  $\pm$  s.e.m. del siguiente número de experimentos: Ctrl, 5; Db, 5; Ctrl+Clor, 4; Db+Clor, 4.  $**P < 0.001$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ ; ANOVA de una vía y prueba DHS de Tukey. Para cada experimento se realizaron determinaciones por triplicado.

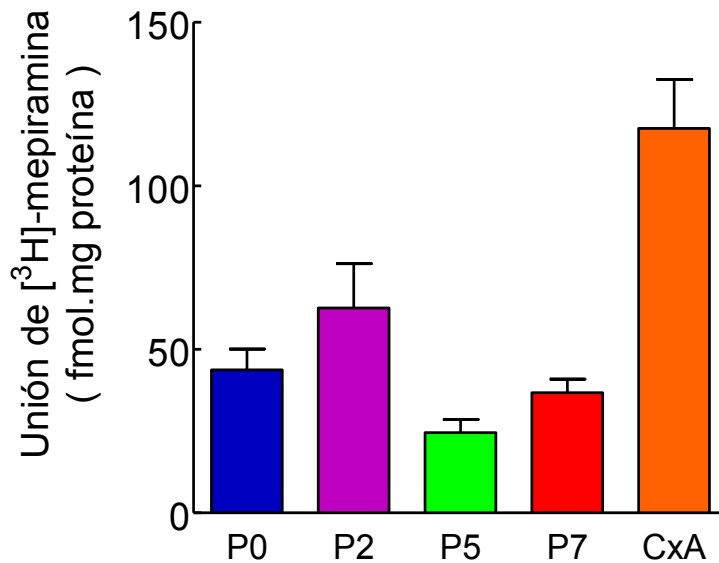
#### 6.4 Ensayos de unión para el RH<sub>1</sub>

Para determinar la densidad membranal del RH<sub>1</sub> en la corteza frontal de los neonatos control se realizaron ensayos de unión con el radioligando marcado [<sup>3</sup>H]-mepiramina utilizando membranas totales.

Inicialmente se determinó la densidad de receptores en diferentes edades postnatales, y los ensayos mostraron la presencia del RH<sub>1</sub> en la corteza frontal de las crías P0, P2, P5 y P7 con una unión específica de  $44 \pm 6$ ,  $63 \pm$

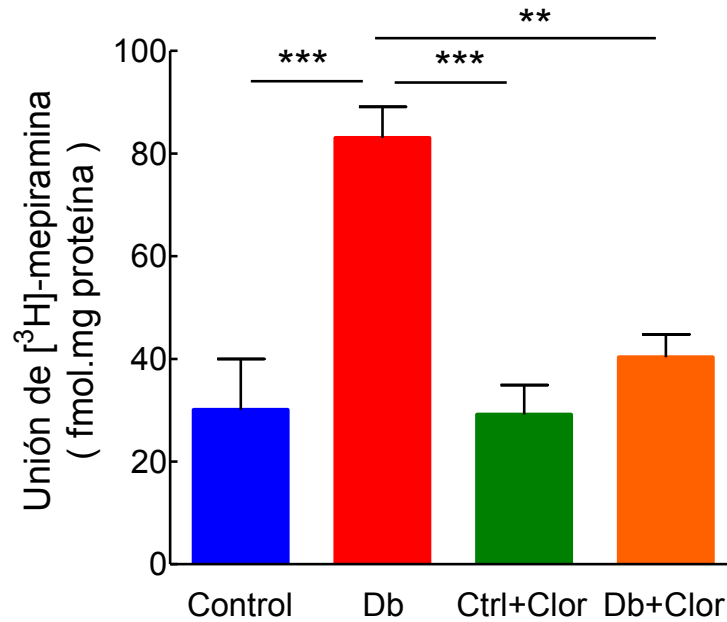


14,  $24 \pm 4$  y  $37 \pm 4$  fmol/mg proteína, respectivamente, mientras que en la corteza frontal de ratas adultas, usada como control positivo, se obtuvo una densidad de  $118 \pm 15$  fmol/mg proteína (Figura 10).



**Figura 10. Unión específica de [<sup>3</sup>H]-mepiramina en membranas de la corteza frontal.** Se muestra la densidad de receptores en el tejido de ratas neonatas (P0, P2, P5 y P7). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  s.e.m. del siguiente número de experimentos: P0, 6; P2, 5; P5, 4; P7, 4; corteza cerebral de rata adulta (CxA), 4. Para cada experimento se realizaron determinaciones por triplicado.

En los grupos experimentales, la unión específica de [<sup>3</sup>H]-mepiramina a las membranas totales obtenidas de la corteza frontal de los neonatos P0, mostró un aumento significativo en la densidad del RH<sub>1</sub> en el grupo Db ( $85 \pm 6$  fmol·mg proteína) en comparación con el grupo Ctrl ( $30 \pm 10$  fmol·mg proteína) como se ilustra en la Figura 11. El tratamiento con clorfeniramina (Ctrl+Clor) no afectó la densidad del receptor, pero previno el aumento observado en el grupo diabético (ver Figura 11).



**Figura 11. Efecto de la diabetes gestacional y el tratamiento con clorfeniramina en la unión específica de [<sup>3</sup>H]-mepiramina en membranas de la corteza frontal de ratas neonatas (P0).** La unión del radioligando se expresa como fmol·mg proteína y los valores corresponden al promedio  $\pm$  s.e.m. del siguiente número de experimentos: Control (Ctrl), 7; Diabético (Db), 5; Control + Clorfeniramina (Ctrl+Clor), 7; Diabético + Clorfeniramina (Db+Clor), 7. Para cada experimento se realizaron determinaciones por triplicado.  $**P < 0.001$  y  $***P < 0.0001$ ; ANOVA de una vía y prueba DHS de Tukey.

## 7. Discusión

La diabetes gestacional es un problema de salud pública. De acuerdo a la la Federación Internacional de Diabetes (IDF, *International Diabetes Federation*), en el 2015 se reportaron 20.9 millones de recién nacidos vivos productos de mujeres embarazadas que presentaron algún tipo de hiperglucemia durante la gestación, cifra que representa el 16.2% del total de nacimientos en el mundo.

Entre las alteraciones que sufren los hijos de madres diabéticas destacan la obesidad, la intolerancia a la glucosa y la diabetes tipo 2. En el área cognitiva los hijos de madres diabéticas pueden presentar alteraciones psicomotoras y en varios tipos de memoria como las de trabajo, de referencia y espacial (Ornoy *et al.*, 1999; Bolaños *et al.*, 2015). La permanencia de algunas de estas alteraciones en la vida adulta condujo a la idea de “programación intrauterina” de algunas enfermedades con la participación predominante de factores ambientales, más que genéticos (Polanco *et al.*, 2005).

### **Modelo de diabetes gestacional en la rata**

En el presente trabajo se desarrolló un modelo de diabetes durante la gestación en la rata administrando una sola dosis de STZ (50 mg/kg; ip) en el día E5. En este modelo se establecieron las características generales que corresponden a algunos de los modelos animales de este tipo: 1) hiperglucemia materna y en las crías; 2) menor ganancia de peso de la hembra gestante (E10-E21); 3) aumento en la mortalidad intrauterina de las crías; y 4) un menor peso cerebral y corporal de las crías vivas (Kiss *et al.*, 2009; Damasceno *et al.*, 2013; Salazar *et al.*, 2015).

Una dosis de 50 mg/kg de STZ antes o después de la cópula genera una hiperglucemia exacerbada durante la gestación que influye en el desarrollo embrionario y en el periodo post-natal de las crías. Algunos autores sugieren que la inducción de diabetes entre E0 y E5 permite generar un modelo que

reproduce algunas características de la diabetes gestacional del humano como la hiperglucemia, el aumento de peso, el riesgo de aborto y la muerte intrauterina (Damasceno *et al.*, 2013).

Kiss y cols. (2009) utilizaron un modelo de diabetes pre-gestacional inducido con STZ (40 mg/kg, ip) y reportaron que al final de la gestación, las ratas diabéticas presentaron una menor ganancia de peso, aunque el consumo de alimento durante la gestación fue mayor en comparación con el grupo control. En nuestro modelo la inducción de diabetes con STZ (50 mg/kg, ip) se realizó en el E5, comprendido en el periodo de pre-implantación, y aunque la ganancia de peso disminuyó en el periodo E10-E17, en E21 alcanzaron un peso similar al del grupo control. Estos resultados concuerdan con los reportados por Salazar y cols. (2015), quienes también realizaron la inducción de diabetes con STZ (50 mg/kg) en E5, y observaron una disminución en el peso de las hembras en E15 así como un peso similar al del grupo control al final de la gestación.

En diferentes modelos de diabetes gestacional inducida con STZ se ha reportado que la ganancia de peso en ratas diabéticas es menor con respecto a las ratas gestantes no diabéticas. Se ha sugerido que el bajo peso es consecuencia de alteraciones metabólicas causadas por la hiperglucemia e hipoinsulinemia, así como del aumento en el número de reabsorciones y muertes intrauterinas que son comunes en esta clase de modelos (Volpato *et al.*, 2008; Kiss *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 2015). Caluwaerts y cols. 2003 probaron diferentes dosis de STZ en el modelo de diabetes gestacional, administrando 30, 35, 40 o 50 mg/kg de STZ (ip) en E1, reportando que únicamente en los grupos de 35 y 50 mg/kg se presentó una reducción en la ganancia de peso durante la gestación y que los fetos de 20 días del grupo de 50 mg/kg mostraron hiperglucemia al nacimiento.

En nuestro estudio obtuvimos un índice de mortalidad de  $34.5 \pm 6.2\%$  en los productos de madres diabéticas en P0, que concuerda con lo reportado por

Salazar y cols. (2015), así como la presencia de hiperglucemia en P0. De manera relevante, los productos de las ratas diabéticas tratadas con clorfeniramina mostraron una mayor sobrevivencia y un menor grado de hiperglucemia al nacimiento en relación a las crías del grupo diabético. En un estudio realizado por Anvari y cols. (2015), se propuso que el tratamiento durante una semana con cetirizina, un antagonista del RH<sub>1</sub> (25 mg/kg), tiene un efecto protector contra la hiperglucemia inducida por una dieta alta en grasas en un modelo de ratón. Los autores señalan que la inhibición farmacológica del RH<sub>1</sub> que se expresa en las células del islote pancreático puede genera un mejor control metabólico.

Las glucemias en las ratas gestantes durante el tratamiento con clorfeniramina (E12-E14), no fueron registradas y el nivel de glucosa al final de la gestación no mostró una disminución en las ratas gestantes; sin embargo, el efecto observado en sus productos es evidente, lo que sugiere una mejoría metabólica promovida por el antagonista del RH<sub>1</sub> con repercusiones postnatales que no han sido reportadas.

### **Efecto de la diabetes gestacional en el nivel de histamina y la expresión del RH<sub>1</sub>**

El propósito principal de este trabajo fue determinar el efecto de la diabetes gestacional en el nivel de histamina y la expresión del RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral frontal de los productos en el día post-natal 0 (P0).

Como primer objetivo particular se planteó cuantificar el nivel de HA en la corteza frontal de los productos en P0, ya que como se describió con anterioridad los embriones E14 de ratas diabéticas presentan un aumento anormal en la concentración de HA en el neuroepitelio cortical en comparación con el grupo control y este evento coincide con el pico neurogénico. Al nacimiento el RNAm de la HDC se expresa tanto en las neuronas histaminérgicas del núcleo TM como en los mastocitos presentes en la fisura coroidea, y estos últimos contribuyen al nivel de HA a partir de

E18 y al pico de la amina que se produce en P5. La expresión de la HDC en los mastocitos disminuye a partir de P2 y desaparece después de P5 (Kahlson *et al.*, 1960; Auvinen y Panula, 1988; Panula *et al.*, 1989; Lambratch-Hall *et al.*, 1990). En este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el nivel de HA en el grupo diabético en comparación con los demás grupos en P0. Sin embargo, se desconoce si los niveles de HA pudieran presentar alteraciones en edades subsecuentes como P5, cuando se genera el primer pico post-natal de HA, por lo que sería importante evaluar el nivel de HA en esta edad.

Como segundo objetivo particular de esta tesis se planteó cuantificar la expresión del receptor RH<sub>1</sub> en la corteza frontal de los productos (P0) de ratas control y diabéticas, ya que como se describió en la introducción, los embriones E12 de ratas diabéticas presentan un aumento en la expresión del RH<sub>1</sub> tanto a nivel de proteína como a nivel de RNAm en el neuroepitelio cortical que coincide con el inicio de la formación de las capas profundas (V y VI) de la corteza cerebral, además de presentar un aumento en la diferenciación neuronal (Fu *et al.*, 2006).

Utilizando la técnica de hibridación *in situ* Lintunen y cols. (1998) reportaron que en la rata neonata a partir de P0 se puede detectar la presencia del RNAm del RH<sub>1</sub> en las capas V y VI de la corteza cerebral. Mediante qRT-PCR y ensayos de unión con el radioligando [<sup>3</sup>H]-mepiramina, nosotros encontramos que el RNAm y la proteína de RH<sub>1</sub> se encuentran aumentados en la corteza frontal de las crías diabéticas en comparación con las del grupo control.

Entre los mecanismos que regulan la expresión del RH<sub>1</sub> está el aumento en las especies reactivas de oxígeno (Weksler-Zangen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2013). En células cancerosas las especies reactivas de oxígeno incrementan la expresión de la proteína activadora de factores de transcripción (AP-1) y de la proteína C-ets-1 (Ets-1), las cuales se unen a uno de los sitios

promotores del gen del RH<sub>1</sub> (Verschoor *et al.*, 2010; Mizuguchi *et al.*, 2012). También se ha reportado que la hiperglucemia aumenta la unión de AP-1 al ADN en células de riñón (Wilmer y Cosio, 1998; Deng, *et al.*, 2014) y que la expresión de AP-1 se encuentra aumentada en biopsias placentarias de mujeres con diabetes gestacional (Radaelli *et al.* 2003). En nuestro estudio las crías del grupo diabético presentaron hiperglucemia severa en P0 (>200 mg/dL), por lo que en la corteza cerebral del neonato diabético el ambiente hiperglucémico podría aumentar la expresión y/o la activación de AP-1 y promover la transcripción del RH<sub>1</sub>.

Otro mecanismo de regulación de la expresión del RH<sub>1</sub> es el descrito por Das y cols. (2007), quienes en un estudio *in vitro* observaron que la HA aumenta la actividad del promotor del gen del RH<sub>1</sub> conduciendo a niveles aumentados del RNAm del receptor, eventos prevenidos por la clorfeniramina, un antagonista selectivo del RH<sub>1</sub>.

En esta tesis la administración de clorfeniramina durante la fase de neurogénesis de las capas profundas de la corteza cerebral previno el aumento en la expresión del RH<sub>1</sub> en P0, y en un estudio reciente de nuestro laboratorio se encontró que el tratamiento con clorfeniramina revierte el aumento en la neurogénesis observada en los embriones E14 de ratas diabéticas (datos no publicados). Lo anterior sugiere que el efecto de la diabetes materna en las capas profundas de la corteza cerebral se conserva en la vida postnatal y que probablemente el mayor número de neuronas se refleja en una mayor expresión del RH<sub>1</sub>. Esta hipótesis será analizada en estudios posteriores.

Los ensayos de unión del radioligando [<sup>3</sup>H]-mepiramina mostraron que el RH<sub>1</sub> se expresa en las membranas celulares de la corteza frontal de animales control en P2, P5 y P7, además de P0. Aunque en estas edades se presenta una menor densidad del RH<sub>1</sub> en comparación con la observada en la corteza frontal de la rata adulta, por medio de estos ensayos fue posible determinar

su expresión. Se había reportado una muy baja expresión del RNAm del RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral en P0, pero no se había reportado la presencia del RH<sub>1</sub> a nivel de proteína en esta estructura, por lo que será importante emplear otra técnica como la inmunodetección (Western Blot) para confirmar este hallazgo.

El correcto desarrollo de las estructuras que componen al SNC depende de la sincronía de múltiples procesos celulares, que en gran medida son dirigidos por factores ambientales. La unión específica del radioligando en preparaciones membranales de la corteza frontal de la rata (P0) sugiere que el RH<sub>1</sub> es funcional; sin embargo, se desconoce aún la función de la HA y del RH<sub>1</sub> en el desarrollo post-natal de la citoarquitectura cortical y cuáles serían las consecuencias funcionales del aumento de la expresión del receptor. Adicionalmente, se desconoce si la localización laminar del RH<sub>1</sub> coincide con la reportada para la corteza cerebral del adulto (capas intermedias III y IV), por lo que es necesario continuar la evaluación post-natal del modelo diabético.



## 8. Conclusiones

1. Se reprodujo el modelo de diabetes materna en la rata, usando una sola dosis de STZ en el día 5 de gestación.
2. La diabetes materna no modificó los niveles de histamina en la corteza cerebral frontal de las ratas neonatas (día P0).
3. La diabetes materna aumenta la expresión del RNAm del RH<sub>1</sub> y la densidad del receptor en la corteza frontal de las ratas neonatas (P0).
4. El aumento en la expresión del RH<sub>1</sub> en la corteza frontal de las ratas neonatas (P0) de madres diabéticas fue prevenido por el bloqueo farmacológico del receptor durante el periodo de formación de las capas profundas V y VI (E12-E14).

## **9. Perspectivas**

1. Corroborar por inmunodetección (Western Blot), la expresión del RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral frontal de las ratas neonatas (P0) de madres control y diabéticas.
2. Determinar la co-localización del RH<sub>1</sub> con el marcador de capas profundas FOXP2 en la corteza frontal de las ratas neonatas (P0) de madres control y diabéticas.
3. Determinar el efecto de la diabetes materna en el nivel de histamina y la expresión del RH<sub>1</sub> en la corteza frontal de los neonatos en el día post-natal 5 (P5).
4. Determinar si existen cambios anatómicos y funcionales en la inervación post-natal de las capas profundas de la corteza frontal de las ratas neonatas (P0) de madres control y diabéticas.

## 10. Referencias

- Anvari, E., Wang, X., Sandler, S., Welsh, N. (2015). The H1-receptor antagonist cetirizine ameliorates high-fat diet-induced glucose intolerance in male C57BL/6 mice, but not diabetes outcome in female non-obese diabetic (NOD) mice. *Ups J Med Sci*, 120:40-46.
- Ambrée, O., Buschert, J., Zhang, W., Arolt, V., Dere, E., Zlomuzica, A. (2014). Impaired spatial learning and reduced adult hippocampal neurogenesis in histamine H<sub>1</sub> receptor knockout mice. *Eur Neuropsychopharm*, 24: 1394-1404.
- Arrang, JM., Drutel, G., Garbag, M., Ruat, M., Traiffort, E., Schwartz, JC. (1995). Molecular and functional diversity of histamine receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci*, 10:314-323.
- Auvinen, S., Panula, P. (1988). Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain. *J Comp Neurol*, 276:289-303.
- Bolaños., L., Matute, E., Ramírez-Dueñas, M., Zarabozo. (2015). Neuropsychological impairment in school-aged children born to mothers with gestational diabetes. *J Child Neurol*, 3:1616-1624.
- Caluwaerts, S., Holemans, K., van Bree, R., Verhaeghe, J., Van Asshe, A. (2003). Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational diabetes mellitus? *J Soc Gynecol Investig*, 10: 216-221.
- Camprubi, M., Campoy, C., Garcia, L., Lopez, JM., Rueda, R., Martin, MJ. (2015). Maternal diabetes and cognitive performance in the offspring: a systematic review and meta-analysis. *Plos One*, 13:1-16.
- Clausen, T., Mortensen, E., Schmidt, L., Mathiesen, E., Hansen, T., Jensen, D., Damm, P. (2013). Cognitive function in adult offspring of women with gestational diabetes-the role of glucose and other factors. *Plos One*, 8:e67107.
- Chen, Y., Fan, JX., Zhang, ZL., Wang, G., Cheng, X., Chuai, M., Lee, KK., Yang, X. (2013). The negative influence of high-glucose ambience on neurogenesis in developing quail embryos. *Plos One*, 8:e66646.

- Dai, H., Kaneko, K., Fato, H., Fujii, S., Jing, Y., Xu, A., Saurai, E., ato, M., Okamura, N., Kuramasu, A., Yanai, K. (2007). Selective cognitive dysfunction in mice lacking histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors. *Neurosci Res*, 57:306-313.
- Damasceno, D., Sinzato, Y., Bueno, A., Netto, A., Dallaqua, B., Gallego, F., Iessi, I., Corvino, S., Serrano, R., Marini, G., Piculo, F., Calderon, I., Rudge, M. (2013). Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *J Diabetes Res*, 2013:1-9.
- Das, A., Yoshimura, S., Mishima, R., Fujimoto, K., Mizuguchi, H., Dev, S., Wakayama, Y., Kitamura, Y., Horio, S., Takeda, N., Fukui, H. (2007) Stimulation of histamine H<sub>1</sub> receptor up-regulates histamine H<sub>1</sub> receptor itself through activation of receptor gene transcription. *J Pharmacol Sci*, 103:374-382.
- Deng, Y., Lan, T., Huang, J., Huang, H. (2014). Sphingosine kinase-1/sphingosine 1-phosphate pathway in diabetic nephropathy. *Chin Med J*, 127:3004-3010.
- Enard, W., Przeworski, M., Fisher, SE., Lai Cs., Wiebe, V., Kitano, T., Monaco AP. y Pääbo, S. (2002). Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and lenguaje. *Nature*, 418:869-872.
- Ferland, R., Cherry, P., Morrisey, E. y Walsh, C. (2003). Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *J Comp Neurol*, 460:266-279.
- Fu, J., Tay, S., Ling, E., Dheen, S. (2006). High glucose alters the expression of genes involved in proliferation and cell fate specification of embryonic neural stem cells. *Diabetologia*, 49:1027-1038.
- Font-López, K., Cejudo-Carranza, E., López-Caucana, A., Peralta-Pedrero, M., Díaz-Velásquez, M., Puello-Tamara., E., Torres-Ramírez, A. (2010). Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 48:673-648.
- García-Carrapato M. (2003). The offspring of gestational diabetes. *J Perinat Med*, 31:5-11.
- García-Gálvez, AM y Arias-Montaño, JA. (2016). Isoformas del receptor a histamina H<sub>3</sub> humano: generación, expresión en el sistema nervioso central (SNC) e implicaciones funcionales. *Gac Med Mex*, 152:94-102.

- Gaspard, N., Bouschet, T., Hourez, R., Dimidschstein, J., Naeije, G., van den Aemele., Espuny-Camacho, I., Herpoel, A., Passante, L., Schiffmann, S., Gaillard, A., Vanderhaeghen, P. (2008). An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature*, 445:351-357.
- Haas, H.L., Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 4:121-130.
- Haas, H.L., Sergeeva, O.A., Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiol Rev*, 88:1183-1241.
- International Diabetes Federation Atlas (2015). Seventh edition. Online version. p26.
- Jawerbaum, A., y White, V. (2010). Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocr Rev*, 31:680-701.
- Jin, C., Panula, P. (2005). The laminar histamine receptor system in human prefrontal cortex suggest multiple levels of histaminergic regulation. *Neuroscience*, 132:137-149.
- Kahlson, G., Rosengren, E., White T. (1960) The formation of histamine in the rat foetus. *J Physiol*, 151:131-138.
- Kinnunen, A., Lintunen, M., Karlstedt, K., Funkui, H., Panula, P. (1998). In situ detection of H<sub>1</sub>-receptor mRNA and absence of apoptosis in the transient histamine system of the embryonic rat brain. *J Comp Neurol*, 394:127-137.
- Kiss, A., Lima, P., Sinzato, Y., Takaku, M., Takeno, M., Rudge, M., Damasceno, D. (2009). Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr*, 1:1-7.
- Kubista, M., Andrade, J., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27:95-125.
- Lambracht-Hall, M., Dimitriadou, V., Theoharis, C., T. (1990). Migration of mast cells in the developing rat brain. *Dev Brain Res*, 56:151-159.
- Liao, D., Ng, Y., Tay, S., Ling, E., Dheen, S. (2004). Altered gene expression with abnormal patterning of the telencephalon in embryos of diabetic Albino Swiss mice. *Diabetologia*, 47:523-531.

- Lintunen, M., Sallmen, T., Karlstedt, K., Fukui, H., Ericksson, K., Panula, P. (1998). Postnatal expression of H<sub>1</sub>-receptor mRNA in the rat brain: correlation to L-histidine decarboxylase expression and local upregulation in limbic seizures. *Eur Jour Neurosci*, 10:2287-2301.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25:402-408.
- López-Soldado, I. y Herrera, E. (2003). Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Experimental Diab Res*, 4:107-118.
- Marcondes, F., Bianchi, F. y Tanno, A. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*, 62:609-614.
- Molina-Hernández, A., Velasco, I. (2008). Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors. *J Neurochem*, 106:706-717.
- Molina-Hernández, A., Díaz, N. F., Arias-Montaña, J.A. (2012). Histamine in brain development. *J Neurochem*, 125:872-882.
- Molina-Hernández, A., Martínez-Rodríguez G., Escobedo-Ávila I., Velasco, I. (2013). Histamina up-regulates fibroblast growth factor receptor 1 and increases FOXP2 neurons in cultured neural precursors by histamine type 1 receptor activation: conceivable role of histamine in neurogenesis during cortical development. *Neural Dev*, 8:1-14.
- Mizuguchi, H., Miyagi, K., Terao, T., Sakamoto, N., Yamawaki, Y., Adachi, T., Ono, S., Sasaki, Y., Yoshimura, Y., Kitamura, Y., Takeda, N., Fukui, H. (2012). PMA-induced dissociation of Ku86 from the promoter causes transcriptional up-regulation of histamine H<sub>1</sub> receptor. *Sci Rep*, 2:1-11
- Naranjo, P., Naranjo, E. (1968). Embryotoxic effects of antihistamines. *Arzneimittelforschung*, 18:188-195.
- National Toxicology Report. (1986). Toxicology and carcinogenesis studies of chlorpheniramine maleate (CAS No. 113-92-8) I F344/N rats and B6C3F1 mice (Gavage studies). National Toxicology Program, Technical Report Series. National Institutes of Health. 1-59.

- Ornoy, A., Wolf, A., Ratzon, A., Greenbaum, C., Dulizky, M. (1999). Neurodevelopmental outcome at early school age of children born to mothers with gestational diabetes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 81:F10-F14.
- Panula, P., Pirvola, U., Auvinen, S., Airaksinen, M. (1989). Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience*, 28:585-610.
- Panula, P., Sundvik, M., Karlstedt, K. (2014). Developmental roles of brain histamine. *Trends Neurosci*, 37:159-168.
- Polanco, AC., Revilla, MC., Palomino, MA., Islas, S. (2005). Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas. *Ginecol Obstet Mex*, 73:544-52.
- Pollard, J., Moreau, J., Arrang, JM., Schwartz, JC. (1993). A detailed autoradiographic mapping of histamine H<sub>3</sub> receptors in rat brain areas. *Neuroscience*, 52:169-189.
- Radaelli, T., Varastehpour, A., Catalano, P., Hauguel-de Mouzon, S. (2003). Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes*, 52:2951-2958.
- Rodríguez-Martínez, G., Velasco, I., García-López, G., Solís, K.H., Flores-Herrera, H., Díaz, N.F., Molina-Hernández, A. (2012). Histamine is required during neural stem cell proliferation to increase neuron differentiation. *Neuroscience*, 216:10-17.
- Ryu, J., Kazuhiko, Yanai, K., Kim, CY., Watanabe, T. (1995). Ontogenetic development of histamine receptor subtypes in rat brain demonstrated by quantitative autoradiography. *Dev Brain Res*, 87:101-110.
- Sadek, B., Saad, A., Sadeq, A., Jalal, F., Stark, H. (2016). Histamine H<sub>3</sub> receptor as a potential target for cognitive symptoms in neuropsychiatric diseases. *Behav Brain Res*, 312:415-430.
- Salazar, M., Reyes, E., Revilla, M., Villavicencio, L., Reyes, A., Sánchez-Gómez, C. (2015) Importance of maternal diabetes on the chronological deregulation of the intrauterine development: an experimental study in rat. *J Diabetes Res*, 2015:1-11.

- Shu, W., Cho, JY., Jiang, Y., Zhang, M., Weisz, D., Elder, GA., Schmeidler, J., De Gasperi, R., Sora, MA., Rabidou, D., Santucci, AC., Perl, D., Morrissey, E., Buxbaum JD. (2005). Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the *Foxp2* gene. *Proc Natl Acad Sci*, 102:9643-9648.
- Siegel, G.J. (2006). Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. EU Elsevier; pp. 249-266.
- Silverman, B., Rizzo, T., Cho, N., Metzger, B.(1998) Long-term effects of the intrauterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. *Diabetes Care* (Suppl 2): B142-B149.
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150:76-85.
- Solís González, KH. (2015). Diferencias ontogénicas del sistema histaminérgico central en embriones de ratas sanas y diabéticas. Tesis (Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular). México DF, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, 91 pp.
- Steculorum, S., Bouret, S. (2011) Maternal diabetes compromises the organization of hypothalamic feeding circuits and impairs leptin sensitivity in offspring. *Endocrinology*, 152:4172-4179.
- Tabarean, I. (2016). Histamine receptor signaling in energy homeostasis. *Neuropharmacology*, 106:13-19.
- Vanhala, A., Yamatodani, A., Panula, P. (1994). Distribution of histamine, 5-hydroxytryptamine and tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons and nerve fibers in developing rat brain. *J Comp Neurol*, 347:101-114.
- Verschuur, ML., Wilson, LA., Singh, G. (2010). Mechanisms associated with mitochondrial-generated reactive oxygen species in cancer. *Can J Physiol Pharmacol*, 88:204-219.
- Volpato, G., Damasceno, D., Rudge, M., Padovani, C., Calderon, I. (2008). Effect of *Bauhinia forficata aqueus* extracto in the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 116:131-137.



- Wada, H., Inagaki, N., Yamatodani, A., Watanabe, T. (1991). Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity? *Trends Neurosci*, 14:415-418.
- Wallace, J. y Lauder, J. (1983). Development of the serotonergic systems in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res Bull*, 10:459-479.
- Weksler-Zangen, S., Yaffe, P., Ornoy, A. (2003). Reduced SOD activity and increased neural tube defects in embryos of the sensitive but not of the resistant Cohen diabetic rats cultured under diabetic conditions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 67:429-437.
- Wilmer, WA., Cosio, FG. (1998). DNA binding of activator protein-1 is increased in human mesangial cells cultured in high glucose concentrations. *Kidney Int*, 53:1172-1181.