



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Alteraciones durante el desarrollo embrionario de la rata afectan  
la citoarquitectura y la función cortical post-natal:  
Efecto de la diabetes materna y del antagonismo  
de los receptores a histamina H<sub>1</sub>**

TESIS

Que presenta:

**M. en C. Rocío Valle Bautista**

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias**

**En la especialidad de Neurobiología Celular y Molecular**

Directores de la Tesis

**Dr. José Antonio Arias Montaña**

**Dra. Anayansi Molina Hernández**

**Ciudad de México**

**Mayo, 2021**

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación y de Estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-Zacatenco).

Al Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias.

Al Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes” (INPer).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de estudios de Doctorado (Becario No. 576845).

A mis tutores la Dra. Anayansi Molina Hernández y el Dr. José Antonio Arias Montaña, por formarme como investigadora y darme un espacio en sus respectivos laboratorios. Por el tiempo y la dedicación al desarrollo de los proyectos de investigación aquí presentados y por ser un ejemplo de personas que se dedican a la investigación y hacen de la ciencia un mejor lugar. Por sus enseñanzas, apoyo y cariño.

A mi sínodo la Dra. Carmen Vivar, el Dr. Fabián Díaz, el Dr. Gerardo Contreras y el Dr. Emilio J. Galván, quienes durante cinco años supervisaron el desarrollo de los proyectos de investigación aquí presentados, y dedicaron su tiempo a la lectura y revisión de esta tesis.

A mis amigos y compañeros de los Laboratorios de Células Troncales y Biología del Desarrollo (INPer), 37 (CINVESTAV-Zacatenco) y 9 (CINVESTAV-Sur), quienes me acompañaron académica y emocionalmente. Agradezco especialmente a Ernesto Griego y a Gabriel Herrera por la enseñanza y el apoyo recibidos para realizar los experimentos de electrofisiología.

Al Dr. Juan Escamilla y a Raúl Pantoja por su apoyo técnico en los experimentos realizados en el laboratorio 37 del CINVESTAV.

A la MVZ. Sughei Correa Villalpando y a la MVZ. Talía Estrada Rojas, del Bioterio del INPer, por su apoyo técnico en la producción y cuidado de animales de laboratorio.

## Dedicatorias

A mis padres Vicente Valle Torres y Lidia Bautista Rivera por educarme con amor, disciplina y esfuerzo. Gracias por todo su amor.

A Magdalena Bautista “Malena” por ser la primera persona en el mundo que confió en mí y me dio todo el amor y el cariño que puede dársele a una pequeña hermana.

A Berenice Márquez, por la ayuda en los experimentos, por las charlas interminables en el laboratorio, por ser maestra, amiga y confidente. Por ser un ejemplo de mujer fuerte y gentil. Gracias por seguir compartiendo tú camino para alcanzar sueños. Te quiero Bere.

A Isabel Romero, por sumergirme en el mundo del café y la fantasía, por las tardes de té en casa Tassel, por separarnos en el norte y reencontrarnos en el sur, por las mil y una historias compartidas y los paseos interminables, por todo tu amor y confianza, y porque sé que siempre nos tendremos la una a la otra, te quiero infinitamente.

A Ramón Letipichia por ser mi amor y mi esperanza, porque cuando se congeló mi corazón me prestaste tus brazos para refugiarme, por estar siempre para mí, y porque logramos construir un hogar y una familia. Te amo Taro.

A Luis, Paulina e Iván por todas las veces que fuimos por alitas y cerveza, por dar lo mejor de ustedes como investigadores y sobre todo como personas, por organizar el taller de docencia de las ciencias, en el que pudimos ver más allá de lo que hacemos en el laboratorio. Los quiero amigos.

A Liliana Cortés por ser una luz en la oscuridad y ayudarme a construir un lugar seguro al que siempre puedo retornar.

# Índice

Abreviaturas.....	1
1. Introducción general .....	3
1.1 Corticogénesis.....	3
Capítulo 1. Efecto de la diabetes materna en la citoarquitectura y función cortical postnatal de la rata.....	11
Resumen.....	11
Abstract.....	12
1. Introducción.....	13
1.1 Diabetes Mellitus gestacional .....	13
1.2 Modelos animales de diabetes materna.....	14
1.3 Diabetes gestacional y desarrollo del sistema nervioso central. ....	15
2. Justificación .....	17
3. Objetivos .....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos particulares .....	18
4. Métodos .....	19
4.1. Animales .....	19
4.2. Extracción de RNA total y RT-qPCR .....	20
4.3. Inmunofluorescencia.....	22
4.4. Western Blot .....	23
4.5. Tinción histológica de Golgi-Cox.....	25
4.5.1 Reconstrucción del árbol dendrítico y análisis.....	26
4.5.2 Análisis de Sholl .....	26
4.5.3 Índice de complejidad del árbol dendrítico (ICAD) .....	27
4.5.4 Orientación de la dendrita apical .....	27
4.6. Registros electrofisiológicos .....	27
4.7. Ensayo de unión de [ <sup>3</sup> H]-mepiramina .....	29
4.8. Determinación del contenido de histamina .....	29
5. Resultados .....	31
5.1 Efecto de la diabetes materna en la expresión y localización de los marcadores SATB2, FOXP2 y TBR1 de la CxM1 en neonatos P0.....	31
5.2. Efecto a largo plazo de la diabetes materna en la localización de los marcadores SATB2, FOXP2 y TBR1 de la CxM1 en ratas postnatales 21 (P21).....	35

5.3. Efecto de la diabetes materna en la inmunodetección de MAP2 y de reelina en neonatos (P0).	36
5.4. Efecto de la diabetes materna en la complejidad y estructura del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la CxM1 en ratas de 21 días de edad postnatal (P21).	38
5.5. Efecto de la diabetes materna en la excitabilidad neuronal de la CxM1 en ratas de 21 días de edad (P21).	39
6. Discusión	45
7. Conclusiones	53
Capítulo 2. Efecto del antagonismo prenatal de los receptores a histamina H <sub>1</sub> en la citoarquitectura y función cortical postnatal de la rata	54
Resumen	54
Abstract	55
1. Introducción	56
1.1 La histamina	56
1.2 Receptores a histamina	58
1.2.1 Receptor a histamina H <sub>1</sub> (RH <sub>1</sub> )	58
1.2.2 Receptor a histamina H <sub>2</sub> (RH <sub>2</sub> )	59
1.2.3 Receptor a histamina H <sub>3</sub> (RH <sub>3</sub> )	60
1.2.4 Receptor a histamina H <sub>4</sub> (RH <sub>4</sub> )	61
1.3 Desarrollo del sistema histaminérgico	62
1.4 Expresión de los receptores a histamina durante el desarrollo embrionario	65
1.4.1 Receptor H <sub>1</sub> (RH <sub>1</sub> )	65
1.4.2 Receptor H <sub>2</sub> (RH <sub>2</sub> )	67
1.4.3 Receptor H <sub>3</sub> (RH <sub>3</sub> )	68
1.4.3 Receptor H <sub>4</sub> (RH <sub>4</sub> )	68
1.5 Función del RH <sub>1</sub> en la corteza cerebral en desarrollo	68
2. Justificación	71
3. Objetivos	72
Objetivo general	72
Objetivos particulares	72
4. Métodos	73
5. Resultados	75
5.1 Efecto del bloqueo farmacológico del RH <sub>1</sub> en la expresión y localización de los marcadores SATB2, FOXP2 y TBR1 de la CxM1 en crías P0.	75

5.2 Efecto del bloqueo farmacológico del RH <sub>1</sub> en el establecimiento del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la CxM1 en ratas P21.....	79
5.3 Efecto del bloqueo farmacológico del receptor H <sub>1</sub> en la excitabilidad neuronal de las láminas V/VI de la CxM1 en ratas P21.....	81
5.4 Efecto del bloqueo farmacológico del RH <sub>1</sub> en la expresión del RH <sub>1</sub> y el nivel de la histamina en la CxM1 en ratas P21.....	84
5.5 Efecto del bloqueo farmacológico del RH <sub>1</sub> en la activación del RH <sub>1</sub> y RH <sub>2</sub> en las neuronas piramidales de la CxM1 en ratas P21. ....	85
6. Discusión.....	87
7. Conclusiones.....	96
Referencias.....	97
Anexos .....	114

## Abreviaturas

CPN	Neuronas piramidales de proyección callosales
CPP	Capa plexiforme primordial
CP	Placa cortical
CR	Células de Cajal-Retzius
CThPN	Neuronas piramidales de proyección cortico-talámica
Ctrl	Grupo control
CxM1	Corteza motora primaria
Db	Grupo diabético
DMG	Diabetes Mellitus gestacional
E	Día embrionario
HA	Histamina
IP	Progenitores intermedios
ICAD	Índice de complejidad del árbol dendrítico
IZ	Zona intermedia
MZ	Zona marginal
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2
Mep	Mepiramina
NEC	Células neuroepiteliales
NSC	Células troncales neurales
P	Día postnatal
RGC	Células de la glía radial
RH	Receptor a histamina
SP	Subplaca

ScPN	Neuronas piramidales de proyección subcerebrales
SNC	Sistema nervioso central
STZ	Estreptozotocina
SVZ	Zona subventricular
Tio	Tiotidina
VUs	Vocalizaciones ultrasónicas
VZ	Zona ventricular



# 1. Introducción general

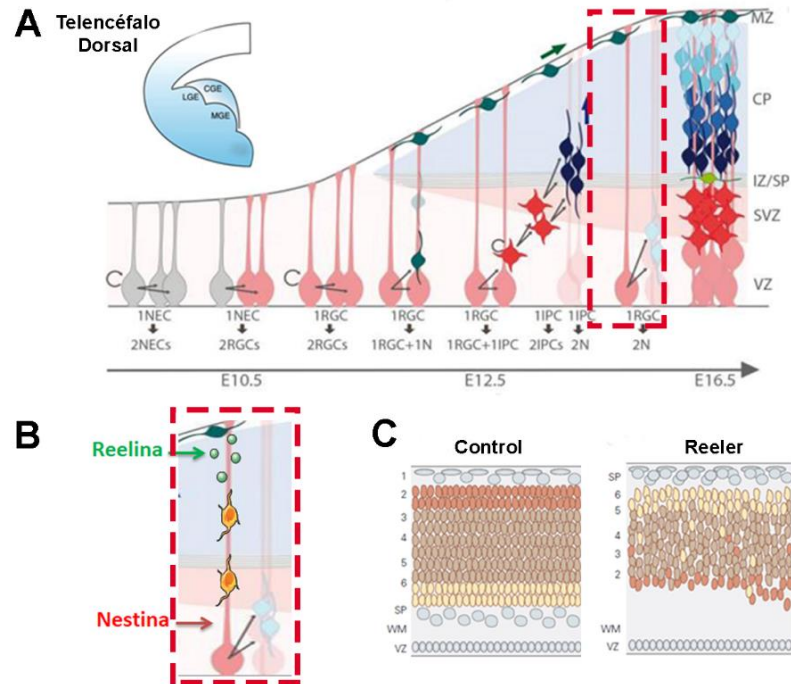
## 1.1 Corticogénesis

En los mamíferos, la corteza cerebral es una estructura altamente especializada en la que convergen, se integran y refinan las funciones sensoriales y motoras, y de la que emergen las funciones cognitivas como el aprendizaje, la memoria, el pensamiento y el lenguaje.

El desarrollo cortical o corticogénesis comienza con la especificación telencefálica del tubo neural, y de la corteza cerebral a partir del telencéfalo dorsal. Durante la corticogénesis se pueden distinguir diferentes estadios: 1) Expansión de las células troncales neurales o células neuroepiteliales (NEC, *Neuroepithelial Cells*); 2) Surgimiento de las células de la glía radial (RGC, *Radial Glial Cells*) y de los progenitores intermedios (IP, *Intermediate Progenitors*); 3) Formación de la capa plexiforme primordial (CPP); 4) Formación de la placa cortical (PC); 5) Desarrollo de la forma inicial común de las neuronas de la PC; 6) Maduración morfológica y funcional específica de las neuronas de la PC y estratificación ascendente (Marin-Padilla, 2001; Sun y Hevner, 2014; Lodato y Arlotta, 2015).

En los roedores, entre los días embrionarios (E) 9 y 10 (E9 y E10) y antes del inicio de la neurogénesis, las NEC se dividen de forma simétrica para expandir su población. El desarrollo cortical inicia en el E10, cuando las NEC se dividen de forma asimétrica dando origen a las RGC, también consideradas células troncales neurales. Mediante varios ciclos de división simétrica las RGC expanden su población a lo largo de la zona ventricular (VZ, *Ventricular Zone*), mientras que por división asimétrica originan los IP y, de manera directa, del 10 al 20% del total de las neuronas piramidales que integran a la corteza cerebral. La proliferación simétrica de los IP ocurre fuera de la VZ, permitiendo la formación de una nueva zona germinal, la zona subventricular (SVZ, *Subventricular Zone*), en la que por división asimétrica los IPC generan a la mayoría de las neuronas piramidales (Figura 1A; Lodato y Arlotta, 2015; Jiang y Nardelli, 2016).

La laminación cortical inicia entre E11 y E12 en los roedores, con la división de la pared telencefálica dorsal en dos regiones, VZ y CPP, que resulta de la migración de los primeros neuroblastos provenientes de la VZ (Figura 1A; Supèr et al., 1998; Bystron et al., 2008).



**Figura 1. Desarrollo cortical embrionario.** A) **Representación secuencial de la corticogénesis en los roedores.** Las células neuroepiteliales (NEC; gris) se auto-renuevan por división simétrica y por división asimétrica, y también generan a las células de la glía radial (RGC; rosa), que por división asimétrica directa originan a las primeras neuronas en el día embrionario 12 (E12), entre ellas a las células de Cajal-Retzius (CR; verde oscuro), que migran a la superficie cortical para integrar la zona marginal (MZ). Los progenitores intermedios (IP; rojo) se originan a partir de las RGC, y por división asimétrica generan a las neuronas (tonos azules) que integran las seis láminas de la corteza cerebral (E13-E17). B) **Migración radial.** Las neuronas recién formadas se desplazan de las zonas ventricular (VZ) y subventricular (SVZ) a través del andamio de las RGC que expresan al neurofilamento intermedio nestina, en un proceso mediado por la glicoproteína reelina, secretada por las CR y que constituye una señal de “alto” para las neuronas en migración. C) **Crecimiento columnar “de adentro hacia afuera”.** Las primeras neuronas en migrar forman las láminas profundas (amarillo), mientras que las últimas neuronas forman las láminas superficiales (naranja). En ratones que carecen de reelina (*reeler*) se pierde el patrón laminar, generando alteraciones en la citoarquitectura y función cortical. Modificado de Jiang y Nardelli (2016) y Kandel et al. (2013).

La población neuronal que integra la CPP es la primera en diferenciarse y en recibir conexiones sinápticas, incluso antes que se formen las otras láminas corticales. Las células de Cajal-Retzius (CR) se encuentran entre las primeras neuronas en diferenciarse en este estrato, por lo que se considera que durante el desarrollo embrionario forman una organización cortical primitiva que provee señales de posicionamiento para las neuronas recién formadas. Sorprendentemente, estas neuronas desaparecen dos semanas después del nacimiento (Figura 1A; Bayer y Altman 1990; Marin-Padilla 2001; Soriano et al., 2005).

En la rata, a partir del E14 se originan otras dos capas arriba de la VZ: la zona intermedia (IZ, *Intermediate Zone*) y la PC. El desarrollo de la PC ocasiona que la CPP se divida en dos estructuras: la zona marginal (MZ, *Marginal Zone*) y la subplaca (SP). La MZ formará la capa I de la corteza adulta, mientras que la SP es una estructura temporal. En este estadio, la IZ alberga una cantidad reducida de neuronas polimórficas, mientras que la PC se origina como resultado de la migración ascendente de millones de neuroblastos a través del andamio formado por las RGC (Figuras 1A y 1B; Supèr et al., 2000).

El periodo de migración neuronal en la corteza cerebral ocurre de E12.5 a E17.5, iniciando con el desplazamiento de los neuroblastos con morfología bipolar, desde las VZ y SVZ hasta la región apical a través del andamio de las RGC. Este evento es dirigido por reelina, una glicoproteína de matriz extracelular secretada por las CR en la MZ. La reelina representa una señal de “alto” para los neuroblastos en migración que les permite colocarse progresivamente en la PC siguiendo un patrón de “dentro hacia afuera” hasta conformar a las seis láminas de la corteza cerebral (Figuras 1B y 1C; Tissir y Goffinet, 2003; Noctor et al., 2004; Lee y D'Arcangelo, 2016).

El ratón *knockout* (KO) para reelina (*reeler*) se caracteriza por la inversión en el orden de migración de las neuronas corticales; es decir, las neuronas pierden el patrón de migración de adentro hacia afuera y se posicionan incorrectamente en la PC (Figura 1C; D'Arcangelo et al., 1995; Frotsher, 1997). Aunado a lo anterior se ha observado que en el ratón *reeler* la dendrita apical de las neuronas piramidales no tiene la orientación adecuada hacia la zona marginal, e incluso se ha reportado el

surgimiento de múltiples procesos dendríticos mal orientados (Ladrieu y Goffinet 1981; Terashima et al., 1992).

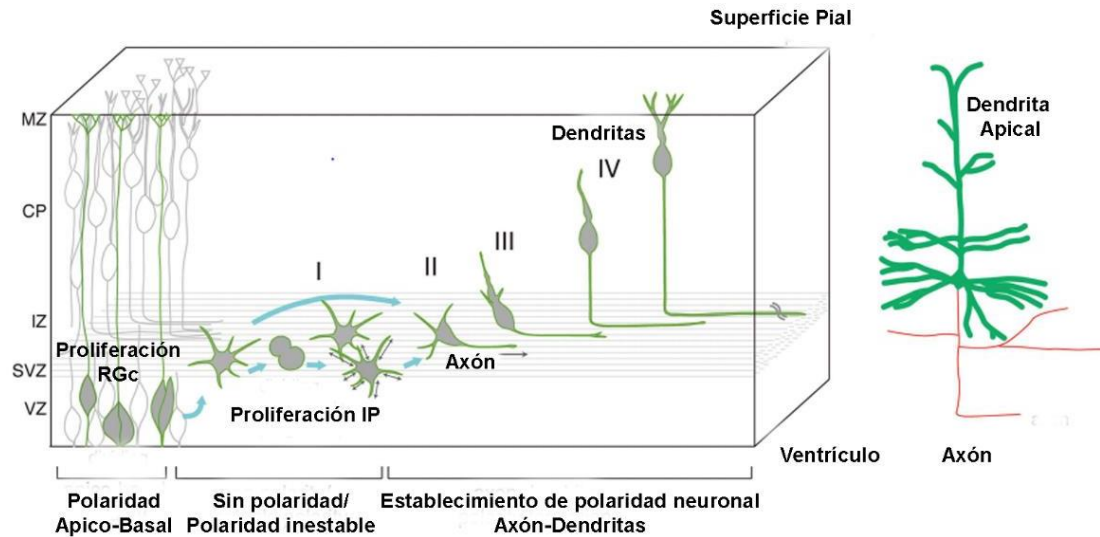
Por otra parte, la carencia de la proteína adaptadora Dab-1, indispensable para la señalización por reelina, produce al ratón mutante *scrambler*, que posee neuronas piramidales con dendritas apicales mal orientadas y desorganizadas. Se ha sugerido que las anomalías asociadas con el proceso precursor de la dendrita apical son secundarias a los defectos que se presentan en la migración y que son generados por disminución de la señal de reelina y como resultado de un mal posicionamiento del soma neuronal (Olson et al., 2006).

En la corteza cerebral, las neuronas piramidales son células altamente polarizadas, ya que presentan características particulares en su forma, estructura y función, que incluyen un soma en forma de pirámide, una dendrita apical orientada hacia la MZ, y múltiples dendritas basales y el axón orientados hacia los ventrículos. El establecimiento de la polaridad neuronal es un fenómeno íntimamente relacionado con el proceso de migración, ya que antes de iniciar el desplazamiento radial los neuroblastos adquieren una morfología bipolar, en donde el proceso guía (*leading process*) se orienta de manera perpendicular hacia la superficie pial, mientras que el de arrastre (*trailing process*) recae sobre el andamio de las RGC. Más tarde en el desarrollo, el proceso guía se convertirá en el árbol dendrítico apical y el proceso de arrastre en el axón (Figura 2; Calderon de Anda et al., 2008; Barnes y Polleux, 2009; Hatanaka et al., 2012).

Al finalizar el periodo de migración neuronal, la corteza cerebral se compone de seis láminas con características citoarquitectónicas particulares, que permiten establecer de forma adecuada el patrón de conectividad funcional necesario para la ejecución de programas motores y cognitivos (Glover, 2009; Sun y Hevner, 2014; Bocchi, et al., 2017).

Las neuronas excitadoras en una determinada lámina cortical presentan patrones de conectividad similares que están dados por los factores de transcripción que expresan. Las neuronas de las láminas II/III y IV contribuyen al establecimiento de las

proyecciones callosales, mientras que las neuronas de las láminas profundas V/VI forman las proyecciones subcerebrales (Lodato y Arlotta 2015; Jiang y Nardelli, 2016).



**Figura 2. Establecimiento de la polaridad neuronal.** Esquema que muestra el establecimiento de polaridad de las neuronas piramidales en la corteza cerebral. **I)** Las neuronas inmaduras que se encuentran en la zona ventricular (VZ), o los progenitores intermedios (IP) que se diferencian a neuronas, presentan una forma multipolar, la cual extiende y retrae las neuritas inmaduras en múltiples ocasiones en las zonas subventricular (SVZ) e intermedia (IZ), y este estadio dura varias horas. **II)** Formación y desarrollo del axón a partir del crecimiento acelerado de una de las neuritas, evento que termina con la simetría multipolar y establece la polaridad celular. **III)** Las neuritas restantes, que se convertirán en dendritas, se transforman en el proceso guía (*leading process*) y se orientan hacia la zona marginal (MZ). **IV)** Gradualmente las neuronas cambian de forma, se vuelven bipolares y migran a través del andamio de la glia radial hacia la superficie pial, mientras que el axón se prolonga hacia el ventrículo. Después de llegar a la lámina correspondiente en la placa cortical (PC), el axón y las dendritas maduran. La mayoría de las neuronas excitatorias se diferencian al fenotipo piramidal (dendritas, verde; axon, rojo). Modificado de Sakakibara y Hatanaka, 2015.

Las vías de señalización que controlan el establecimiento de la polaridad neuronal, la migración radial y el adecuado posicionamiento de las neuronas en las láminas corticales contribuyen a la formación adecuada de los circuitos neuronales. En este sentido, la regulación génica tanto a nivel post-transcripcional como

post-traducciona l desempeña una función primordial en el desarrollo de dichos circuitos (Hand et al 2005; Hasen et al., 2017; Buchsbaum y Cappelo 2019).

Los factores de transcripción encargados de controlar la especificación y el crecimiento de las proyecciones neuronales han sido utilizados como marcadores particulares para cada lámina cortical; entre ellos se encuentran SATB2 (*Special AT-rich sequence-binding protein 2*), marcador de las láminas II/III y IV; TBR1 (*T-box brain 1*), marcador de las láminas V/VI, y FOXP2 (*Forkhead box protein P2*), marcador de las láminas V/VI (Hevner et al., 2001; McKenna et al., 2011; Kast 2019).

La proteína remodeladora de cromatina SATB2, identificada por vez primera como una proteína unida a regiones adjuntas a la matriz nuclear (MARs; *Nuclear Matrix Attachment Regions*), regula de forma importante el desarrollo de las neuronas piramidales de proyección callosales (CPN, *Callosal Poyection Neurons*), que se encuentran primordialmente en las láminas II/III y IV de la corteza cerebral (Dobрева et al., 2003; Alcamo et al., 2008). SATB2 es un represor transcripcional de Ctip2 (*Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor Interacting Protein 2*), que forma un complejo con el proto-oncogen Ski y las deacetilasas de histonas HDCA1 y MAT2, el cual se une a las secuencias MARs del gen Ctip2 y reprime su expresión de manera directa (Alcamo et al., 2008; Baranek et al., 2012).

Las CPN deficientes de SATB2 son incapaces de formar el cuerpo calloso y proyectan sus axones hacia regiones subcorticales de forma ipsilateral, adoptando un fenotipo más parecido a las neuronas piramidales de las láminas profundas, mientras que en los mutantes de SATB2, el factor de transcripción Ctip2 (marcador de las neuronas piramidales de la lámina V) se expande hacia las láminas superiores. Estos hallazgos sugieren que en ausencia de SATB2 las CPN adoptan características citoarquitectónicas propias de las láminas profundas (Arlotta et al., 2005; Molyneaux et al., 2005).

Se ha reportado que SATB2 participa también en el desarrollo de las neuronas piramidales de proyección subcerebrales (ScPN, *Subcerebral Projection Neurons*)

que se localizan en las láminas V/VI, a través de la activación de los factores de transcripción *Fezf2* (*Forebrain Embryonic Zinc Finger 2*) y *Sox5* (*SRY-box 5*), genes esenciales para el desarrollo de las ScPN (Leone et al., 2015).

La regulación mutua entre *SATB2* y *Fezf2*, favorece que *SATB2* promueva la identidad de las ScPN, y que a su vez reprima las características subcerebrales en las CPN. De manera interesante, la ausencia de *SATB2* no modifica el desarrollo de las neuronas de proyección subcerebrales de la lámina VI que proyectan al tálamo (CThPN, *Cortico-Thalamic Projection Neurons*). En conclusión, *SATB2* regula el desarrollo de las CPN y las ScPN dependiendo del contexto celular de cada lámina cortical. En los humanos las mutaciones de *SATB2* generan alteraciones en el lenguaje y déficit intelectual (Docker, et al., 2014; Leone et al., 2015).

El factor de transcripción *Tbr1* se expresa durante la corticogénesis temprana en los roedores E12.5, en la preplaca, y para E15.5 en la SP, la MZ y la lámina VI de la PC. Este factor es necesario para la diferenciación adecuada de las CR, las neuronas de la SP y las neuronas glutamatérgicas de la lámina VI. En ausencia de *Tbr1*, existe un retardo en la división de la preplaca, las neuronas de la lámina VI se distribuyen ectópicamente por debajo de la SP y se observan alteraciones en el establecimiento de las vías cortico-talámica, tálamo-cortical y cortico-cortical (Hevner et al., 2001). Asimismo, promueve la especificación de las CThPN, mediante la represión del fenotipo subcerebral en la lámina VI; mientras que su proteína se une a la región 3' del gen *Fezf2* y lo reprime, disminuyendo la cantidad de la proteína en las neuronas de la lámina VI. De esta manera, la ausencia de *Fezf2* permite la diferenciación de las ScPN y CThPN de la lámina VI (McKenna et al., 2011).

*FOXP2* es un factor de transcripción que se asocia con el aprendizaje motor en el desarrollo del lenguaje en los humanos y con la emisión de vocalizaciones ultrasónicas (VUs) en los roedores. Las mutaciones de *FOXP2* humano provocan desórdenes en el aprendizaje y el lenguaje, caracterizados por dispraxia verbal (dificultad para crear automática e inconscientemente programas motores para fonemas, sílabas y palabras, durante el periodo de adquisición de la lengua materna; Cervera et al., 2011), entre otros déficits cognitivos. El ratón KO de *Foxp2* pierde la

capacidad de producir VUs (Vargha-Khadem et al., 1998; Shu et al., 2005; Fujita et al., 2008).

Al inicio del desarrollo cortical embrionario de los roedores (E12), FOXP2 se expresa en las células troncales neurales, promueve la transición de las RGC a IP y favorece así la neurogénesis (Tsui et al., 2013). Llama la atención que la sobre-expresión de FOXP2 en el telencéfalo dorsal del ratón en E13.5, altera la migración radial de las ScPN *in vivo*, ya que las crías de 15 días de edad (postnatal 15; P15) muestran neuronas FOXP2<sup>+</sup> fuera de la capa y en el cuerpo calloso *in vivo*; además retarda el crecimiento de las neuritas *in vitro* (Clovis et al., 2012).



## **Capítulo 1. Efecto de la diabetes materna en la citoarquitectura y función cortical postnatal de la rata**

### **Resumen**

Diversos estudios epidemiológicos muestran que los hijos de madres diabéticas en edad escolar presentan afecciones cognitivas entre las que destacan las del lenguaje, de la capacidad para ejecutar movimientos finos y gruesos, así como de las habilidades gráficas y espaciales, tareas que dependen de la integridad funcional de la corteza cerebral. En particular, la corteza motora primaria es responsable de la planeación y ejecución del movimiento voluntario.

Los embriones de roedores expuestos a altas concentraciones de glucosa muestran un aumento en la proliferación y diferenciación neuronales, así como alteraciones en la migración durante la corticogénesis, lo cual se ha relacionado con defectos del tubo neural. Sin embargo, existen pocos estudios sobre los efectos de la diabetes materna, a corto y largo plazo, en productos sin defectos del tubo neural. En el primer capítulo de esta tesis se usaron técnicas moleculares, bioquímicas, morfológicas y electrofisiológicas para mostrar que la hiperglucemia materna aumenta la expresión y modifica la distribución de los marcadores neuronales SATB2, FOXP2 y TBR1 en la corteza motora primaria, impide el desarrollo de la polaridad neuronal, y disminuye la complejidad dendrítica y la excitabilidad neuronal de las láminas profundas V y VI de la corteza cerebral de las crías.

Estos resultados indican que durante la corticogénesis, la hiperglucemia materna promueve alteraciones en los procesos de neurogénesis, migración, establecimiento de polaridad neuronal y arborización dendrítica, que favorecen la disminución de la excitabilidad neuronal en las láminas profundas de la corteza motora primaria, así como posibles anormalidades en la innervación cortico-cortical y extra-cortical.

## **Abstract**

Epidemiological studies have reported that children of diabetic mothers in scholar age present cognitive impairment related to low verbal task scores, impaired fine and gross motor skills, and poor performance in graphic and visuospatial tasks. The primary motor cortex is important for controlling motor functions, and rodent embryos exposed to high glucose concentrations show changes in cell proliferation, migration, and differentiation during corticogenesis. However, the existing studies do not discriminate between embryos with or without neural tube defects, making it difficult to conclude whether the reported changes are related to neural tube defects or other anomalies. Furthermore, postnatal effects on central nervous system cytoarchitecture and function have been scarcely addressed.

In the first chapter of this thesis, through molecular, biochemical, morphological, and electrophysiological approaches, evidence is provided for impaired primary motor cerebral cortex lamination and neuronal function in pups from diabetic rats, showing altered distribution of the neuronal markers SATB2, FoxP2, and TBR1, impaired cell migration and polarity establishment, and decreased excitability of deep-layer cortical neurons.

These results indicate that high-glucose insult during brain development promotes complex changes in neurogenesis, migration, cell polarity establishment, and dendritic arborization, which in turn lead to reduced excitability of deep-layer cortical neurons, suggesting abnormalities in cortico-cortical and extra-cortical innervation.

## **1. Introducción**

### **1.1 Diabetes Mellitus gestacional**

La Diabetes Mellitus gestacional (DMG) se caracteriza por la intolerancia durante el embarazo a los carbohidratos en diversos grados de severidad, 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 2019 se reportaron a nivel mundial 20.4 millones de nacimientos afectados por la diabetes durante el embarazo, lo que representa el 15.8% del total de los nacimientos (*International Diabetes Federation, 2019*). 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 con DMG, siendo la alteración metabólica más frecuente durante el embarazo.

La DMG 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; García-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 y la hipocalcemia (*García-Carrapato, 2003; Polanco et al., 2005*).

La programación fetal intrauterina se define como el desarrollo de patologías durante la niñez y la etapa adulta que se originaron durante el desarrollo fetal. En este sentido, la hiperglucemia materna se relaciona con el desarrollo de obesidad, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, así como con un menor coeficiente intelectual, retardo en el aprendizaje motor y del lenguaje, desarrollo del trastorno con déficit de atención e hiperactividad (TDAH), y con un pobre desarrollo de habilidades psicosociales en la descendencia (*Márquez-Valadez et al., 2018*).

## 1.2 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 relacionados con el desarrollo fetal directamente en el tejido en desarrollo, 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 ha generado en modelos animales.

Existen diferentes métodos para inducir diabetes durante la gestación, siendo la administración sistémica de estreptozotocina (STZ) el más utilizado. La STZ es una nitrosourea aislada del hongo *Streptomyces achromogenes* que a través del transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2) ingresa principalmente a las células pancreáticas  $\beta$ , que expresan altas densidades de GLUT2. En el interior de estas células la toxina transfiere un grupo alquilo a las bases del ADN induciendo necrosis celular y generando hiperglucemia e hipoinsulinemia en el organismo. Este modelo de diabetes ha sido ampliamente utilizado en la rata para evaluar defectos del desarrollo embrionario temprano, la inducción de malformaciones, anomalías placentarias, defectos durante el desarrollo fetal y la transmisión intrauterina de enfermedades metabólicas (Szkudelski, 2001; Jawerbaum y White, 2010).

Para estudiar los efectos de la diabetes durante la gestación utilizando STZ deben considerarse la dosis de la toxina, la especie a evaluar, la edad de los animales y el periodo de administración del fármaco. En particular, para investigar 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 por vía intraperitoneal durante el embarazo produce hiperglucemia severa ( $> 200$  mg/dl) que se mantiene durante toda la gestación, generándose de manera simple un modelo animal de diabetes materna. Una desventaja de este modelo es la destrucción

irreversible de las células pancreáticas  $\beta$ , que lo hace más parecido a la Diabetes Mellitus tipo 1 (Jawerbaum y White, 2010; Salazar *et al.*, 2015).

### **1.3 Diabetes gestacional y desarrollo del sistema nervioso central**

Existe un número reducido de estudios que abordan el efecto de la diabetes gestacional en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) de los productos y sus secuelas a largo plazo. Utilizado el modelo de DMG inducida por STZ, Liao y cols. (2004) reportaron que los embriones de ratón E11.5 provenientes de madres diabéticas presentaron alteraciones en el neuroepitelio prosencefálico, que incluyeron engrosamiento y fusión del telencéfalo ventral, así como aumento en la expresión de factores de transcripción que regulan la diferenciación neuronal y glial como *Shh* (*Sonic hedgehog*), *Nkx2.1* (*Homeobox protein Nkx-2.1*), *Ngn1* (*Neurogenin-1*) y *2*, *Olig1* (*Oligodendrocyte transcription factor 1*), *Ascl1* (*Achaete-scute homolog 1*) y *BF1* (*Brain factor-1*). Con el mismo modelo, Fu y cols. (2006) mostraron que los embriones E11.5 de madres diabéticas presentaron mayor diferenciación neuronal en las regiones ventral y dorsal del telencéfalo, evento que se relaciona con una regulación al alza de *Ngn1* y con el engrosamiento del telencéfalo dorsal.

En un estudio de nuestro grupo de investigación, los embriones E14 de ratas hiperglucémicas con diabetes gestacional inducida con STZ, mostraron un aumento en la expresión de *MAP2* (*Microtubule-Associated Protein 2*) en el telencéfalo dorsal, lo cual sugiere aumento de la diferenciación y de la maduración neuronal en el neuroepitelio cortical (Solís *et al.*, 2017). El aumento en la diferenciación neuronal en los embriones de madres diabéticas fue confirmado por Ji y cols. (2019), quienes además mostraron un aumento de *TBR1*, marcador de neuronas de las láminas profundas de la corteza cerebral, así como un desarreglo en el patrón de expresión de *SATB2* a lo largo de las seis láminas corticales. Este último hallazgo sugiere alteraciones en el proceso de migración neuronal en los embriones de madres diabéticas.

En relación con las alteraciones en el proceso de migración neuronal durante el periodo embrionario, Rash y cols. (2018) reportaron que en condiciones

hiperglucémicas en el cultivo *ex-vivo* del neuroepitelio cortical de ratones E14.5 se retrae el andamio de las RGC por el cual migran los neuroblastos, se altera el transporte mitocondrial y disminuye la señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ . A nivel postnatal, Steculorum y Bouret (2011) demostraron que las crías de ratón provenientes de madres diabéticas desarrollan resistencia a la leptina en las neuronas que integran al núcleo arqueado, con disminución de la densidad de fibras que proyectan de esta región al núcleo paraventricular y aumento del consumo de alimento y el peso corporal con respecto al grupo control, indicando que los cambios generados por la diabetes materna durante el desarrollo en la citoarquitectura de este circuito tienen consecuencias funcionales a corto y largo plazo.

## **2. Justificación**

La corteza cerebral es una estructura altamente especializada responsable de regular e integrar procesos sensoriales, cognitivos y motores. La ejecución adecuada de dichos procesos depende del arreglo citoarquitectónico cortical, resultado de la interacción de diversas señales moleculares que dirigen el desarrollo cortical embrionario.

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 de tareas gráficas espaciales y/o bimanuales, procesos que dependen de la integridad funcional de la corteza cerebral.

En modelos animales de diabetes materna, se ha reportado un aumento en la diferenciación y en la maduración neuronal, así como alteraciones en el proceso de migración neuronal en la corteza cerebral durante el periodo embrionario. Sin embargo, se desconoce cuál es el efecto de estas modificaciones en la citoarquitectura y función cortical postnatales.

Por lo anterior, en este estudio se utilizó un modelo de diabetes materna en la rata, inducido por la administración sistémica de STZ, con el propósito de evaluar: 1) la expresión y localización de los marcadores de las láminas corticales SATB2, TBR1 y FOXP2; 2) el establecimiento de polaridad neuronal; 3) el desarrollo del árbol dendrítico en neonatos (P0) y crías de 21 días de edad (P21) respectivamente; y 4) la excitabilidad de las neuronas piramidales de la corteza motora primaria (P21).

### **3. Objetivos**

#### **Objetivo general**

Determinar si la diabetes materna modifica la citoarquitectura y la función cortical postnatal

#### **Objetivos particulares**

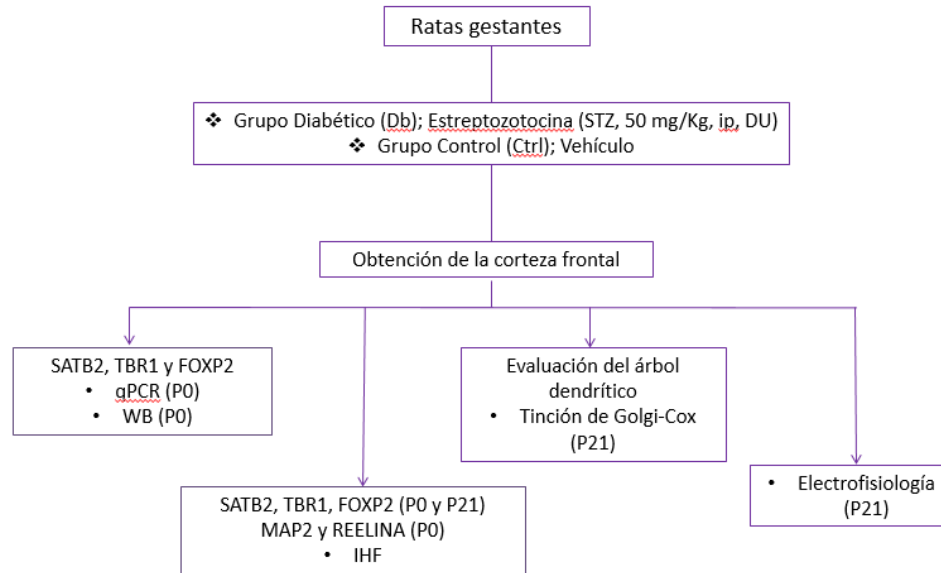
Determinar si la diabetes materna modifica:

1. La expresión y localización de los marcadores de las distintas láminas corticales (SATB2, TBR1/FOXP2) en la corteza motora primaria (CxM1) de los productos (P0 y P21).
2. La expresión de MAP2 y de reelina en la corteza motora de los productos (P0).
3. Las características del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la corteza motora de los productos (P21).
4. Las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas piramidales de la corteza motora de los productos (P21).



## 4. Métodos

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



DU, dosis única; IHF, inmunohistofluorescencia; P0, día postnatal 0; P21, día postnatal 21; qPCR, PCR cuantitativa; WB, Western blot.

### 4.1. Animales

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (NIH No. 80-23, revisado en 1978) y a la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), así como por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología (INPer; número de registro 3230-21202-01-2015).

Se utilizaron ratas hembra adultas (Wistar, 230-300 g), las cuales se mantuvieron en condiciones de temperatura constante ( $22 \pm 2$  °C), ciclo luz:oscuridad de 12:12 h y

humedad relativa de 40%, 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), y este tiempo se consideró como E0.5. Las hembras fueron separadas del macho y se colocaron en cajas individuales en donde permanecieron durante toda la gestación.

Cinco días posteriores a la cópula (E5), el grupo diabético (Db) recibió una dosis única de estreptozotocina (STZ; 50 mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), disuelta en solución de citratos (pH 6.4), por vía intraperitoneal (ip), mientras que al grupo control (Ctrl) se le 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-ChekK Performa, Roche, Basilea, Suiza). Se consideraron como ratas diabéticas aquellas con glucemia  $\geq 200$  mg/dl, y los animales con glucemia inferior a dicho valor fueron descartados. Para el grupo control solo se incluyeron las ratas inyectadas con el vehículo con glucemia de 90-120 mg/dl.

Las crías machos de ambos grupos fueron sacrificadas por decapitación dentro de las primeras 2 h después del nacimiento para P0, o en P21. Se obtuvo el cerebro y se disecó la corteza cerebral frontal. Para los experimentos de electrofisiología, la expresión del RNAm y de cuantificación de proteínas se utilizó tejido fresco, mientras que para la técnica de inmunofluorescencia el tejido fue fijado por perfusión transcardiaca con solución de Bouin.

## **4.2. Extracción de RNA total y RT-qPCR**

La corteza frontal fue colocada en 1 ml del reactivo TRIZOL® (Life Technologies, Bartlesville, OK, USA) y almacenada hasta su uso a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para la extracción de RNA total el tejido fue homogenizado por pipeteo, 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 temperatura ambiente. Se centrifugó a  $1,700\times g$  durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y la fase superior de cloroformo se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, al que se le

adicionaron 500 µl de isopropanol. Se agitó vigorosamente durante 15 s y se incubó a 30°C durante 10 min antes de centrifugar a 11,000×g durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla fue lavada dos veces durante 5 min cada una, por centrifugación (11,000×g, 4°C) con 1 ml de etanol; la primera vez con etanol al 100% y la segunda vez con etanol al 75%. La pastilla se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente.

El RNA total fue resuspendido en 20 µl de agua libre de RNAsas y se incubó durante 10 min a 60°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 µl del RNA total en geles de agarosa al 2%.

Para las reacciones de retrotranscripción (RT) se utilizó 1 µg de RNA total, en presencia de 0.5 µg de hexámeros aleatorios, 1 mM de la mezcla de dinucleótidos trifosfatados (dNTPs), 2 µl de solución amortiguadora de retrotranscripción (10X), 0.5 µl de inhibidor de ribonucleasas (40 U/µl), 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) y 5 U de la enzima AMV Retrotranscriptasa (Promega, Madison, WI, USA). La mezcla se llevó a un volumen final de 20 µl 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 DNA complementario (cDNA) fue mantenido a -20°C hasta su uso.

Una vez verificado el tamaño de los productos por PCR de punto final, se determinaron rangos dinámicos con 1, 10, 100 y 1000 ng del cDNA pre-amplificado tomando 1 µl por triplicado de cada concentración por 15 ciclos adicionales usando el *master mix KAPA<sup>TM</sup> Syber Fast® qPCR* (KAPA, Bartlesville, OK, USA), con el propósito de evaluar la eficiencia de cada par de oligonucleótidos, determinar el ciclo umbral de fluorescencia (CT) y asegurar la amplificación específica del fragmento al observar un solo pico en las curvas de fusión.

Habiendo establecido los rangos dinámicos para Satb2, Tbr1 y FoxP2, y el gen normalizador GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), se utilizó 1 µl (500 ng) de cDNA pre-amplificado, 20 pmoles de cada oligonucleótido (Tabla 1), y la mezcla comercial KAPA<sup>TM</sup>, para un volumen final de 10 µl.

**Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos orientación 5'-3'.**

<b>FoxP2</b>	
sentido: GAAAGCGCGAGACACATCG	anti-sentido: GAAGCCCCCGAACAAACA
<b>Satb2</b>	
sentido: CCGCACACAGGGATTATTGTC	anti-sentido: TCCACTTCAGGCAGGTTGAG
<b>Tbr1</b>	
sentido: GGAAGTGAATGAGGACGGCA	anti-sentido: TGGCGTAGTTGCTCACGAAT
<b>GAPDH</b>	
sentido: GGACCTCATGGCCTACATGG	anti-sentido: CCCCTCCTGTTGTTATGGGG

La reacción se efectuó con un periodo inicial de desnaturalización de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización por 30 s a 95°C, de alineación durante 15 s, a 63°C (FoxP2), 60°C (Tbr1), 57°C (Satb2) y 58°C (GAPDH), y de extensión por 15 s a 72°C. Al finalizar la reacción se realizaron curvas de fusión para asegurar la amplificación de un solo producto (Kubista et al., 2006). Los resultados fueron analizados utilizando el método de expresión relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , calculando el  $\Delta CT$ , que es el ciclo umbral (CT) de cada producto a evaluar, normalizado con el obtenido para GAPDH ( $\Delta CT = CT_{\text{producto}} - CT_{\text{GAPDH}}$ ) de cada muestra, mientras que el  $\Delta\Delta CT$  corresponde al  $\Delta CT$  del grupo experimental menos el  $\Delta CT$  del grupo control (Livak y Schmittgen, 2001).

### **4.3. Inmunofluorescencia**

Las crías P0 y P21 recibieron 50 mg/kg de pentobarbital por vía intraperitoneal (Laboratorios PiSA, Ciudad de México, México) y fueron sometidas a perfusión transcardiaca con solución salina amortiguada de fosfatos (PBS), pH 7.4, seguido de solución fijadora de Bouin (15:15:1 solución acuosa saturada con ácido pícrico: formalina 40%: ácido acético glacial) a un flujo de 0.5 ml/min para P0 y 0.7 ml/min para P21, a temperatura ambiente usando una bomba de perfusión (Modelo 07525-40, Masterflex, Gelsenkirchen, Alemania). El cerebro fue sumergido durante tres días en la solución de Bouin y en una solución de sacarosa al 30% por tres días adicionales. Una vez fijado y crioprotegido, el tejido cerebral fue utilizado para obtener cortes

coronales de 10  $\mu\text{m}$  que incluyeran a la corteza motora primaria en portaobjetos tratados con Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) utilizando un criostato (Leica CM1850 UV, Wetzlar, Alemania).

Después de tres lavados por 10 min con PBS, se incubó durante 1 h con la solución de bloqueo y permeabilización (PBS con 10% de suero normal de cabra y 0.3% de Tritón X-100). La autofluorescencia producida por la lipofuscina fue bloqueada con TrueBlack (Biotium, Hayward, CA, USA) y el tejido fue incubado con los anticuerpos primarios (Tabla 2) diluidos en PBS conteniendo 10% de suero normal de cabra durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron tres lavados a temperatura ambiente con PBS durante 10 min cada uno y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (Tabla 2), seguido de tres lavados por 10 min cada uno. Los núcleos se tiñeron con DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*; 1  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 8 min, se lavó tres veces durante 10 min con PBS y finalmente se montó el tejido en Aqua Poly/mount (Polyscience, 18606-100, Warrington, PA, USA).

Las imágenes de inmunofluorescencia se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX-81) utilizando una cámara CCD (Hamamatsu, ORCA-Flash 2.8, Tokio, Japón) y se procesaron con el programa Adobe Photoshop (C6S; San José, CA, USA).

#### **4.4. Western Blot**

Se obtuvieron extractos totales del tejido de la corteza cerebral frontal de ambos hemisferios (P0), para un total de tres a cinco experimentos por grupo. El tejido se homogenizó en solución de lisis (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, IGEPAL 1%, 100 mM NaCl) con inhibidores de proteasas (Amresco, Solon, OH, USA). El lisado fue centrifugado a 13,000 $\times$ g durante 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y la proteína fue cuantificada por el método de Bradford (Sigma-Aldrich; Friedenauer y Barlet 1989; Bradford, 1976).

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot (WB).**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Descripción</b>	<b>Dilución</b>	<b>Especie</b>	<b>Proveedor y catálogo</b>
<b>Reelina</b>	Proteína de matriz extracelular, marcador de lámina I o zona marginal (MZ)	1:250 (IHQ)	Ratón	Millipore MAB5366
<b>MAP2</b>	Proteína Asociada a Microtúbulos, marcador de dendritas en proceso de maduración	1:500 (IHQ)	Ratón	GeneTex GTX11268
<b>SATB2</b>	Factor de transcripción que se localiza en las láminas corticales II, III y IV	1:250 (IHQ) 1:1500 (WB)	Conejo	Abcam Ab34735
<b>TBR1</b>	Factor de transcripción localizado en las láminas corticales V y VI	1:100 (IHQ) 1:500 (WB)	Conejo	Abcam Ab31940
<b>FoxP2</b>	Factor de transcripción localizado en las láminas corticales V y VI	1:250 (IHQ) 1:100 (WB)	Conejo	Abcam Ab16046
<b>GAPDH</b>	Control de Carga (WB)	1:1500 (WB)	Ratón	GeneTex GTX41027
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Control de Carga (WB)	1:1500 (WB)	Ratón	GeneTex GTX82559
<b>Alexa Fluor 488 anti-IgG</b>	Anticuerpo secundario fluorescente	1:1000 (WB)	Conejo Cabra Ratón	Life Technologies A-21204
<b>Alexa Fluor 568 anti-IgG</b>	Anticuerpo secundario fluorescente	1:1000 (WB)	Conejo Cabra Ratón	Life Technologies A-11004

Para la electroforesis se utilizaron de 20-80  $\mu$ g de proteína por muestra y 2.5  $\mu$ l del marcador de peso molecular (1610376, Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards, Bio-Rad o GTX50875, Trident Prestained Protein Ladder, GeneTex) que fueron cargados en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). Las muestras se corrieron durante 30 min a 70 V (gel separador 4%) y 2 h a 100 V (gel concentrador 10%) utilizando el sistema MiniProtean II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham

TM Hybond TM-ELC, Buckinghamshire, UK), utilizando el sistema de transferencia semi-húmeda

Trans-Blot® (Bio-Rad; Villanueva, 2008), a 1.3 A. 25 V, durante 12 min.

La unión inespecífica de los anticuerpos fue bloqueada incubando (1 h) las membranas con leche libre de ácidos grasos al 7% (Leche SVELTY®, Nestlé, Ciudad de México, México) en solución amortiguadora TBS (20 mM Tris base, 150 mM NaCl, pH 7.4).

Posteriormente las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en TBS (Tabla 2). Al siguiente día se lavaron con solución TBS-T (TBS conteniendo 0.1% de Tween-20) tres veces durante 10 min cada una, y se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 h a temperatura ambiente (Tabla 2). Las bandas correspondientes a las proteínas de interés fueron detectadas al escanear las membranas en el sistema Odyssey Clx y analizadas con el software Image Studio ver. 4.0 (Li-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA). La señal de fluorescencia obtenida para GAPDH fue utilizada como control de carga para cada muestra (control interno).

#### **4.5. Tinción histológica de Golgi-Cox**

Para evaluar la estructura y la orientación de las neuronas piramidales en la corteza motora primaria, se realizó la tinción de Golgi-Cox (FD Rapid GolgiStain Kit, FD Neurotechnologies, Columbia, MD, EUA). El cerebro de los machos P21 de los grupos control y diabético fue obtenido después de decapitar a los animales, se lavó con PBS a 4°C y se retiraron los vasos sanguíneos y las meninges. El cerebro fue dividido en dos segmentos coronales que se colocaron en la solución de impregnación durante 12 h y se almacenó con protección de la luz en solución fresca de impregnación durante dos semanas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo el tejido fue transferido a la solución crioprotectora en la que permaneció durante tres días a 4°C.

Para mejorar la calidad del revelado, así como la eficiencia de los lavados, se obtuvieron cortes coronales de 60  $\mu\text{M}$  utilizando un criostato. Los cortes se colocaron en la solución de revelado durante 1 min y se lavaron en agua bidestilada durante 5 min; posteriormente fueron deshidratados en alcohol (50, 75, 96 y 100%; 5 min en cada dilución), transferidos a xilol y montados con Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania) en portaobjetos.

Para el análisis morfológico se obtuvieron fotografías (20 $\times$ /0.25) de las neuronas piramidales de las seis láminas corticales (I-VI) de la corteza motora primaria de ambos hemisferios, de al menos tres sujetos provenientes de tres camadas distintas por grupo. Con la finalidad de realizar la reconstrucción del árbol dendrítico solo se fotodocumentaron las neuronas piramidales completamente impregnadas, con espinas dendríticas y cuyo árbol dendrítico pudiera visualizarse en diferentes planos.

#### **4.5.1 Reconstrucción del árbol dendrítico y análisis**

Para el análisis del árbol dendrítico, se obtuvo una sola imagen a partir de una serie de fotografías y se imprimió. Con ayuda de una lupa, plumón negro de punto fino y una hoja blanca colocada sobre cada impresión se realizó la reconstrucción del árbol dendrítico al dibujar en un solo plano las dendritas presentes en los distintos planos. Los dibujos fueron escaneados para realizar los análisis de Sholl, de complejidad dendrítica y de orientación de la dendrita apical, utilizando el programa Fiji (Schindelin et al., 2012).

#### **4.5.2 Análisis de Sholl**

Para evaluar las características morfológicas del árbol dendrítico de las neuronas piramidales se realizó el análisis de Sholl (1953). En los dibujos de cada neurona se trazaron círculos concéntricos cada 10  $\mu\text{M}$  a partir del soma, y se cuantificó el número de intersecciones entre los círculos crecientes y el árbol dendrítico.



### 4.5.3 Índice de complejidad del árbol dendrítico (ICAD)

Para la determinación del ICAD, a cada una de las dendritas se le asignó un valor ordinal, que se refiere al orden en el que aparece una ramificación en relación a la primera ramificación llamada dendrita primaria, y se utilizó la siguiente fórmula (Vitalis et al., 2017):

$$ICAD = \frac{\sum \text{Valor Ordinal de la dendrita} + \# \text{total de dendritas}}{\# \text{ de dendritas primarias}} \times \text{longitud del árbol dendrítico}$$

### 4.5.4 Orientación de la dendrita apical

Para evaluar la orientación de las neuronas piramidales en la corteza cerebral, se determinó el ángulo de inserción de la dendrita apical con respecto al soma (Hashimoto-Torii et al., 2008, Schiendelin et al., 2012), tomando en cuenta que una desviación  $> 15^\circ$  en el ángulo de inserción es considerada como indicador de alteración en el establecimiento de polaridad neuronal.

## 4.6. Registros electrofisiológicos

Se utilizaron ratas machos P21 provenientes de las capas de los distintos grupos experimentales. Las ratas fueron anestesiadas profundamente con pentobarbital sódico (50 mg/kg) por vía intraperitoneal, posteriormente fueron decapitadas y el cerebro fue rápidamente removido para ser colocado en una solución fría de sacarosa saturada con carbógeno (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) con la siguiente composición (mM): sacarosa 210, KCl 2.8, MgSO<sub>4</sub> 2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 26, D-(+)-glucosa 10, MgCl<sub>2</sub> 1 y CaCl<sub>2</sub> 1, pH 7.2-7.35.

Después de 30-45 s, los hemisferios fueron separados siguiendo la línea sagital media y se colocaron en la platina de un vibratomo VT1000S (Leica, Nussloch, Alemania) para obtener rebanadas coronales de 385 μm de grosor que contuvieran a la corteza motora primaria. Las rebanadas fueron colocadas en una solución de incubación con la siguiente composición (mM): NaCl 125, KCl 2.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 26, MgCl<sub>2</sub> 4, D-(+)-glucosa 10 y CaCl<sub>2</sub> 1, pH 7.4. Se incubó a 34°C por 30 min, y posteriormente por al menos 60 min a temperatura ambiente.

Para el registro, las rebanadas fueron transferidas a una cámara con perfusión constante (2-3 ml/min) con líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) con la siguiente composición (mM): NaCl 125, KCl 2.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 26, MgCl<sub>2</sub> 2, D-(+)-glucosa 10 y CaCl<sub>2</sub> 2; pH 7.4, saturada con carbógeno y a 32-33°C. Los registros se realizaron usando un microscopio Nixon FN-S2N equipado con una cámara infrarroja de contraste de interferencia para visualizar los cuerpos de las neuronas a través del objetivo de inmersión (40×). Para acceder a las neuronas se emplearon pipetas de borosilicato, obtenidas con un estirador (*puller*) horizontal (Flaming-Brown P-97, Novato, CA, USA) para obtener una resistencia final de 3-6 MΩ. Las pipetas se llenaron con una solución intracelular con la siguiente composición (mM): Gluconato de potasio 135, KCl 10, EGTA 1, HEPES 10, Mg-ATP 2, NA<sub>2</sub>GTP 0.4, fosfocreatina 10. La solución se ajustó a un pH de 7.2-7.3 (osmolaridad 290-300 mOsm/l).

Los registros de *patch clamp* en configuración de célula completa se realizaron en neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza motora primaria, localizadas entre 10 y 150 μm de profundidad con respecto a la superficie de la rebanada. Para el estudio de las propiedades pasivas y de la excitabilidad neuronal, los experimentos se llevaron a cabo en la modalidad de fijación de corriente en condiciones basales y en presencia de histamina (1, 10 y 100 μM).

El potencial de membrana en reposo (RMP) se determinó inmediatamente después de acceder a la célula. Una vez que el RMP se estabilizó en la configuración de fijación de corriente (*current clamp*), se aplicó una batería de protocolos electrofisiológicos para estudiar las propiedades pasivas y activas de las neuronas piramidales de las capas profundas de la corteza motora primaria: A) La curva corriente versus voltaje (I/V) se construyó aplicando pulsos de corriente a partir de -300 pA con incrementos de 30 pA durante 1 s hasta generar un potencial de acción; B) La resistencia de entrada (R<sub>in</sub>) se calculó como la pendiente de la porción lineal de la curva I/V que corresponde a los valores de corriente de -30, 0 y 30 pA; C) La constante de tiempo de la membrana (τ) se obtuvo ajustando una función exponencial a la respuesta capacitiva obtenida con el pulso de -30 pA. D) La amplitud del *sag* o caída del voltaje

en respuesta a una corriente hiperpolarizante se obtuvo con el pulso de -300 pA; E) La frecuencia de disparo se obtuvo aplicando pulsos de corriente de 0 a 500 pA en incrementos de 50 pA con duración de 1 s. Se determinó la corriente necesaria para evocar un potencial de acción (reobase), y la frecuencia de disparo se obtuvo cuantificando el número de potenciales de acción evocados en respuesta a la corriente aplicada.

#### **4.7. Ensayo de unión de [<sup>3</sup>H]-mepiramina**

Para la obtención de las membranas totales de la corteza frontal de ratas P21, el tejido se homogenizó en 10 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4). El homogenado se centrifugó a 20,000×g durante 20 min a 4°C y la pastilla (membranas totales) se resuspendió en 400 µl de solución de incubación (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4). La corteza cerebral de ratas adultas fue usada como control positivo. La unión total del radioligando al receptor en las membranas totales se determinó en un volumen final de 100 µl conteniendo [<sup>3</sup>H]-mepiramina (10 nM) en presencia o ausencia de mepiramina no marcada (10 µM).

Después de incubar durante 60 min a 30°C, las muestras fueron filtradas utilizando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B previamente sumergidos en 0.3% de polietilenoimina (3 h). La radioactividad retenida en los filtros se determinó por centellometría, la unión específica se calculó restando la unión no específica (en presencia de 10 µM de mepiramina) de la unión total y los resultados fueron normalizados con base en el contenido de proteína (~60 µg), cuantificado por el método del ácido bicinonínico (Smith et al., 1985).

#### **4.8. Determinación del contenido de histamina**

Las crías se decapitaron, se obtuvo el cerebro y se disecó la corteza frontal. El contenido de histamina fue determinado por un ensayo de ELISA de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor (Alpco® Immunoassays, Salem, NH, USA). El tejido se homogenizó en 100 µl de PBS a 4°C utilizando un homogenizador

(Polytron® PT 2100 Homogenizers, Kinematica, Lucerna, Suiza). El homogenado se centrifugó a 10,500×g durante 5 min a 4°C, y se recuperó el sobrenadante.

Las muestras y la curva estándar fueron aciladas con 25 µl de la solución de acilación durante 45 min (20-25°C) con agitación. Se transfirieron 25 µl a los pozos de microtitulación para histamina, se agregaron 100 µl del antisuero contra histamina (generado en cabra) y se incubó durante 20 h con agitación (20-25°C). Se eliminó el contenido de los pozos y se lavó cuatro veces. Se secó la placa en posición invertida sobre papel absorbente, se añadieron 100 µl del anticuerpo conjugado con peroxidasa (inmunoglobulinas anti-cabra generados en conejo) y se incubó durante 30 min con agitación (20-25°C).

Se eliminó el contenido líquido de los pozos y se lavó cuatro veces. La placa se secó en posición invertida sobre papel absorbente, se añadieron 100 µl de TMB (3,3,5,5-tetrametilbencidina) como sustrato de la peroxidasa, se incubó durante 30 min con agitación (20-25°C) y la absorbancia se determinó a 495 nm de longitud de onda en un sistema de detección múltiple (GloMax®, Promega, Madison, WI, USA). La concentración de histamina se determinó tomando como referencia la curva con concentraciones conocidas (0, 0.5, 1.5, 5, 15, 50 ng/ml). La sensibilidad del ensayo es de 0.3-125 ng/ml de acuerdo al proveedor. Los resultados fueron normalizados con base en la cantidad (~3 mg/ml) de proteína presente en cada muestra, determinada por el método de Bradford (Friedenauer y Berlet, 1989; Bradford, 1976).

## 5. Resultados

### 5.1 Efecto de la diabetes materna en la expresión y localización de los marcadores SATB2, FOXP2 y TBR1 de la CxM1 en neonatos P0

La expresión del RNAm (Figura 3A) del factor de transcripción Satb2 en los neonatos (P0), no fue estadísticamente diferente entre los grupos experimentales, mientras que la proteína aumentó ( $218 \pm 15\%$ ) en la corteza cerebral de los productos de madres diabéticas (Figura 3B).

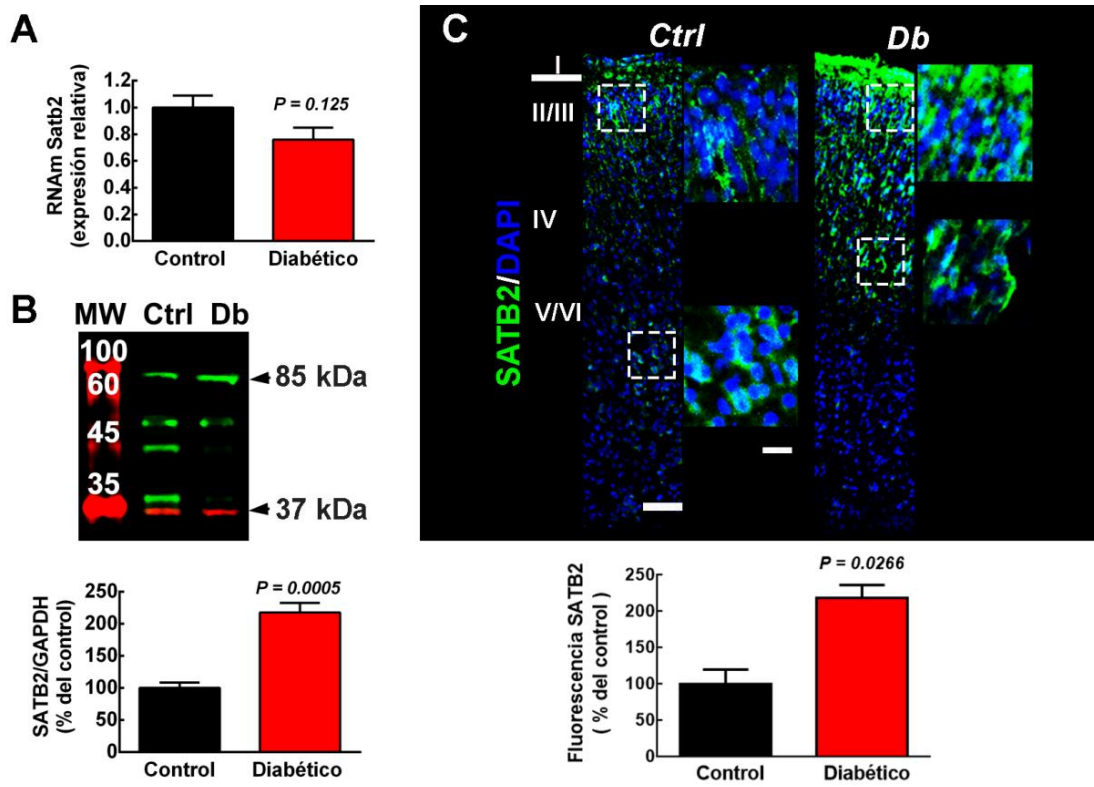
En el análisis por inmunofluorescencia se observa que en P0, SATB2 se expresa en un gradiente en el grupo control (Ctrl) que disminuye conforme se avanza de las láminas I-IV a las V/VI, mientras que en las de crías de madres diabéticas (Db) aumenta la fluorescencia de las láminas II/III y IV, pero se reduce en V/VI, exhibiendo también un cambio en el arreglo citoarquitectónico en P0 y un aumento significativo en la intensidad de la señal fluorescente (Figura 3C).

El RNAm del factor de transcripción Tbr1 aumentó  $4.17 \pm 0.75$  veces en la corteza cerebral frontal del grupo Db con respecto al Ctrl en P0 (Figura 4A). Sin embargo, la proteína no mostró diferencia (Figura 4B).

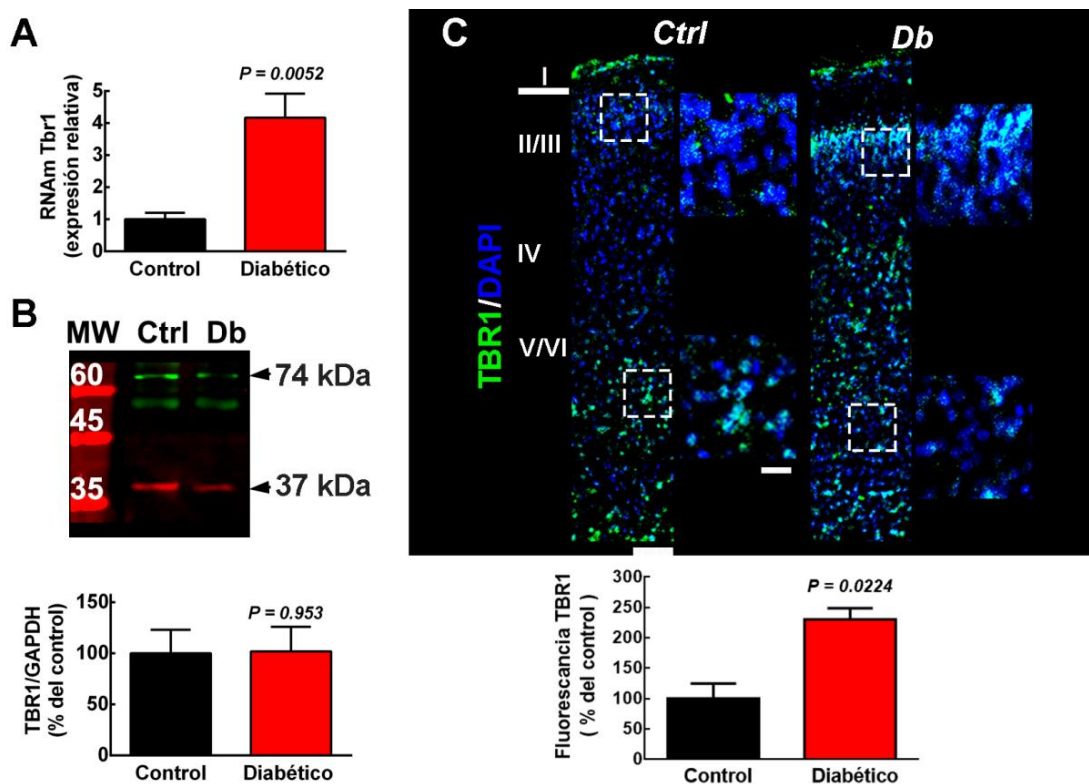
En el grupo Ctrl, TBR1 (verde) se distribuye en forma de un gradiente en la CxM1 que disminuye de las láminas V/VI a las I/IV. Notoriamente, la señal aumenta y el patrón de distribución en el grupo Db cambia, expresándose ahora a lo largo de las a lo largo de las láminas I-VI de la corteza cerebral (Figura 4C).

El RNAm del factor de transcripción Foxp2 aumenta  $2.45 \pm 0.20$  veces en las crías del grupo Db con respecto a las del Ctrl (Figura 5A) e, igualmente, la proteína aumenta significativamente (Figura 5B).

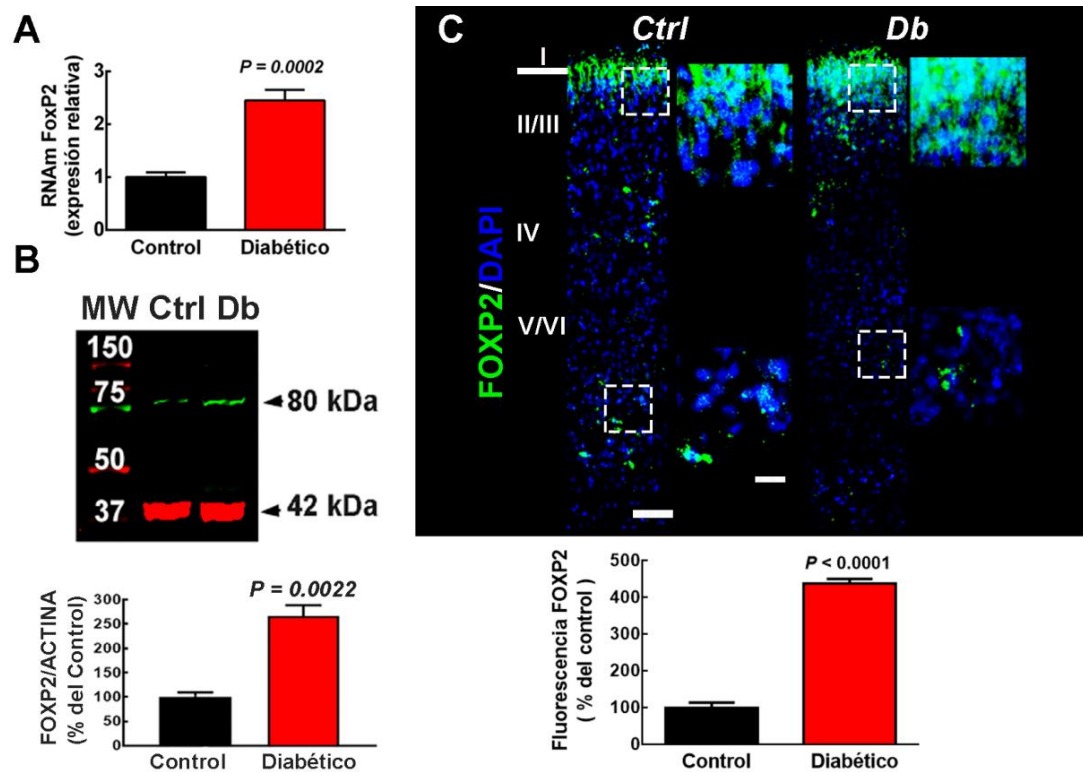
FOXP2 (verde) se distribuye tanto en las láminas superiores (I/III) como en las láminas inferiores (V/VI) en el grupo Ctrl, mientras que lo hace primordialmente en las láminas superiores (I/III) en el grupo Db (Figura 5C).



**Figura 3. Expresión y distribución del factor de transcripción SATB2 en la corteza motora primaria de neonatos (P0) de ratas control y diabéticas.** **A)** Expresión relativa del RNAm de Satb2 en la corteza cerebral frontal del grupo control (n=4) y diabético (n=3) utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . **B)** Arriba. Western Blot representativo que muestra la banda correspondiente a SATB2 (verde, ~85 kDa) y GAPDH (rojo, ~37 kDa) en la corteza cerebral frontal de los neonatos de los grupos control (Ctrl) y diabético (Db). Abajo. Análisis cuantitativo de la razón de fluorescencia SATB2/GAPDH de 5 experimentos por grupo. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son los promedios  $\pm$  EEM. **C)** Arriba. Imágenes representativas de la reconstrucción de 4 de micrografías (10 $\times$ ) de la inmunodetección de SATB2 (verde) en la corteza motora primaria de los grupos Ctrl y Db en P0. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI (3-4 experimentos). Derecha Los cuadros muestran un aumento electrónico (400%) de las regiones enmarcadas con líneas discontinuas en la parte superior e inferior de la corteza motora primaria. Las barras de escala corresponden a 50 y 25  $\mu$ m para la imagen 10 $\times$  y el aumento, respectivamente. Abajo- Análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de SATB2. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son promedios  $\pm$  EEM. En todos los casos el análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.



**Figura 4. Expresión y distribución del factor de transcripción TBR1 en la corteza motora primaria de neonatos (P0) de ratas control y diabéticas.** **A)** Expresión relativa del RNAm de Tbr1 en la corteza cerebral frontal del grupo control (n=4) y Diabético (n=3) utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . **B)** Arriba. Western Blot representativo que muestra la banda correspondiente a TBR1 (verde, ~74 kDa) y GAPDH (rojo, ~37 kDa) en los neonatos de los grupos control (Ctrl) y diabético (Db). Abajo. Análisis cuantitativo de la razón de fluorescencia de TBR1/GAPDH de 5 experimentos por grupo. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son los promedios  $\pm$  EEM. **C)** Arriba. Imágenes representativas de la reconstrucción de 4 micrografías (10 $\times$ ) de la inmunodetección de TBR1 (verde) en la corteza motora primaria de los grupos Ctrl y Db en P0. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI (3-4 experimentos). Derecha. Los cuadros muestran el aumento electrónico (400%) de las regiones enmarcadas con líneas discontinuas en la parte superior e inferior en la corteza motora primaria. Las barras de escala corresponden a 50 y 25  $\mu$ m para la imagen 10 $\times$  y el aumento, respectivamente. Abajo. Análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de TBR1. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son promedios  $\pm$  EEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.



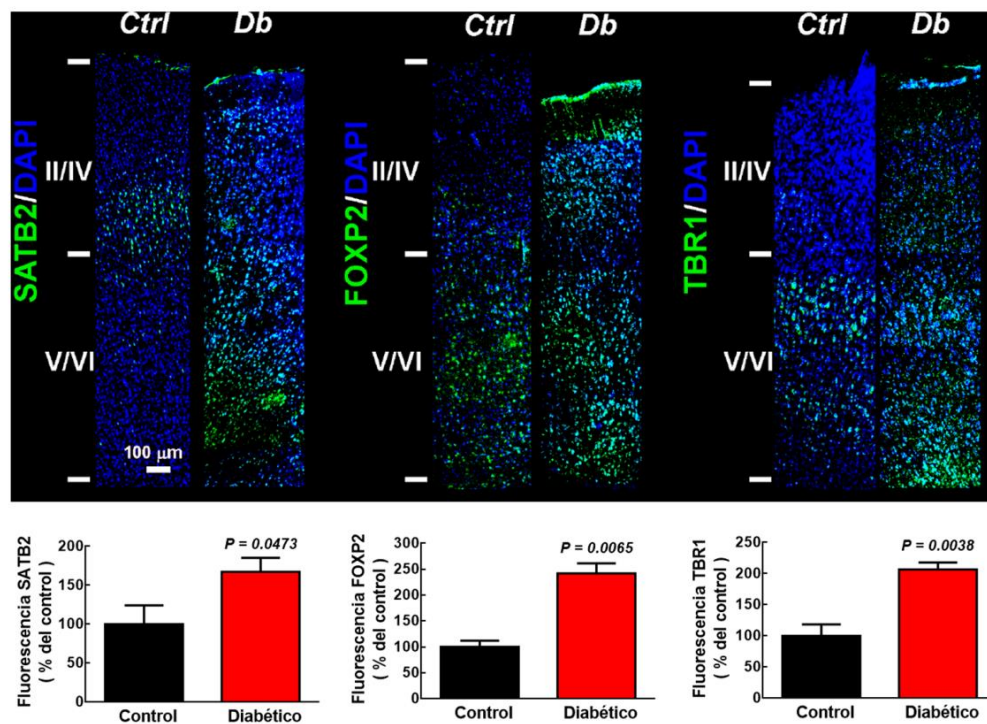
**Figura 5. Expresión y distribución del factor de transcripción FOXP2 en la corteza motora primaria de neonatos (P0) de ratas control y diabéticas.** **A)** Expresión relativa del RNAm de Foxp2 en la corteza cerebral frontal del grupo control (n = 5) y diabético (n = 4) utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . **B)** Arriba. Western Blot representativo que muestra la banda correspondiente a FOXP2 (verde, 80 kDa) y  $\alpha$ -actina (rojo, 42 kDa) en los neonatos de los grupos control (Ctrl) y diabético (Db). Abajo. Análisis cuantitativo de la razón de fluorescencia FOXP2/ $\alpha$ -actina de 5 experimentos. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son los promedios  $\pm$  EEM. **C)** Imágenes representativas de la reconstrucción de 4 micrografías (10 $\times$ ) de la inmunodetección de FOXP2 (verde) en la corteza motora primaria de los grupos Ctrl y Db en P0. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI (n = 3-4 experimentos). Derecha. Los cuadros muestran un aumento electrónico (400%) de las regiones enmarcadas con líneas discontinuas en parte superior e inferior en la corteza motora primaria. Las barras de escala corresponden a 50 y 25  $\mu$ m para la imagen a 10 $\times$  y el aumento, respectivamente. Abajo. Análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de FoxP2. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son promedios  $\pm$  EEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

El cambio en la distribución de los tres marcadores aquí estudiados, como resultado de la hiperglucemia materna, sugiere que los procesos de diferenciación y migración de las neuronas piramidales que integran a la corteza motora primaria, están alterados en los productos de madres diabéticas en P0.



## 5.2. Efecto a largo plazo de la diabetes materna en la localización de los marcadores SATB2, FoxP2 y TBR1 de la CxM1 en ratas postnatales 21 (P21)

A fin de determinar si la diabetes materna altera la distribución de los marcadores de láminas corticales a largo plazo, se analizó la localización de SATB2, FOXP2 y TBR1 en la CxM1 de animales P21. La inmunodetección reveló que en el grupo Ctrl SATB2 se localiza en las láminas IV y V, mientras que FOXP2 y TBR1 se observan en las láminas profundas V y VI (Figura 6).



**Figura 6. Distribución de los marcadores de láminas corticales SATB2, FOXP2 y TBR1 en la corteza motora primaria de crías de 21 días de edad (P21) de ratas control y diabéticas.** Arriba. Imágenes representativas de la reconstrucción de 4 de micrografías (10×) de la inmunodetección de SATB2, FOXP2 y TBR1 (verde) en la corteza motora primaria de los grupos control (Ctrl) y diabético (Db) en P21. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI (3-4 experimentos). La barra de escala corresponde a 100 µm. Abajo. Análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de SATB2, FoxP2 y TBR1. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son promedios ± EEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada (3 experimentos).

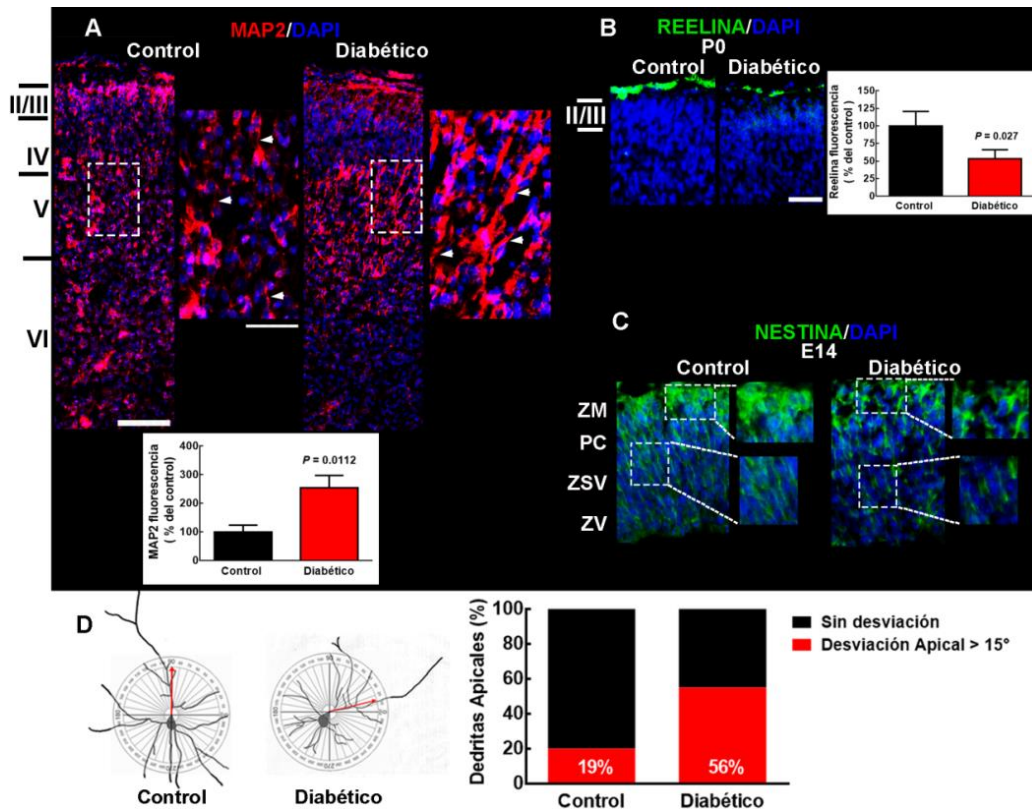
En las crías de madres diabéticas se observó una distribución anormal de los tres marcadores a lo largo de las láminas II-VI de la CxM1, mostrando un desarreglo citoarquitectónico de la CxM1 en la edad P21 (Figura 6).

### **5.3. Efecto de la diabetes materna en la inmunodetección de MAP2 y de reelina en neonatos (P0)**

Los cambios observados en la distribución de los marcadores SATB2, FOXP2 y TBR1 en los productos de madres diabéticas sugieren alteraciones en los procesos de diferenciación y migración neuronales, por lo que el siguiente objetivo fue determinar si la diabetes materna afectaba la expresión del marcador neuronal MAP2, expresado en las dendritas, y de la glicoproteína reelina, señal de alto para la migración neuronal, expresada por las CR en la MZ de la CxM1. Para este fin, se analizó la inmunofluorescencia en cortes coronales de cerebro que incluyeran a la CxM1 de neonatos (P0) de ambos grupos experimentales.

En el grupo control, la inmunodetección de MAP2 mostró que surgen procesos dendríticos a lo largo de las seis láminas de la CxM1, entre ellos los procesos apicales de las neuronas piramidales (Figura 7A). En contraste, en las crías de ratas diabéticas la marca de MAP2 muestra procesos apicales inclinados y concentrados en las láminas II-IV de la CxM1, lo que sugiere alteraciones en el proceso de migración neuronal (Figura 7A).

Si hay alteraciones en la migración, cabe esperar que las proteínas reelina en P0 y nestina en E14, que constituyen la señal (reelina) y el andamio (nestina) de migración de los neuroblastos, cambien su localización. Para P0 en el grupo Db se observó una menor señal fluorescente de reelina en la región apical de la corteza cerebral, en relación al grupo Ctrl (Figura 7B), y la señal de nestina exhibió un patrón estructural discontinuo general y no radial en la zona marginal, que difiere del continuo y radial del grupo Ctrl (Figura 7C).



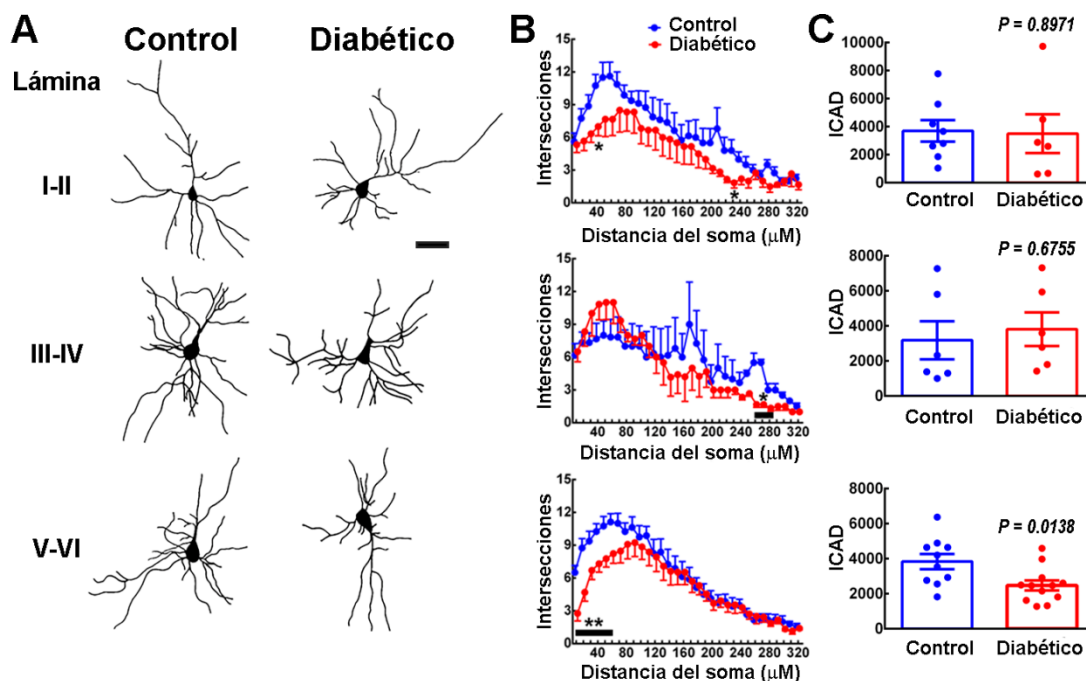
**Figura 7. Evaluación de los marcadores de migración y de establecimiento de polaridad neuronal de embriones (E14) y crías (P0 y P21) de ratas control y diabéticas.** A) Arriba. Imágenes representativas de la reconstrucción de 4 micrografías (10×) de la inmunodetección de MAP2 (rojo) en la corteza motora primaria de los grupos control y diabético en P0. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Los cuadros muestran un aumento electrónico (200%) de las regiones enmarcadas con líneas discontinuas de la parte intermedia de la corteza cerebral. Las barras de escala corresponden a 100 y 50  $\mu\text{m}$  para las reconstrucciones y el aumento electrónico, respectivamente. Abajo, Análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de MAP2 de 3 experimentos. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son promedios  $\pm$  EEM. B) Izquierda. Imágenes representativas (20×) de la región superior de la corteza motora primaria de la inmunodetección de reelina (verde) de los grupos control y diabético en P0. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI. La barra de escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$ . Derecha. Análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de reelina de 3 experimentos. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son promedios  $\pm$  EEM. El análisis estadístico en A y B se realizó con la prueba *t* de *Student* no pareada. C) Imágenes representativas (20×) del neuroepitelio cortical E14 en donde se observa la marca para nestina (verde) de los grupos control y diabético. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Los rectángulos muestran un aumento electrónico (200%) de las regiones enmarcadas con líneas discontinuas en la zona marginal (ZM) y placa cortical (PC). ZV, zona ventricular; ZSV, zona subventricular. D) Izquierda. Dibujos representativos de las reconstrucciones de las neuronas piramidales teñidas con el método de Golgi-Cox de crías P21 de ratas control y diabéticas. Se muestra una circunferencia (180°) como referencia para determinar el ángulo de inserción de la dendrita apical en el soma (flechas rojas). Derecha. Histograma que muestra el porcentaje de alteraciones en el ángulo de inserción de la dendrita apical, sin desviación (negro) y con desviación  $> 15^\circ$  (rojo).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la diabetes induce una migración neuronal aberrante en los embriones de las ratas, lo que se confirma por presencia de neuronas ectópicas en la lámina I (P21) en el grupo Db que se desplazan de manera anormal en ausencia de una señal de alto.

A largo plazo, una migración aberrante promovería o resultaría en alteraciones de la polaridad neuronal. Para analizar esta posibilidad, rebanadas de cerebro se tiñeron con el procedimiento clásico de Golgi-Cox y se midió el ángulo de inserción de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la CxM1 (Figura 7D). El 55% de las neuronas piramidales del grupo Db presentaron una desviación del ángulo de la dendrita principal, fenómeno que solo se presenta en el 19% del grupo Ctrl (Figura 7D). Estos resultados muestran que en los productos de madres diabéticas las neuronas desarrollan una polaridad anormal.

#### **5.4. Efecto de la diabetes materna en la complejidad y estructura del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la CxM1 en ratas de 21 días de edad postnatal (P21)**

Otra alteración estructural de las neuronas podría ser la disminución de la complejidad del árbol dendrítico. A partir de las tinciones de Golgi-Cox se reconstruyeron imágenes de neuronas piramidales de los cortes coronales que contenían a la CxM1, en las crías de edad P21, a partir de las cuales se realizó el análisis de Sholl y se calculó el índice de complejidad del árbol dendrítico (ICAD; Figura 8). Notablemente, la diabetes materna indujo una disminución significativa de las intersecciones dendríticas de las neuronas piramidales de las láminas corticales I-II (~40 y 230  $\mu\text{m}$ ), III-IV (~250  $\mu\text{m}$ ), y V-VI (~10 y 60  $\mu\text{m}$ ), con relación al grupo Ctrl (Figura 8B). Sin embargo, solo las neuronas piramidales de las láminas profundas V y VI presentaron disminución del índice de complejidad del árbol dendrítico, en comparación con el grupo Ctrl (Figura 8C).



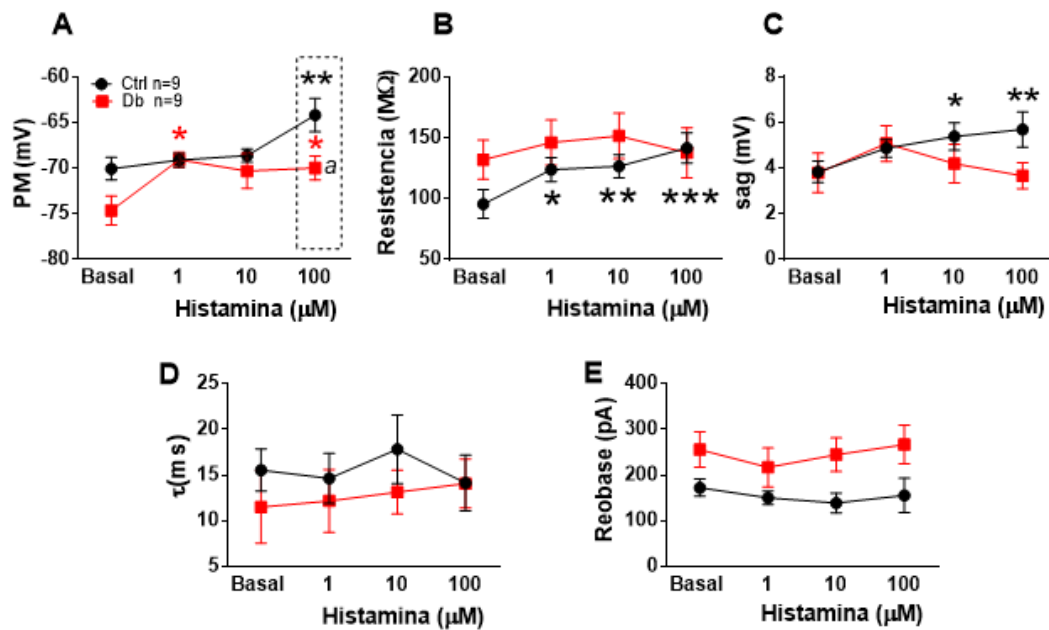
**Figura 8. Análisis del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de crías de 21 días de edad (P21) de ratas control y diabéticas.** A) Dibujos representativos de las reconstrucciones de neuronas piramidales de las láminas corticales I a VI de la corteza motora primaria del grupo control y diabético teñidas con el método de Golgi-Cox. La barra corresponde a 100  $\mu\text{m}$ . B) Análisis de Sholl. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  EEM del valor de la intersección de las dendritas en relación con la distancia del soma, del grupo control (azul) y el diabético (rojo) para cada par de láminas. \* $P < 0.5$ , \*\*  $P < 0.001$  comparado con el grupo control; prueba  $t$  de *Student* múltiple. C) Análisis del índice de complejidad del árbol dendrítico (ICAD). Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  EEM del ICAD de las neuronas de las ratas del grupo control (barras azules) y diabético (barras rojas), para cada par de láminas. El análisis estadístico se realizó con la prueba  $t$  de *Student* no pareada (6-12 neuronas).

### 5.5. Efecto de la diabetes materna en la excitabilidad neuronal de la CxM1 en ratas de 21 días de edad (P21)

Los importantes cambios estructurales detectados sugerían que la función de las neuronas también había cambiado. Para evaluar la funcionalidad neuronal se analizaron las propiedades eléctricas pasivas y/o activas en presencia y ausencia de

histamina, un neuromodulador que aumenta la excitabilidad de las neuronas piramidales corticales mediante la activación del receptor  $H_1$  ( $RH_1$ ; Haas et al., 2008). Los registros electrofisiológicos se realizaron en las neuronas de las láminas V y VI de las crías de madres control y diabéticas.

La perfusión con histamina despolarizó el potencial de membrana (PM) en reposo, y la resistencia de entrada ( $R_{in}$ ) y la caída del voltaje en respuesta a una corriente hiperpolarizante (*sag*) aumentaron en el grupo Ctrl de forma proporcional a la concentración de histamina (Figura 9; Tabla 3).



**Figura 9. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de las láminas V y VI de crías de 21 días de edad (P21) de ratas control y diabéticas.** Se muestran las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de las capas profundas de la corteza motora primaria del grupo control (Ctrl, azul) y diabético (Db, rojo): **A)** Potencial de membrana en reposo (PM). **B)** Resistencia de membrana. **C)** Amplitud del *sag* o caída del voltaje en respuesta a una corriente hiperpolarizante. **D)** Constante de tiempo ( $\tau$ ). **E)** Corriente de rebase. Los valores son promedios  $\pm$  EEM de 9 neuronas de 3 animales diferentes de camadas distintas por grupo. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs basal; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs el grupo Control. El análisis estadístico se realizó con ANOVA Mixto de Medidas Repetidas y la prueba de Sidak. Ctrl: Grupo Control; Db: Grupo Diabético.

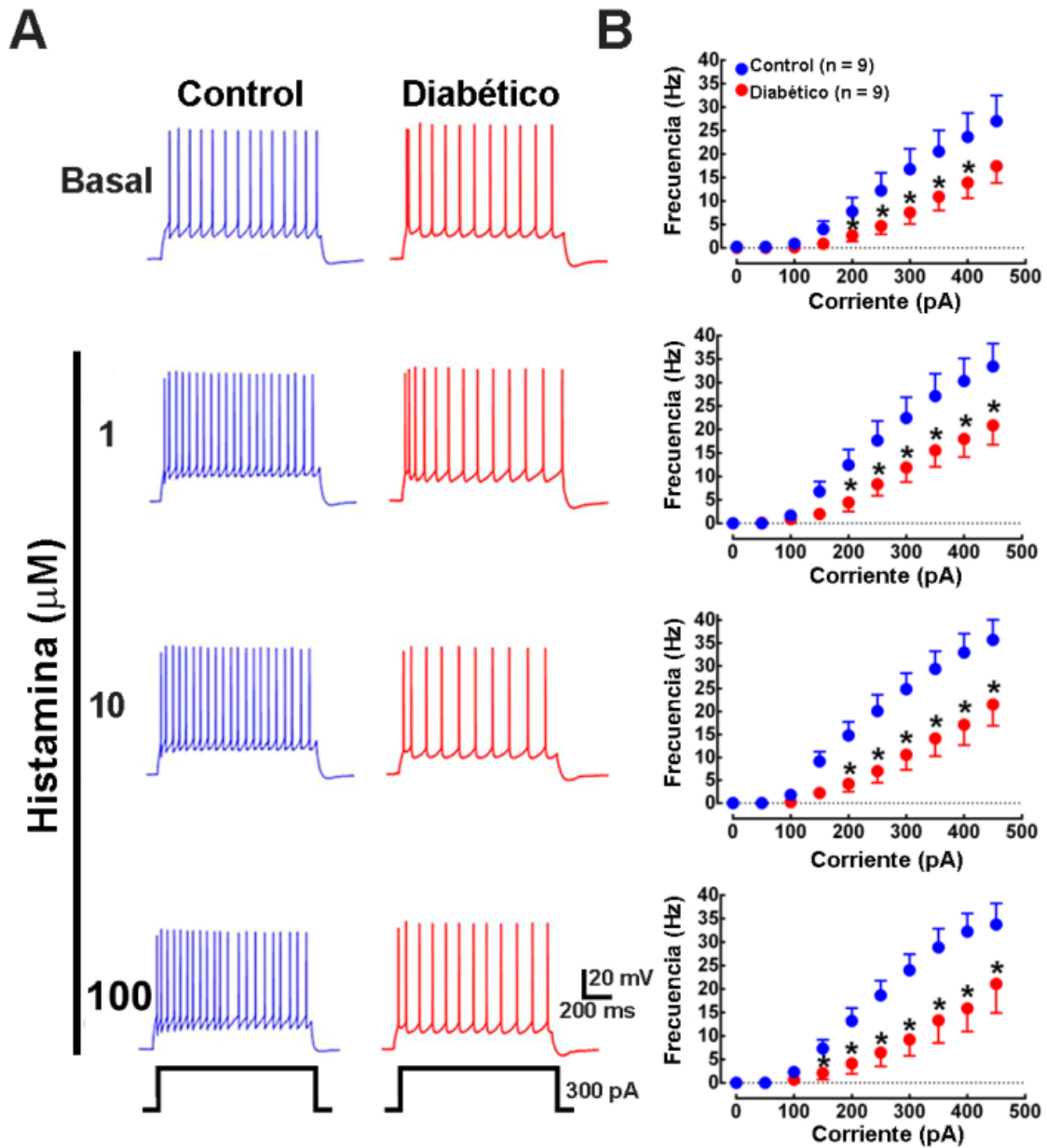
Por otra parte, el PM de las neuronas de animales del grupo diabético se despolarizó significativamente en respuesta a 1 y 100  $\mu\text{M}$  de histamina, y mostró hiperpolarización en relación al grupo Ctrl en respuesta a la concentración más alta de histamina (100  $\mu\text{M}$ ; Tabla 3). Estos resultados sugieren que en los animales del grupo Db existen alteraciones en las propiedades biofísicas de los canales de  $\text{K}^+$  de las neuronas piramidales corticales de las láminas profundas.

**Tabla 3. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza cerebral de crías de 21 días de edad de ratas control y diabéticas.**

	Control				Diabetes			
	Basal	HA (1 $\mu\text{M}$ )	HA (10 $\mu\text{M}$ )	HA (100 $\mu\text{M}$ )	Basal	HA (1 $\mu\text{M}$ )	HA (10 $\mu\text{M}$ )	HA (100 $\mu\text{M}$ )
RMP (mV)	-70.0 $\pm$ 1.2	-69.1 $\pm$ 0.7	-68.6 $\pm$ 0.7	-64.1 $\pm$ 0.8**	-74.6 $\pm$ 1.5	-69.0 $\pm$ 0.8*	-70.3 $\pm$ 1.9	-69.9 $\pm$ 1.3* <sup>a</sup>
Rin (M $\Omega$ )	95.5 $\pm$ 11.8	122.9 $\pm$ 11.0*	126.6 $\pm$ 10.0**	144.6 $\pm$ 15.4***	132.0 $\pm$ 16.0	146.1 $\pm$ 18.5	151.6 $\pm$ 18.7	137.7 $\pm$ 20.5
$\tau$ (ms)	15.5 $\pm$ 2.3	14.6 $\pm$ 3.2	17.8 $\pm$ 3.7	14.1 $\pm$ 3.0	11.5 $\pm$ 3.9	12.8 $\pm$ 3.4	13.1 $\pm$ 2.3	14.0 $\pm$ 2.6
Rheobase (pA)	172.2 $\pm$ 18.8	150.0 $\pm$ 14.4	138.8 $\pm$ 21.6	155.5 $\pm$ 37.6	255.5 $\pm$ 38.5	216.6 $\pm$ 42.4	244.4 $\pm$ 36.7	266.6 $\pm$ 42.4
Sag (mV)	3.8 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.6*	5.6 $\pm$ 0.7***	3.7 $\pm$ 0.85	5.0 $\pm$ 0.7	4.1 $\pm$ 0.8	3.6 $\pm$ 0.5

Los valores son promedios  $\pm$  EEM de 9 neuronas de 3 animales diferentes de camadas distintas por grupo. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs basal; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs el grupo Control. El análisis estadístico se realizó con ANOVA Mixto de Medidas Repetidas y la prueba de Sidak.

Para evaluar si la diabetes materna modifica la excitabilidad de las neuronas piramidales de la CxM1, se aplicaron pulsos de corriente despolarizante de 0 a 500 pA, en incrementos de 50 pA y con duración de 1 s, y se determinó el número de potenciales de acción generados. En la condición basal, en el grupo Db disminuyó la frecuencia de disparo en comparación con el grupo Ctrl, mientras que en presencia de histamina (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) las neuronas del grupo Db mostraron una menor excitabilidad con respecto a las neuronas del grupo Ctrl (Figura 10).



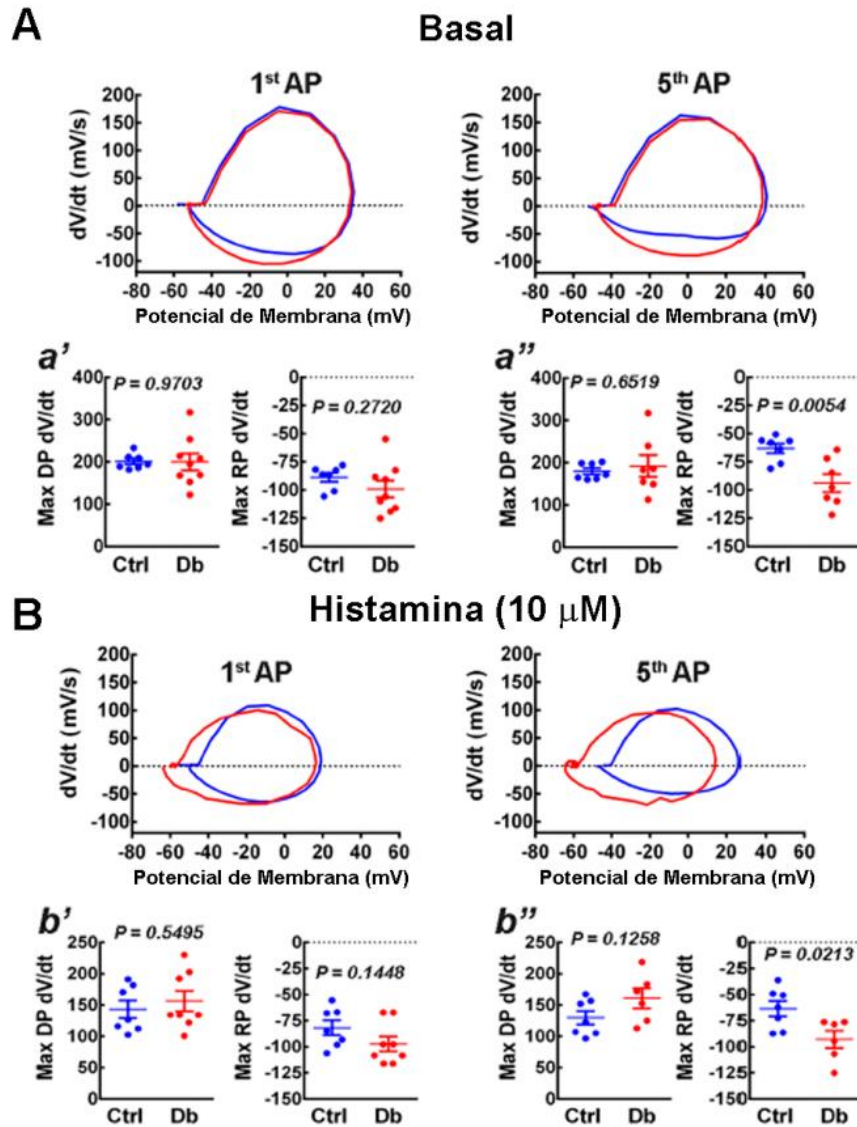
**Figura 10. La diabetes materna disminuye la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza motora primaria de crías de 21 días de edad (P21).** A) Trazos representativos de los potenciales de acción evocados por la aplicación de una corriente de 300 pA durante 1 s en condiciones basales, y en presencia de histamina (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ), en el grupo control (azul) y diabético (rojo). B) Análisis de la frecuencia de disparo (número de potenciales de acción) en respuesta a la inyección de pulsos de corriente (I, pA), en condición basal y en presencia de histamina en el grupo control (azul) y diabético (rojo). Los puntos son promedios  $\pm$  EEM de los valores obtenidos de 9 neuronas de al menos 3 animales diferentes de camadas distintas por grupo. \* $P < 0.05$  vs el grupo control, ANOVA de Medidas Repetidas y prueba de Sidak.



Para evaluar si los efectos observados en el grupo Db estaban relacionados con modificaciones en el contenido tisular de histamina o en la expresión del RH<sub>1</sub>, se determinó el contenido de histamina y la densidad del receptor en la corteza frontal de las crías P21. Los ensayos de unión con radioligando no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Ctrl y Db en la densidad del RH<sub>1</sub> ( $50 \pm 4$  y  $52 \pm 9$  fmol/mg de proteína, respectivamente), mientras que los ensayos de ELISA mostraron un aumento en el contenido cortical de histamina en el grupo Db con relación al grupo Ctrl ( $354 \pm 19$  y  $261 \pm 35$  ng/mg de proteína, respectivamente;  $P = 0.0476$ , prueba *t* de *Student* no pareada). La mayor disponibilidad de la amina podría inducir una mayor excitabilidad de las neuronas del grupo Db; sin embargo, se observó el resultado opuesto (Figura 10), por lo que se realizó un análisis más detallado de las propiedades de los potenciales de acción.

Para determinar la velocidad máxima de la fase de despolarización (Max DP dV/dt) debida a corrientes de sodio (Na<sup>+</sup>) y la velocidad máxima de la fase de repolarización (Max RP dV/dt), debida principalmente a corrientes de K<sup>+</sup>, se construyeron diagramas de fase, graficando la primera derivada del potencial de membrana con respecto al tiempo y el potencial de membrana de cada potencial de acción (Figura 11A).

El análisis de la primera y la quinta espigas de los trenes de potenciales de acción muestra que la velocidad máxima de repolarización aumenta en la quinta espiga de las neuronas de crías del grupo Db, tanto en condiciones basales como en presencia de 10 μM de histamina (Figura 11, A y B), indicando modificaciones en las propiedades biofísicas de los canales de K<sup>+</sup> de las neuronas piramidales de las láminas profundas de la CxM1 en las crías de ratas diabéticas.



**Figura 11. Análisis de los diagramas de fase de los potenciales de acción de las neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza motora primaria de las crías de 21 días de edad (P21) de ratas control y diabéticas. A y B) Diagramas de fase representativos de la primera (1<sup>st</sup> AP) y la quinta (5<sup>th</sup> AP) espigas de un tren de potenciales de acción de las neuronas piramidales de las láminas V y VI, del grupo control (Ctrl; azul) y diabético (Db; rojo), en condiciones basales (A) o en presencia de 10  $\mu$ M de histamina (B). Los potenciales de acción fueron evocados por inyección corriente (300 pA, 1 s). El análisis se realizó obteniendo la velocidad máxima de las fases de despolarización y repolarización del 1<sup>st</sup> AP (a<sup>1</sup>; Max DP dV/dt y Max RP dV/dt) y del 5<sup>th</sup> AP (a<sup>2</sup>; Max DP dV/dt y Max RP dV/dt) en condiciones basales, y del 1<sup>st</sup> AP (b<sup>1</sup>; Max DP dV/dt y Max RP dV/dt) y 5<sup>th</sup> AP (b<sup>2</sup>; Max DP dV/dt y Max RP dV/dt) en presencia de histamina. Los valores son promedios  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student.**

## 6. Discusión

La Diabetes Mellitus gestacional (DMG) es un problema de Salud Pública que afectó a 20.4 millones de nacimientos en el año 2019 a nivel mundial, lo que representa el 15.8% del total de los nacimientos (*International Diabetes Federation*, 2019) y se ha demostrado que la hiperglucemia materna disminuye la memoria de trabajo, las habilidades gráficas y espaciales, el coeficiente intelectual y retrasa el desarrollo motor (Ornoy et al., 1999, 2001; Bolaños et al., 2015; Márquez-Valadez et al., 2018). La hipótesis de la programación fetal para enfermedades neurológicas en la infancia sostiene que los factores ambientales determinan el desarrollo embrionario del SNC, cambiando la citoarquitectura y función neuronal después del nacimiento y aumentando la susceptibilidad a enfermedades crónicas, incluyendo trastornos neuropsiquiátricos, durante la infancia y la adultez. La hiperglucemia materna podría actuar como uno de estos factores ambientales para el feto.

En la actualidad, para los humanos se conoce poco de los mecanismos por los cuales la hiperglucemia materna ocasiona alteraciones cognitivas en los hijos de madres diabéticas. En este trabajo se utilizó un modelo murino de diabetes gestacional, inducida por la administración de estreptozotocina, para investigar cambios en la expresión de factores de transcripción importantes para el establecimiento de vías cortico-corticales y extra-corticales, así como posibles alteraciones en la citoarquitectura, forma y función neuronal de la corteza cerebral de las crías de ratas diabéticas.

El aumento de la cantidad de RNAm de dos de tres marcadores neuronales corticales (Foxp2 y Tbr1) en la corteza frontal de neonatos de ratas diabéticas sugiere aumento de la neurogénesis cortical, como se ha demostrado en el telencéfalo dorsal de embriones de rata y ratón en condiciones hiperglucémicas (Fu et al., 2006; Solís et al., 2017). A nivel de la proteína, se observó un aumento significativo de FOXP2 y SATB2, pero no de TBR1. La discrepancia entre el aumento de SATB2, pero no de su RNAm, podría deberse a que la proteína es más estable o a que se traduce más rápidamente. La discrepancia de TBR1 puede explicarse por cambios en la regulación

post-transcripcional del RNAm, probablemente por microRNAs. No se conoce el perfil de expresión de microRNAs en el cerebro de las crías de madres diabéticas, pero Lamadrid-Romero y cols. (2017) identificaron microRNAs, incluido el miR-183-5p, relacionados con la proliferación y la neurogénesis que aumentan en el suero de mujeres con diabetes gestacional en el segundo y tercer trimestres del embarazo. Cabe destacar que *Tbr1* posee un sitio de regulación por miR-183-5p conservado entre especies (Friedman et al., 2009).

Un aumento en la expresión de microRNAs en los productos de madres diabéticas, generado por la hiperglucemia materna, podría ocurrir en la corteza frontal de las crías de ratas diabéticas, tal como se ha observado en el músculo esquelético de los hijos adultos de mujeres que padecieron DMG, en el que aumentan miR-15a y miR-15b, microRNAs involucrados en la regulación de la síntesis y señalización de la insulina (Houshmand-Oeregaard y cols. 2018). Esta posibilidad se estudiará en el futuro.

El análisis de inmunofluorescencia mostró que SATB2, TBR1 y FOXP2 aumentan en la CxM1 de neonatos y crías P21 de ratas diabéticas. El aumento selectivo en la CxM1 contrasta con el efecto generalizado mostrado por qRT-PCR y Western blot, y puede explicarse por el origen de las muestras, CxM1 para el estudio de inmunihistofluorescencia o corteza cerebral frontal para los análisis de RNAm y Western blot. Por lo tanto, es necesario determinar el RNAm y la proteína de cada factor de transcripción en la CxM1 para detectar algún tipo de regulación post-traduccionál específica.

Los cambios en la distribución de SATB2, FOXP2 y TBR1 en la CxM1 de las crías de ratas diabéticas, concuerdan con un aumento hipotético de la migración neuronal, producto de la disminución de reelina en P0 y de la discontinuidad de las fibras de nestina en E14. La ausencia de reelina posicionaría a las neuronas corticales fuera de las láminas que les corresponden (Lee y D'Arcangelo, 2016), tal como lo muestra el que en los neonatos de madres diabéticas aumenta la marca de los factores de transcripción en la superficie de la CxM1, y que FOXP2 y TBR1 se expanden a las láminas superiores en las edades P0 y P21.

SATB2, FOXP2 y TBR1 participan en el establecimiento del patrón de conectividad funcional de la corteza cerebral (Mckenna et al., 2011; Lodato y Arlotta, 2015; Leone et al., 2015), necesario para la ejecución de programas motores y cognitivos. Su distribución aberrante en la corteza motora primaria de las crías del grupo diabético, concuerda con alteraciones en el establecimiento de los circuitos neuronales.

SATB2 regula el desarrollo de las ScPN que se localizan en las láminas V/VI, y del cuerpo calloso, por lo que los cambios reportados en esta tesis concuerdan con una estratificación cortical y un establecimiento defectuoso de las vías cortico-corticales y cortico-estriatales (Mckenna et al., 2011; Leone et al., 2015). La ausencia de SATB2 se relaciona con deficiencias en la formación del cuerpo calloso y con desviaciones de las proyecciones de las neuronas de las láminas superiores hacia regiones subcerebrales. Por su parte, TBR1 especifica a las CThPN y en su ausencia las neuronas de la lámina VI se distribuyen ectópicamente y no se establecen apropiadamente las vías cortico-talámica y cortico-cortical (Mckenna et al., 2011; Hevner et al., 2001). Por lo anterior, es posible que las modificaciones en la distribución de las neuronas piramidales de proyección y el origen de las vías cortico-talámica, cortico-estriatal, cortico-corticales y del cuerpo calloso, alteren el establecimiento de las conexiones sinápticas respectivas en los productos de madres diabéticas.

En la ontogenia, el factor de transcripción FOXP2 ha sido relacionado con la adquisición y ejecución de secuencias motoras para el aprendizaje del lenguaje en los humanos, canto en las aves y emisión de VUs en roedores (Groszer et al., 2008; Enard et al., 2009; Tsui et al., 2013; Vicario, 2013; Castelluci et al., 2016, 2017; Chabout et al., 2016; Chen et al., 2016). Para los humanos se ha reportado que los hijos de madres diabéticas en edad escolar presentan retardo en el aprendizaje motor y del lenguaje (Ornoy et al., 1999 y 2001; Bolaños et al., 2015) y, hasta donde tenemos conocimiento, esta tesis representa el primer estudio de la expresión postnatal de FOXP2 en la corteza cerebral de los productos de ratas diabéticas. El aumento en la expresión de FOXP2 y la distribución ectópica de las neuronas piramidales de proyección FOXP2<sup>+</sup> encontrados en este trabajo en las crías P0 y P21,

indican que las crías de madres diabéticas podrían presentar alteraciones en la emisión de VUs y en el movimiento voluntario relacionado con este tipo de comunicación, ya que se ha reportado que en los roedores FOXP2 participa en el desarrollo del circuito cortico-estriatal, necesario para la ejecución de las VUs (Enard, 2011).

Cabe señalar que en este trabajo los factores de transcripción estudiados se localizaron en el núcleo y citoplasma en las crías P0 de ratas control y diabéticas. Los factores de transcripción ejercen su función en el núcleo; sin embargo, pueden arribar al citoplasma como resultado de modificaciones post-traduccionales, como la SUMOilación y la fosforilación (Wen et al., 2017; Chen et al., 2013; Johnson, 2004).

Los resultados de esta tesis sugieren que al momento del sacrificio (2 h después del nacimiento), estos factores de transcripción podrían estar inactivos y/o tener blancos distintos a los reportados en la corteza cerebral adulta. Lo anterior es apoyado por el hecho que tanto FOXP2 como SATB2 poseen secuencias consenso de SUMOilación y fosforilación (Szemes et al., 2006; Sheehan-Rooney et al., 2010; Goswami et al., 2012; Meredith et al., 2016; Blane et al., 2018). En particular, la SUMOilación depende de la expresión de la enzima Ubc9, y Watanabe y cols. (2008) reportaron la presencia del RNAm de Ubc9 en la corteza cerebral de la rata en P0, P7, P14, P20 y a los tres meses de edad, mostrando que la expresión postnatal más alta de Ubc9 ocurre en P0, y la más baja en la corteza cerebral adulta. Aunque el patrón de expresión de la proteína Ubc9 muestra una tendencia similar a la del RNAm, la expresión de éste se evaluó únicamente en edades posteriores a P7. Por lo anterior, es factible que en el estadio P0 la SUMOilación de SATB2 y FOXP2 propicie que permanezcan inactivos en el citoplasma.

Por otro lado, SATB2 tiene dos sitios que se fosforilan en P0, pero no en P21 (Goswami et al., 2012), y la fosforilación de FOXP2 en diversos residuos regula su actividad, como la fosforilación en la Serina 557 (Ser<sup>557</sup>) que impide la unión de FOXP2 al ADN (Blane et al., 2018).

La inclinación de las dendritas que expresan MAP2 en las crías P0 de ratas diabéticas (Figura 7), muestran el desarrollo de una polaridad y crecimiento del árbol dendrítico aberrante, particularmente de la dendrita apical de las neuronas piramidales, que se corrobora con el análisis de la polaridad neuronal en los productos P21 de madres diabéticas.

La polaridad neuronal consiste en la presencia de al menos dos dominios celulares distintos y se desarrolla en el periodo de migración. En la corteza cerebral las neuronas piramidales están altamente polarizadas ya que la dendrita apical, o principal, se orienta hacia la superficie pial mientras que las dendritas basales y el axón se orientan hacia los ventrículos. La señalización reelina-Dab1 promueve el crecimiento de las dendritas en las neuronas del hipocampo (Niu et al., 2004) y de las láminas superficiales de la corteza cerebral (Olson et al., 2006). En explantes de la corteza dorsomedial E13.5 de ratones con fenotipo *reeler* o *scrambler*, las neuronas piramidales de la lámina VI crecen desorganizadamente y expresan dendritas apicales desorientadas, pero mantienen el número normal de procesos y árboles dendríticos de menor complejidad. Este fenotipo se rescata con la re-expresión de reelina (O'Dell et al., 2012). En concordancia con estas observaciones, la disminución de la reelina en crías P0 de ratas diabéticas podría ser la causa de la menor complejidad del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de las láminas profundas observada en este trabajo.

Las propiedades electrofisiológicas de las neuronas dependen de la forma y polaridad neuronales (Elston et al., 2014). Si las neuronas pierden, disminuyen o desorientan su migración en la etapa embrionaria, surgen trastornos neuropsiquiátricos como la epilepsia, retardo mental, trastorno del espectro autista y esquizofrenia (Buchsbaum y Cappello, 2019). La disminución de la complejidad y el número de las dendritas de las neuronas piramidales de las láminas V y VI en el grupo diabético, sugieren que estas neuronas expresan propiedades electrofisiológicas pasivas y activas distintas. La resistencia de entrada ( $R_{in}$ ) y la constante de tiempo ( $\tau$ ) cambiaron consistentemente con la disminución en la complejidad del árbol dendrítico en el grupo diabético. De manera inesperada, en condiciones basales no se observaron diferencias

estadísticamente significativas en las propiedades electrofisiológicas pasivas entre los grupos. Sin embargo, tanto la resistencia de entrada ( $R_{in}$ ) como la constante de tiempo ( $\tau$ ) mostraron cambios que se pueden relacionar con la disminución en la complejidad del árbol dendrítico en el grupo diabético. La  $R_{in}$  mostró una tendencia al aumento en comparación con las neuronas control, mientras que la  $\tau$  fue menor, lo que indica un retorno más rápido al potencial de membrana de reposo con relación a las neuronas control. En conjunto, estas modificaciones sugieren disminución en el área total de las neuronas y/o un aumento en las conductancias de  $K^+$  que permanecen cerradas en el reposo, cambios que se predicen para neuronas con una menor complejidad dendrítica.

La estabilidad de los parámetros electrofisiológicos podría estar relacionada con la edad de los animales al momento de los registros, que probablemente son más estables en los animales adultos, aspecto que requiere estudios posteriores. En este sentido, las neuronas del cerebro adulto ( $\geq 90$  días de edad) de los animales diabéticos, podrían presentar una mayor reducción del árbol dendrítico de las neuronas piramidales y, en consecuencia, cambios significativos en la edad adulta.

La excitabilidad neuronal disminuyó tanto en condiciones basales como en presencia de histamina, probablemente como consecuencia de cambios en las propiedades biofísicas de las conductancias de  $K^+$  que subyacen al potencial de acción; por ejemplo, canales de potasio activados por calcio (BK), miembros de la familia de canales de potasio (Kv4) que regulan la corriente tipo A ( $I_A$ ), y canales Kv3 (Bean, 2007).

En diversas estructuras cerebrales, la histamina excita a las células neuronales mediante la activación de los receptores  $H_1$  y  $H_2$  (McCormick y Williamson, 1991; Ji et al., 2018; Zhuang et al., 2018). El efecto excitatorio mediado por el  $RH_1$  involucra el cierre de canales de  $K^+$  abiertos en el reposo o de fuga (KCNK), la activación del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  y el aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  (McCormick y Williamson, 1991; Haas y Panula 2003; Cilz y Lei, 2017; Wu et al., 2019). La información existente en relación al efecto de la histamina en las neuronas corticales es escasa; sin embargo, Wenger Combremont y cols. (2016) mostraron que

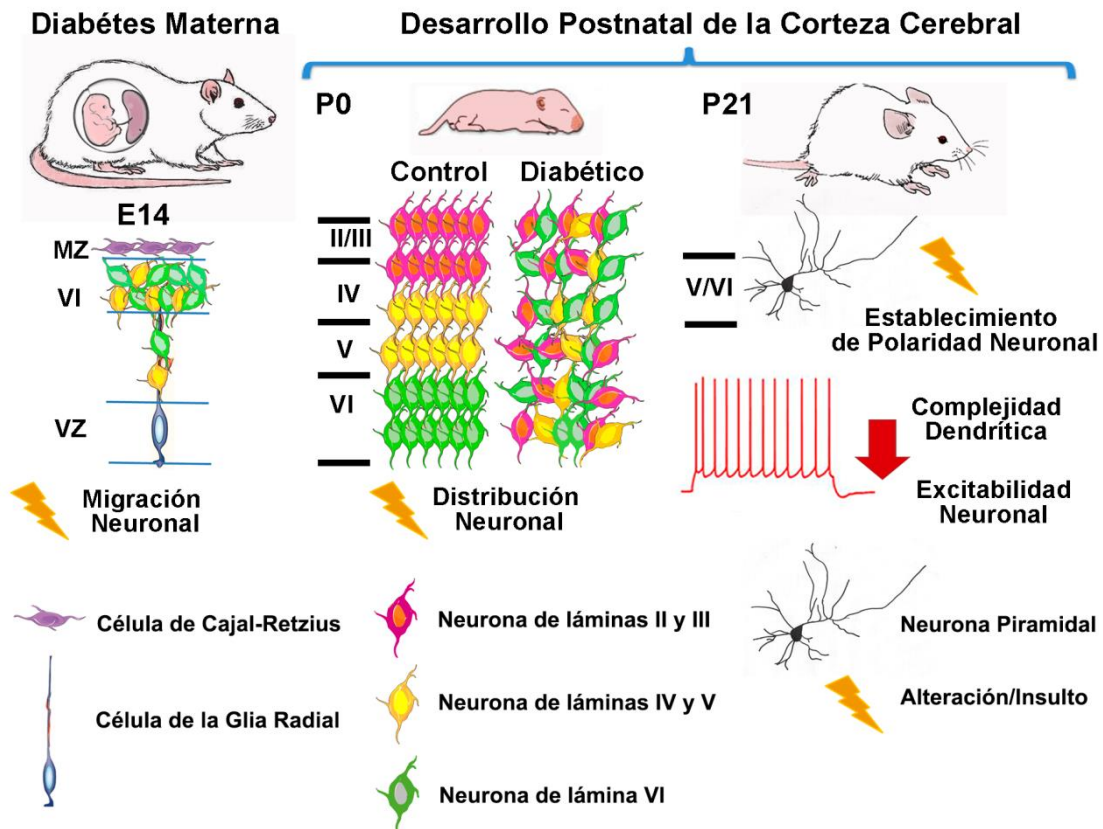


la histamina despolariza e incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas de la lámina VIb de la corteza somatosensorial primaria del ratón, y se ha reportado que en la corteza entorrinal de la rata la amina actúa sobre el RH<sub>1</sub> y el RH<sub>2</sub> para despolarizar a un grupo de interneuronas GABAérgicas (Cilz y Lei, 2017).

Panula y Nuutinen (2013) postularon que el RH<sub>1</sub> se localiza en las dendritas apicales de las neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza cerebral y, dado que este tipo neuronal fue el más afectadas en el grupo diabético, se determinó la densidad del receptor y el contenido de la histamina en la corteza frontal de crías P21. Aunque el grupo diabético tiene más histamina, la densidad del RH<sub>1</sub> no cambia con relación al grupo control. Aunque estos hallazgos no explican la menor excitabilidad de las neuronas corticales en respuesta a la histamina en las crías de madres diabéticas, es posible que el aumento de concentración de la amina biogénica induzca la desensibilización homóloga de estos receptores.

Bocchi y cols. (2017) reportaron que las neuronas piramidales de la corteza cerebral, que sufrieron alteraciones en el proceso de migración durante la etapa embrionaria, mostraron una menor excitabilidad en el periodo postnatal, probablemente como resultado de una menor conectividad aferente. Esto sugiere que la integración sináptica y la formación de circuitos se encuentran alteradas, debido a la migración neuronal anormal y la formación de conexiones sinápticas deficientes. Estos fenómenos podrían ocurrir en las crías de madres diabéticas que establecerían vías aferentes defectuosas en el tálamo y el neocórtex, relacionados con la emisión innata y el aprendizaje de las vocalizaciones en los roedores (Vargha-Khadem et al., 2005; Crosson, 2019; Mooney, 2020; Nieder y Mooney, 2020).

En resumen, los cambios en la expresión y distribución de SATB2, TBR1 y FOXP2 indican que la hiperglucemia materna produce alteraciones en los procesos de proliferación y migración neuronal durante la corticogénesis. Lo anterior conduce en el estadio posnatal a la pérdida de la polaridad neuronal, un menor desarrollo y complejidad del árbol dendrítico, y una menor excitabilidad de las neuronas piramidales de las láminas profundas de la corteza motora primaria (Figura 12).



**Figura 12. Efecto de la diabetes materna en la citoarquitectura y función de las neuronas piramidales de la corteza motora primaria.** En la corteza cerebral de embriones de rata (E14) expuestos a hiperglucemia materna se produce pérdida del patrón radial del andamio de la glía radial por el que se desplazan los neuroblastos y una disminución de reelina (P0), alteraciones que sugieren modificaciones en el proceso de migración neuronal que contribuyen con la desorganización laminar de las neuronas piramidales de proyección en la etapa post-natal, además de producir alteraciones en el establecimiento de la polaridad neuronal y una menor complejidad del árbol dendrítico, afecciones que podrían relacionarse con la disminución en la excitabilidad neuronal que presentan los productos (P21) de madres diabéticas. Abreviaturas: E, día embrionario; P, día post-natal; MZ, zona marginal; VZ, zona ventricular.

## 7. Conclusiones

### La diabetes materna:

1. Induce cambios en el arreglo citoarquitectónico de la CxM1, generados durante los procesos de diferenciación y migración neuronales.
2. Aumenta la maduración y diferenciación neuronales.
3. Produce alteraciones en la polaridad neuronal en P21, con disminución en la complejidad del árbol dendrítico de las neuronas de las láminas V/VI.
4. Disminuye la excitabilidad de las neuronas piramidales que se encuentran en las láminas V/VI de la CxM1 en P21, probablemente por disminución de la complejidad del árbol dendrítico y aumento de las conductancias de  $K^+$  que participan en la repolarización del potencial de acción de las neuronas piramidales.

## **Capítulo 2. Efecto del antagonismo prenatal de los receptores a histamina H<sub>1</sub> en la citoarquitectura y función cortical postnatal de la rata**

### **Resumen**

Durante el desarrollo embrionario de diversos mamíferos aparece un sistema histaminérgico transitorio en el mesencéfalo/rombencéfalo del tubo neural, y el receptor a histamina H<sub>1</sub> (RH<sub>1</sub>) tiene un papel importante en la neurogénesis que dará origen a la corteza cerebral y el mesencéfalo ventral. El cerebro en desarrollo de la rata expresa abundantemente al RH<sub>1</sub> en el día embrionario (E) 12, cuando se forman las láminas V/VI de la corteza cerebral. La histamina, mediante la activación del RH<sub>1</sub>, aumenta la diferenciación de neuronas inmunorreactivas al factor de transcripción FOXP2 (*Forkhead box protein 2*) que integran las láminas V/VI del neuroepitelio cortical, mientras que la administración de clorfeniramina, un antagonista/agonista inverso del RH<sub>1</sub>, en el lumen ventricular de embriones E12, disminuye dicha diferenciación en E14. Lo anterior sugiere el antagonismo del ligando endógeno o el bloqueo de la actividad constitutiva del RH<sub>1</sub>. Debido a estos efectos y a que la clorfeniramina se usa durante el embarazo (categoría B de la FDA, *Food and Drug Administration*), es necesario investigar sus efectos durante el desarrollo. En este capítulo de la tesis se abordó el efecto de la administración sistémica de clorfeniramina durante el periodo de formación de las láminas profundas de la corteza cerebral (E12-E14) en la citoarquitectura y función cortical postnatal (P). Para ello se utilizaron técnicas moleculares, bioquímicas, morfológicas y electrofisiológicas, y se observó que las crías expuestas al fármaco presentaron aumento y distribución alterada de los marcadores neuronales SATB2 y FOXP2 (P0) en la corteza motora primaria, así como disminución en la complejidad dendrítica y menor excitabilidad de las neuronas piramidales de las láminas V/VI (P21). Los resultados evidencian el efecto teratogénico de la clorfeniramina a nivel morfológico y funcional en etapas tempranas del desarrollo postnatal.

## **Abstract**

In embryo development of diverse mammals, there exists a transitory histaminergic system in the mesencephalon/rhombencephalon of the neural tube, and the histamine H<sub>1</sub> receptor (H<sub>1</sub>R) plays a relevant role in neurogenesis occurring during the early development of cerebral cortex and ventral mesencephalon. The developing rat brain shows high H<sub>1</sub>R expression in the embryo (E) day 12, coinciding with the formation of the cortical deep layers (V/VI). Previous studies have shown that via H<sub>1</sub>R activation histamine increases the differentiation of FOXP2 (*Forkhead box protein 2*) immuno-positive neurons that form the cortical deep layers (V/VI), while the administration of chlorpheniramine (H<sub>1</sub>R antagonist/inverse agonist) in the ventricular lumen of E12 embryos decreases such differentiation at E14, suggesting pharmacological blockade of the endogenous ligand or abolition of H<sub>1</sub>R constitutive activity. Given the effect of chlorpheniramine in the embryonic stage and because the drug is used during pregnancy (B category; Food and Drug Administration, FDA), it is relevant to perform studies of its effect on long-term development, and this chapter therefore addressed the effect of the systemic administration of chlorpheniramine during the period of cortical deep layers (V/VI) formation (E12-E14) on the cortical cytoarchitecture and postnatal (P) function. Through molecular, biochemical, morphological, and electrophysiological approaches, evidence is provided for impaired expression and distribution of the neuronal markers SATB2 and FOXP2 (P0), as well as reduced dendritic tree and excitability of deep layer neurons (P21) in the primary motor cortex. These results evidence the teratogenic effect of chlorpheniramine at morphological and functional levels in the early stages of postnatal development.

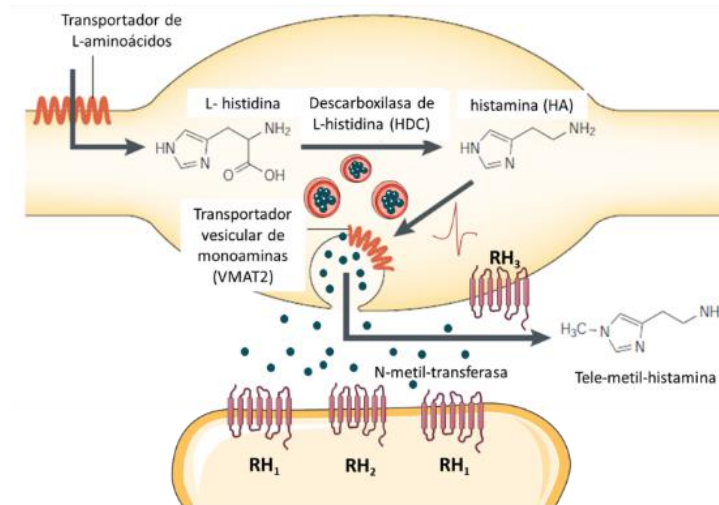
# 1. Introducción

## 1.1 La histamina

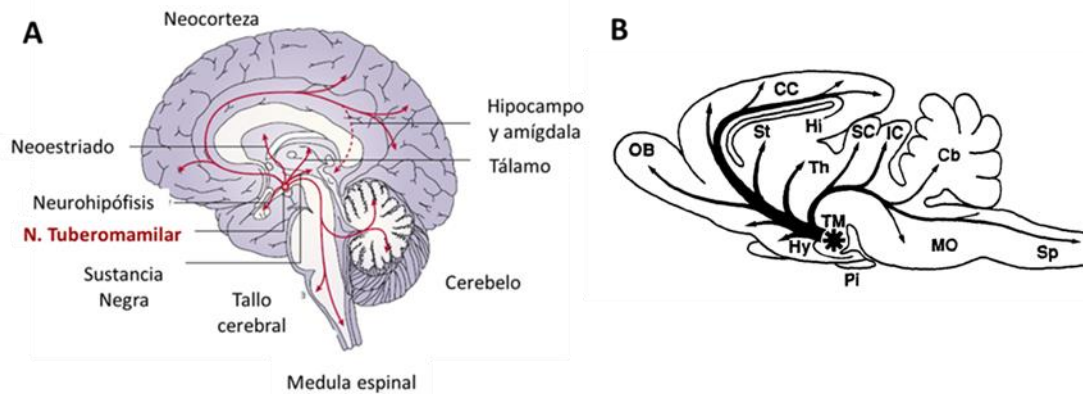
En el SNC adulto, la histamina (HA) es un neurotransmisor/neuromodulador que participa en la regulación de diferentes procesos fisiológicos y patológicos como el estado de vigilia, la ingesta de alimentos y líquidos, el mantenimiento de la temperatura corporal, la analgesia, la actividad motora, el aprendizaje y la memoria (Ramos-Jiménez et al., 2009). Además, durante el desarrollo del SNC, la HA participa en la proliferación y diferenciación de las células troncales neurales *in vitro* e *in vivo* (Molina-Hernández y Velasco. 2008; Molina-Hernández et al., 2013).

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 13). Una vez sintetizada, la HA se introduce en vesículas sinápticas a través del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), y se libera en respuesta al arribo de potenciales de acción. Una vez en el espacio extracelular, la HA se une y activa a cuatro receptores (RH<sub>1</sub>, RH<sub>2</sub>, RH<sub>3</sub> y RH<sub>4</sub>) acoplados a proteínas G (Haas y Panula, 2003), y posteriormente es degradada por la enzima N-metil-transferasa a tele-metil-histamina (EC 2.1.1.8; Haas et al., 2008).

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 14). Entre las estructuras que reciben una mayor inervación se encuentran la neocorteza, la amígdala, la sustancia negra y el neostriado (Siegel, 2006).



**Figura 13. 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), y después de su liberación es degradada a tele-metil-histamina por la enzima N-metil-transferasa. Modificado de Haas y Panula, 2003.



**Figura 14. El sistema histaminérgico del 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 en B: Cb, cerebelo; CC, corteza cerebral; Hi, hipocampo; Hy, hipotálamo; IC, colículo inferior; MO, bulbo raquídeo; OB, bulbo olfatorio; Pi, hipófisis; SC, colículo superior; Sp, médula espinal; ST, neostriado; Th, tálamo; TM, núcleo tuberomamilar. Modificado de Haas y Panula, 2003 (A) y de Wada et al., 1991 (B).

## 1.2 Receptores a histamina

Como se mencionó, en el SNC la HA ejerce sus efectos mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G, habiéndose descrito a la fecha cuatro de ellos (RH<sub>1</sub>, RH<sub>2</sub>, RH<sub>3</sub> y RH<sub>4</sub>).

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

El RH<sub>1</sub> es una proteína con siete dominios transmembranales, de 486 y 487 amino ácidos (aa) en la rata y en el humano, respectivamente. En la rata el RH<sub>1</sub> tiene un peso molecular de 56 kilodaltones (kDa), y posee sitios de glicosilación en el dominio amino terminal, una tercera asa intracelular larga y un extremo carboxilo corto.

El RH<sub>1</sub> interactúa con proteínas G $\alpha_{q/11}$  que activan principalmente a la isoforma  $\beta$  de la fosfolipasa C (PLC $\beta$ ), promoviendo la formación de dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) y 1,4,5 trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>). El DAG activa a la cinasa C de proteína, PKC, mientras que el IP<sub>3</sub> promueve la liberación de Ca<sup>2+</sup> de reservorios intracelulares, provocando varios efectos como: 1) apertura de canales iónicos dependientes de Ca<sup>2+</sup> que promueven la despolarización neuronal; 2) activación del intercambiador sodio/calcio (NCX), que también induce despolarización de neuronas, como las del núcleo supraóptico; 3) formación de óxido nítrico (NO); 4) síntesis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc); y 5) apertura de canales de K<sup>+</sup> de conductancia pequeña, que promueven hiperpolarización en las células gliales y en las neuronas piramidales del hipocampo, disminuyendo la excitabilidad y el disparo neuronal (Ramos-Jiménez et al., 2009; Haas et al., 2008).

Se ha reportado también que por acción directa de la proteína G $\alpha_{q/11}$ , o mediante la vía PLC $\beta$ /DGC/PKC, el RH<sub>1</sub> produce el cierre de canales de K<sup>+</sup> que permanecen abiertos en el reposo, fenómeno que promueve la excitabilidad neuronal en el tallo cerebral, tálamo, neocórtex y corteza cerebral (Haas y Panula, 2003).

El RH<sub>1</sub> se distribuye ampliamente en el cerebro de los mamíferos y con mayor densidad en las regiones relacionadas con el control neuroendocrino, conductual y nutricional, como el hipotálamo, los núcleos aminérgicos y colinérgicos del tallo



cerebral, el tálamo y las láminas III y IV de la corteza cerebral. Tiene una constante de afinidad ( $K_i$ ) de 1.26  $\mu\text{M}$  por la HA y actividad constitutiva en sistemas heterólogos o en condiciones en las que se promueve una alta expresión, como por ejemplo la rinitis alérgica (Yanai et al., 1992; Bakker, et al., 2000; Haas y Panula, 2003; Nijmeijer, et al., 2010; Molina-Hernández et al., 2012).

El primer radioligando descrito para la identificación del  $\text{RH}_1$  fue la [ $^3\text{H}$ ]-mepiramina. La mepiramina (o pirilamina) se ha utilizado como antagonista por su alta selectividad y afinidad ( $K_D \sim 1 \text{ nM}$ ). En contraste, no existen agonistas altamente selectivos para el  $\text{RH}_1$ , aunque se han sintetizado fármacos con cierta selectividad como la 2-tiazoliletilamina, la 2-metilhistamina, la 2-(3-bromofenil)-histamina y el 8R-lisuride; sin embargo, muestran baja eficacia y se consideran agonistas parciales. Existe una gran variedad de antihistamínicos de uso clínico (clorfeniramina, difenhidramina, cetirizina, loratadina, etc.), clasificados como antagonistas de los  $\text{RH}_1$ , si bien la mayoría de ellos actúan también como agonistas inversos (Hill et al., 1977 y 1997; Bakker et al., 2007; Simons, 2004; Ramos et al., 2009).

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

El  $\text{RH}_2$  es una proteína de 358 y 359 aa en la rata y en el humano, respectivamente. En la rata el  $\text{RH}_2$  pesa 44 kDa, y a diferencia del  $\text{RH}_1$ , cuenta con una tercera asa intracelular corta y un extremo carboxilo largo. El receptor está acoplado a proteínas  $G_{\alpha_s}$ , por lo que su activación aumenta la actividad de las adenilil ciclasas (ACs) y consecuentemente la síntesis del 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC). Este segundo mensajero estimula a la cinasa A de proteínas (PKA), que activa diversas proteínas, como CREB (*cAMP-response element-binding protein*), inhibe conductancias de  $\text{K}^+$  activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que ocasiona la reducción de la corriente (I) AHP (*afterhiperpolarization*), y reduce el fenómeno de acomodación permitiendo que las neuronas piramidales del hipocampo sigan generando potenciales de acción en presencia de HA (Haas y Konnerth, 1983; Haas y Panula 2003; Tabarean, 2016).

De manera semejante al RH<sub>1</sub>, el RH<sub>2</sub> 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. El RH<sub>2</sub> tiene una K<sub>i</sub> de 1.99 μM por la HA (Arrang, et al., 1995; Honrubia et al., 2000; Sadek et al., 2016).

El RH<sub>2</sub> ha sido caracterizado farmacológicamente con varios agonistas y antagonistas selectivos; se han sintetizado radioligandos selectivos, siendo los de mayor afinidad la [<sup>3</sup>H]-tiotidina (K<sub>D</sub> 25 nM) y la [<sup>125</sup>I]-yodoaminopentidina (K<sub>D</sub> 0.3 nM). Existen diversos antagonistas del RH<sub>2</sub>, como la ranitidina (K<sub>D</sub> 200 nM), la famotidina (K<sub>D</sub> 17 nM), la tiotidina (K<sub>D</sub> 15 nM) y la yodoaminopentidina (K<sub>D</sub> 2.5 nM), uno de los más potentes antagonistas disponibles (Gajtkowski et al, 1983; Ruat et al.,1990; Ramos et al., 2009).

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

El RH<sub>3</sub> se expresa de manera principal 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. El RH<sub>3</sub> tiene una K<sub>i</sub> de 10 nM por la HA (Pollard, et al., 1993; Ryu, et al., 1995; Ramos-Jiménez et al., 2009). Como resultado del procesamiento alternativo del RNA mensajero (RNAm) 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).

La activación de autorreceptores H<sub>3</sub> localizados en las dendritas y en los axones de las neuronas histaminérgicas del núcleo tuberomamilar inhibe el disparo neuronal, así como la síntesis y la liberación de HA, mientras que la activación de los heteroreceptores H<sub>3</sub> inhibe la liberación y síntesis de otros neurotransmisores como dopamina, ácido γ-aminobutírico (GABA), glutamato, noradrenalina y acetilcolina (Torrent et al., 2005; Moreno-Delgado et al., 2006; Nieto-Alamilla et al., 2016)

El RH<sub>3</sub> activa 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 reduce e la liberación de neurotransmisores; 4) activación de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs); 5) activación de la fosfolipasa C y la movilización de Ca<sup>2+</sup> de depósitos intracelulares; 6) inhibición del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>; y 7) activación de canales rectificadores entrantes de K<sup>+</sup> (Sadek et al., 2016; García-Gálvez y Arias-Montaño, 2016; Nieto-Alamilla et al., 2016).

El RH<sub>3</sub> tiene alta afinidad por la HA y la metilación de ésta generó un ligando más activo y selectivo para los RH<sub>3</sub>, la R- $\alpha$ -metilhistamina. Este agonista es utilizado ampliamente para la caracterización farmacológica de los efectos mediados por el RH<sub>3</sub> y en su forma tritiada tiene una alta afinidad (K<sub>D</sub> 0.3 nM) por el receptor; por lo que es empleada ampliamente como radioligando para detectar su presencia. Se han sintetizado también agonistas como el immpip (K<sub>D</sub> 10 nM) y el immetit (K<sub>D</sub> 5 nM), ambos empleados frecuentemente en el análisis de respuestas mediadas por el RH<sub>3</sub>. La tioperamida fue el primer antagonista selectivo y potente para los RH<sub>3</sub> y actúa como antagonista competitivo en la mayoría de los ensayos funcionales. La incorporación de una molécula de isotiourea en la cadena lateral de la tioperamida dio como resultado la síntesis de un antagonista más potente, el clobenpropit (Arrang et al., 1987; Hew et al., 1990; Kathmann et al., 1993; Hill et al., 1997; Leurs et al., 1995 y 2005; Ramos et al., 2009).

#### **1.2.4 Receptor a histamina H<sub>4</sub> (RH<sub>4</sub>)**

El RH<sub>4</sub> se expresa primordialmente en células del sistema inmunológico incluyendo mastocitos, monocitos, eosinófilos, células dendríticas, células T y *natural killers*, lo que sugiere un papel importante en respuestas proinflamatorias e inmunológicas (Zampeli y Tiligada, 2009).

El gen que codifica al RH<sub>4</sub> se localiza en el cromosoma 18p13 en el humano (gene ID:59340) y en la rata (gene ID 170704). En la rata, el RH<sub>4</sub> es una proteína de 391 aa,

de 44 kDa y con una homología de ~40% con el RH<sub>3</sub> (van Rijn et al., 2008; Leurs et al., 2009). El RH<sub>4</sub> está acoplado a proteínas G $\alpha_{i/o}$  que inhiben a las ACs y por lo tanto la formación de AMPc (Nakamura et al., 2000).

Existe controversia sobre la expresión y función del RH<sub>4</sub> en el SNC, debido principalmente a la carencia de anticuerpos específicos para la inmunodetección del RH<sub>4</sub>. El RNAm y la proteína del RH<sub>4</sub> se expresa en algunas regiones del SNC como el hipocampo, la corteza cerebral, el talámo y la amígdala, aunque el nivel más alto se ha reportado en la médula espinal y el ganglio de la raíz dorsal (Strakhova et al., 2009; Connelly et al., 2009; Sanna et al., 2015).

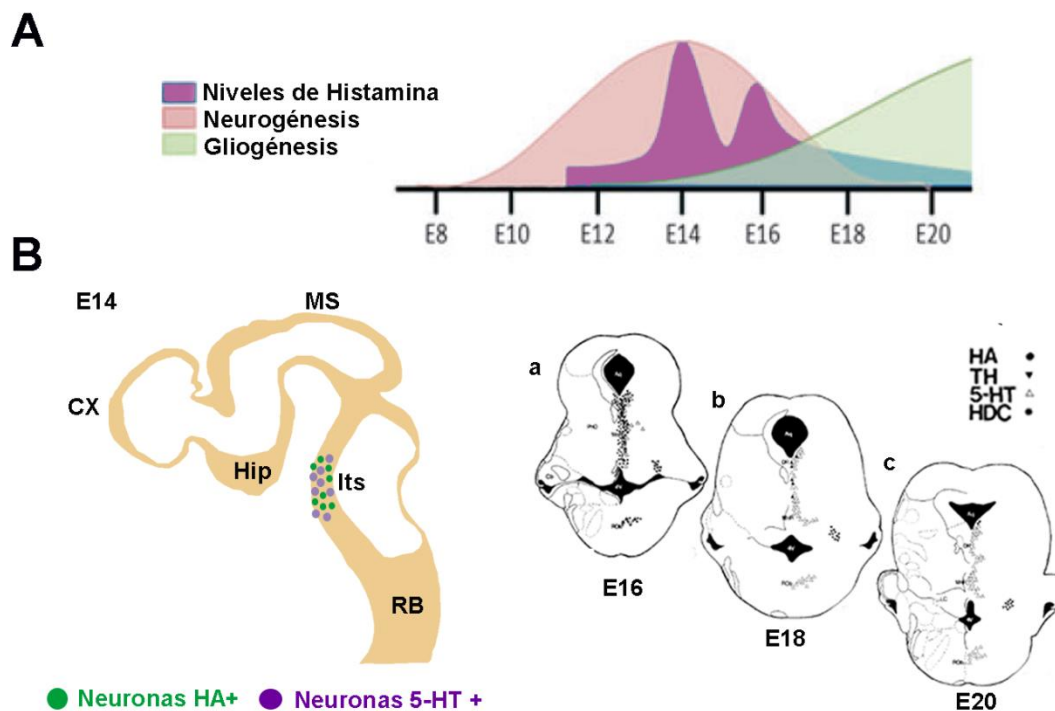
El RH<sub>4</sub> se expresa en la microglía, que forma parte del sistema inmune del cerebro. Mediante la activación del RH<sub>4</sub> la HA induce la migración de la microglía, inhibe la producción de la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) inducida por lipopolisacáridos (LPS) y promueve la producción de los factores pro-inflamatorios Factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6), efecto bloqueado por antagonistas de los receptores H<sub>1</sub> y H<sub>4</sub> (Ferreira et al., 2012; Dong et al., 2014).

La [<sup>3</sup>H]-histamina es el radioligando de elección para estudiar las características farmacológicas del RH<sub>4</sub>. Los ligandos para el RH<sub>3</sub> pueden también unirse a los RH<sub>4</sub>, debido a la alta homología estructural que existe entre ellos. Así el RH<sub>4</sub> puede unir a los ligandos tioperamida (K<sub>i</sub> 27 nM) y R- $\alpha$ -metilhistamina (K<sub>D</sub> 146 nM). Se han desarrollado antagonistas no imidazólicos del RH<sub>4</sub> con alta selectividad y potencia, como el JNJ7777120 (K<sub>i</sub> 4 nM) y el VUF6002 (K<sub>i</sub> 27 nM), los cuales actúan como antagonistas neutros. Entre los agonistas de los RH<sub>4</sub> se encuentran la clozapina y el clobenpropit, previamente caracterizados como antagonistas de los RH<sub>3</sub>, pero que actúan como agonistas de los RH<sub>4</sub> en ensayos funcionales (Jablonowski et al., 2003; Terzioglu et al., 2004; Veneable et al., 2005; Buckland et al., 2003; Bell et al., 2004; Ling et al., 2004; Smits et al., 2006; Ramos et al., 2009).

### **1.3 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 participar en etapas tempranas

del neurodesarrollo. A partir del día embrionario 12 (E12) se pueden detectar tanto a la HDC, como a la HA en el cerebro de los roedores, con picos en E14 y E16. En E20 la concentración de HA disminuye hasta cinco veces y alcanza la concentración basal reportada para el adulto en el prosencéfalo (Figura 15; Vanhala et al., 1994; Solís et al., 2017). El primer pico de HA en E14 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; Solís et al., 2017; Márquez -Valadez et al., 2019).



**Figura 15. Sistema histaminérgico transitorio.** **A) Nivel de histamina.** Se observa el pico de histamina que se produce en E14, en relación con el pico neurogénico y el inicio de la gliogénesis en el cerebro de la rata. **B) Localización y distribución del sistema histaminérgico transitorio.** *Izquierda.* Vista sagital del cerebro de la rata en E14 en donde se observa que en esta etapa las neuronas del sistema histaminérgico transitorio (verde) y las neuronas del sistema serotoninérgico (purpura) se localizan en los núcleos del rafé en el tallo cerebral. *Derecha.* Vista coronal de los núcleos del rafé dorsal en E16, E18 y E20 que muestra la distribución de las neuronas inmunorreactivas a HA y 5-HT. Se observa que en E20 el fenotipo histaminérgico ha desaparecido por completo, mientras que las neuronas serotoninérgicas conservarán esta localización en el cerebro adulto. Abreviaturas: E, día embrionario; CX, corteza cerebral; Hip, hipotálamo; MS, mesencéfalo; Its, Itsmo; RB, rombencéfalo; HA, histamina; TH, hidroxilasa de tirosina; 5-HT, 5-hidroxitriptamina; HDC, descarboxilasa de histidina. Modificado de Molina-Hernández et al., 2012 (A) y Vanhala et al., 1994 (B).

En el periodo E14-E18 existe 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 inmunopositivas a HA colocalizan con las neuronas serotoninérgicas que integrarán a los núcleos del rafe. También se ha descrito que en esta región existe una subpoblación de neuronas inmunorreactivas a HA y a serotonina. Es importante destacar que las neuronas inmunorreactivas a HA que componen al sistema histaminérgico transitorio no son las que conformarán al NTM en el cerebro adulto, ya que estas últimas se originan a partir de E20 (Wallace y Lauder, 1983; Auvinen y Panula, 1988; Vanhala et al., 1994).

Durante el desarrollo del SNC, las fibras inmunorreactivas del sistema histaminérgico transitorio se distribuyen ampliamente en el hipotálamo a partir de 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).

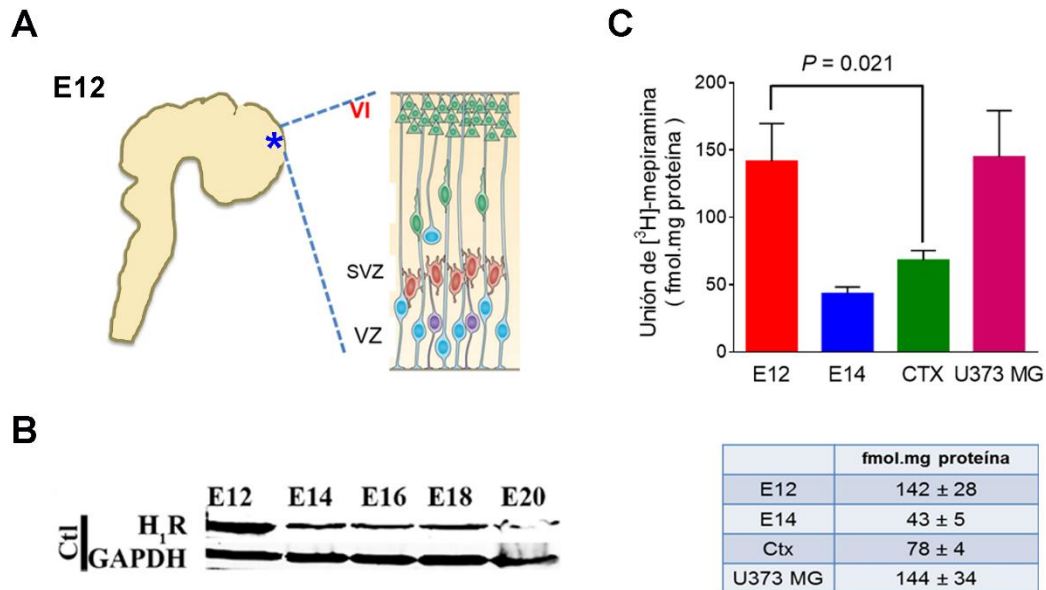
Es posible que el sistema histaminérgico transitorio no sea la única fuente de HA para el SNC prenatal, ya que la madre y otros órganos producen HA durante el desarrollo y es factible que la amina difunda en la barrera hemato-encefálica inmadura y entre en contacto con el tejido cerebral embrionario. Aunque los mastocitos son una fuente de HA en la superficie del cerebro en desarrollo, este tipo celular aparece en E18 por lo que estas células no contribuyen al nivel de HA antes del E18, pero sí al pico de HA 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 NTM 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 (Lambratch-Hall et al., 1990).

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

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

Kinnunen y cols. (1998) demostraron que el RH<sub>1</sub> se expresa a partir del E14 en los núcleos del rafe, el neuroepitelio tectal superior, el tálamo, el funículo ventral de la médula espinal, el neuroepitelio ventricular y la subplaca; estas dos últimas estructuras originan a la neocorteza. Para E18, en la corteza cerebral en desarrollo, el RH<sub>1</sub> limita su expresión al neuroepitelio ventricular y la zona marginal, mientras que la pre-placa cortical y la zona intermedia permanecen sin el receptor. En el E20, la señal 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).

Estudios recientes reportan que el RH<sub>1</sub> se expresa más temprano durante el desarrollo del SNC, observándose tanto la presencia de RNAm como de la proteína en el telencéfalo dorsal de la rata en E12, lo que coincide temporalmente con el inicio de la formación de las capas profundas de la corteza cerebral (E12-E14). De manera interesante, la densidad del RH<sub>1</sub> en el cerebro en desarrollo es mayor que la encontrada en la corteza cerebral de la rata adulta (Figura 16). Lo anterior, en conjunto con el pico máximo en la concentración de HA durante la corticogénesis, sugiere que el sistema histaminérgico transitorio participa en la corticogénesis temprana y en el establecimiento de las capas profundas, ya sea a través de la activación del RH<sub>1</sub> por su ligando endógeno o por presentar actividad constitutiva (Solís et al., 2017; Márquez-Valadez et al., 2019).



**Figura 16. Expresión del receptor a histamina  $H_1$  ( $RH_1$ ) en el neuroepitelio cortical de la rata.** A) Esquema que representa un corte sagital del tubo neural de un embrión de rata en E12. El asterisco azul indica el telencéfalo dorsal de donde emerge la corteza cerebral, y a la derecha se representa un estadio más avanzado en el que se observan las primeras neuronas corticales de la lámina VI. B) **Expresión del  $RH_1$  en el prosencéfalo/telencéfalo dorsal.** *Western Blot* representativo del  $RH_1$  en el neuroepitelio cortical de la rata de E12 a E20. Modificado de Solís et al., 2017. C) **Densidad del  $RH_1$  en membranas de tejido cerebral de embriones E12 y E14.** Gráfica del promedio  $\pm$  EEM de la unión específica de [ $^3H$ ]-mepiramina expresada como fmol/mg de proteína en tejido embrionario, corteza cerebral adulta (CTX) y en una línea celular de astrocitoma humano (U373 MG). Modificado de Márquez-Valadez et al., 2019. Abreviaturas en A: E, día embrionario; VI, lámina cortical 6; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular). Ctl, control.

Molina-Hernández y Velasco (2008), reportaron que las NSC *in vitro* provenientes del neuroepitelio cortical de la rata en E14 expresan tanto al RNAm como a la proteína del  $RH_1$ , y que la activación del receptor aumenta la diferenciación neuronal. Por otro lado, Solís y cols. (2017) demostraron que el bloqueo farmacológico del  $RH_1$  con clorfeniramina en E12 disminuye en E14 la expresión de MAP2, un marcador de diferenciación y maduración neuronal. Estos estudios sugieren que en el neuroepitelio cortical embrionario la activación del  $RH_1$  promueve la diferenciación neuronal.



Marquez-Valadez y cols. (2019) también detectaron al RH<sub>1</sub> en E12 y E14 en el neuroepitelio del mesencéfalo ventral de la rata, localizado en E12 en la VZ del mesencéfalo, donde se localizan los cuerpos celulares de las NSC, sugiriendo que este tipo celular es el que expresa al receptor en este momento del desarrollo. Por otra parte, la distribución de la marca para RH<sub>1</sub> a lo largo del neuroepitelio mesencefálico en E14, indica que para este momento otros fenotipos celulares, como neuroblastos y neuronas dopaminérgicas inmaduras, expresan el receptor. Este estudio mostró que la administración sistémica de clorfeniramina (5 mg/kg) cada 24 h en E12, E13 y E14, aumenta la diferenciación dopaminérgica, al contrario de lo reportado para la corteza cerebral. La discrepancia puede deberse a que los resultados de la corteza cerebral fueron obtenidos después de la administración de una sola dosis de este fármaco en E12 o bien a cambios espaciales en el tejido neural en desarrollo.

En la corteza cerebral de los neonatos, el RH<sub>1</sub> presenta un patrón de distribución laminar característico tanto en la rata como en el 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 talámica, 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 regula los circuitos tálamo-corticales y cortico-corticales mediante la activación de dicho receptor (Panula et al., 2014).

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

Un estudio basado en hibridación *in situ* reportó una expresión uniforme del RH<sub>2</sub> a partir de E15 en el cerebro de la rata. De manera semejante a lo reportado para el RH<sub>1</sub>, el RH<sub>2</sub> se expresa en los núcleos del rafe rostral y caudal; sin embargo, aparece más tarde (E17) en el hipotálamo ventral y en la placa cortical (Karlstedt, et al., 2001).

Otros estudios sugieren que el RH<sub>2</sub> se expresa antes de E15 en el cerebro fetal de la rata, ya que el RNAm y la proteína se han detectado en NSC aisladas del neuroepitelio cortical de E14, en tejido cortical de E12 y en tejido mesencéfalo ventral de E12 y E14 (Molina-Hernández y Velasco, 2008; Solís-González, 2015; Márquez-Valadez, et al., 2019).

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

A diferencia del RH<sub>1</sub> y del RH<sub>2</sub>, el RH<sub>3</sub> se expresa tardíamente (E19) en la placa cortical y en las capas profundas de la corteza cerebral, particularmente en la lámina VIb, mientras en otras zonas como el epitelio ventricular del mesencéfalo, el tallo cerebral y la médula espinal, se expresa a partir de E15 (Karlstedt, et al., 2003). De manera interesante, la expresión del RH<sub>3</sub> coincide con la maduración de las fibras histaminérgicas (Vanhala et al., 1994). Cabe señalar que aunque se ha reportado el RNAm de este receptor en las NSC derivadas del neuroepitelio cortical y mesencefálico en E12 y E14, respectivamente, la presencia de la proteína no es clara y no se han reportado efectos funcionales del mismo (Molina-Hernández et al., 2008; Escobedo-Ávila et al., 2014).

### **1.4.4 Receptor H<sub>4</sub> (RH<sub>4</sub>)**

Hasta el momento no existen reportes de la expresión y/o función del RH<sub>4</sub> en el SNC en desarrollo.

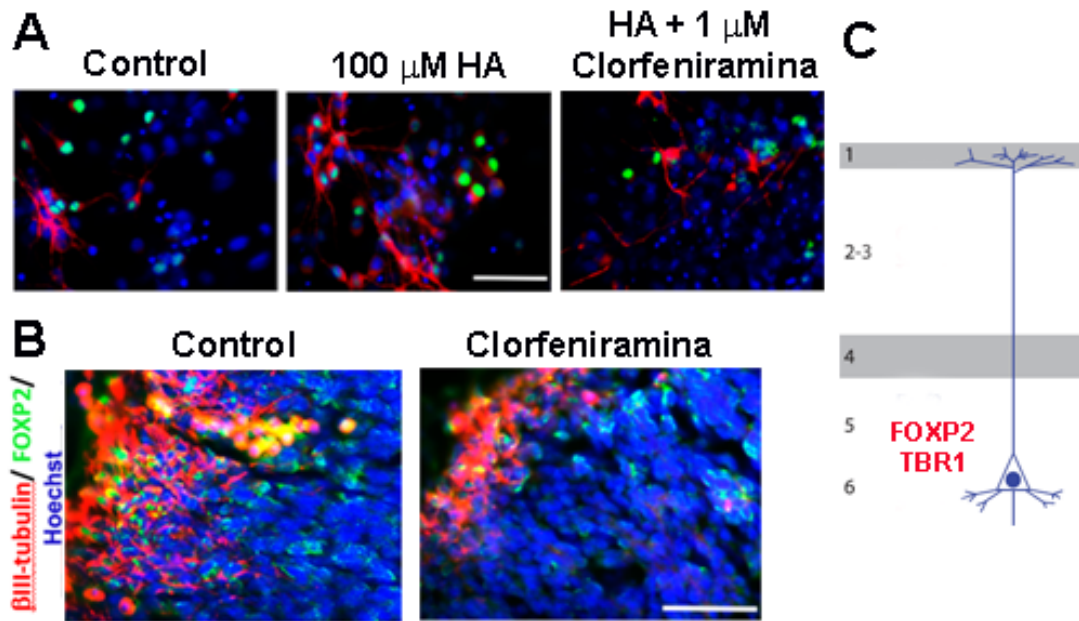
## **1.5 Función del RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral en desarrollo**

Como se mencionó, el RH<sub>1</sub> se expresa en etapas tempranas de la neurogénesis de la corteza cerebral (E12) en donde participa en 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 y Velasco, 2008; Rodríguez-Martínez et al., 2012). El aumento en la neurogénesis se acompaña de una mayor expresión de neurogenina1 (Ngn1; marcador neuronal), prospero1 (Prox1; factor de transcripción específico de la diferenciación glutamatérgica) y FOXP2 (marcador de capas profundas; 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) que coincide con el establecimiento de las capas profundas.

Nuestro grupo de investigación ha propuesto que el mecanismo por el cual el RH<sub>1</sub> aumenta la neurogénesis se basa en el aumento en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> y de la actividad de la PKC en las NSC, lo que a su vez induce un incremento en la expresión y la translocación nuclear del factor de transcripción FOXP2, probablemente por aumento de su fosforilación, promoviendo una mayor transición de NSC hacia PI, o bien la diferenciación directa de las NSC hacia neuronas (Figura 17; Molina-Hernández et al., 2013; Tsui et al., 2013; De la Merced-García et al., datos no publicados).

Los modelos transgénicos también han revelado la importancia a largo plazo del RH<sub>1</sub> en el desarrollo del SNC. Los ratones *knockout* (KO) del RH<sub>1</sub> presentan alteraciones en el aprendizaje y la memoria, así como 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, 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).



**Figura 17. El  $RH_1$  participa en la diferenciación neuronal de las láminas profundas de la corteza cerebral.** A) Micrografías representativas de la inmunofluorescencia del efecto de la HA en NSC de la corteza cerebral de la rata en E14. La histamina (100  $\mu$ M) promueve un aumento en la marca para FOXP2 (verde) y MAP2, efecto prevenido por la clorfeniramina, antagonista/agonista inverso del  $RH_1$ . B) Micrografías representativas del efecto *in vivo* de la microinyección de clorfeniramina en E12. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para  $\beta$ III-tubulina (rojo, neuronas inmaduras) y FOXP2 (verde; neuronas de las capas profundas de la corteza cerebral) en el neuroepitelio cortical de cortes coronales obtenidos de embriones E14 control e inyectados con clorfeniramina. La inyección de clorfeniramina (25  $\mu$ g) en el lumen ventricular en E12 disminuye la inmunorreactividad de  $\beta$ III-tubulina y FOXP2. En A y B los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Imágenes tomadas de Molina-Hernández et al., 2013. C) Ilustración de las neuronas piramidales de las láminas profundas de la corteza cerebral. Las neuronas piramidales que integran a las láminas profundas expresan los marcadores FOXP2 y TBR1, factores de transcripción que participan en el establecimiento postnatal de las vías cortico-tálmica y cortico-estriatal. Modificado de Gaspard et al., 2011.

## **2. Justificación**

La gran densidad del RH<sub>1</sub> en el neuroepitelio cortical en E12, al inicio de la formación de las láminas profundas V y VI de la corteza cerebral de la rata, y la disminución del fenotipo neuronal FOXP2 (láminas profundas) en E14 inducida por la administración sistémica de clorfeniramina, antagonista/agonista inverso del RH<sub>1</sub> en E12, sugieren que el RH<sub>1</sub> participa en la diferenciación de las neuronas que integran a las láminas profundas de la corteza cerebral embrionaria, por lo que en esta sección propusimos que el bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> durante el periodo crítico de la formación de láminas profundas de E12 a E14, afectaría negativamente las forma y función de estas neuronas.

Por lo anterior, el propósito del presente estudio fue evaluar el efecto del bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> con clorfeniramina, durante el periodo de formación de láminas profundas de la corteza cerebral (E12-E14), en la expresión y localización de los marcadores de láminas corticales SATB2, TBR1 y FOXP2 en neonatos (P0), en el desarrollo del árbol dendrítico y en la excitabilidad de las neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza motora primaria (P21).

### **3. Objetivos**

#### **Objetivo general**

Determinar si el bloqueo farmacológico del receptor H<sub>1</sub> modifica la citoarquitectura y función cortical postnatal.

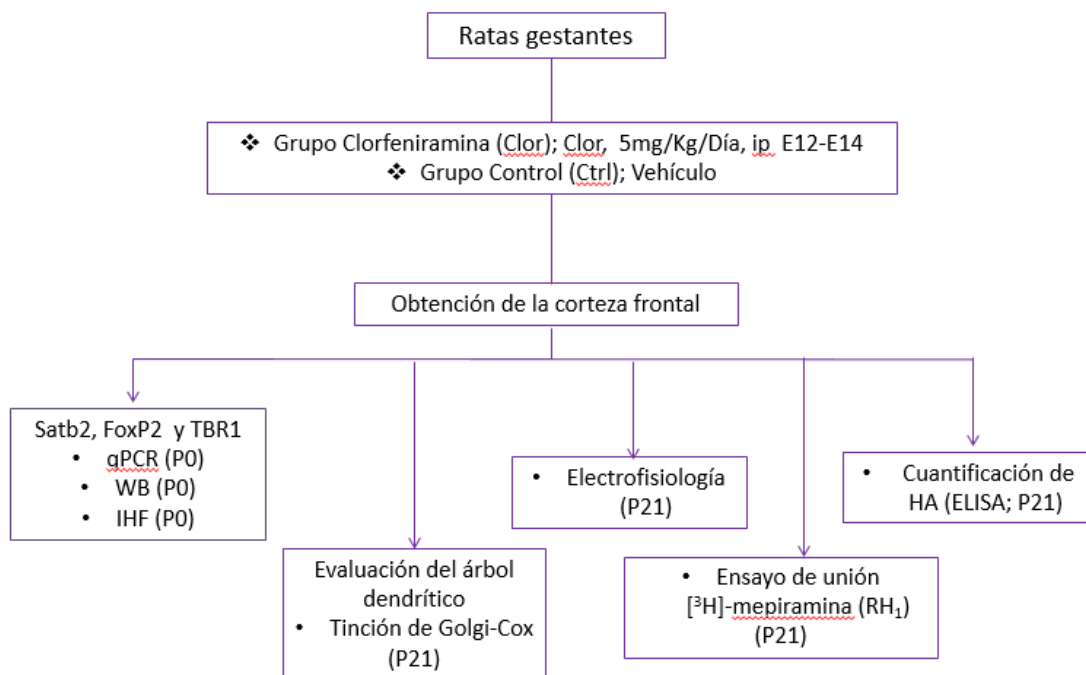
#### **Objetivos particulares**

Determinar si el bloqueo farmacológico del receptor H<sub>1</sub> modifica:

1. La expresión y localización de los marcadores de las distintas láminas corticales (Satb2, FoxP2/Tbr1) en la corteza motora primaria de los productos al día de nacimiento (P0).
2. Las características del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la corteza motora primaria de los productos (P21).
3. Las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas piramidales de la corteza motora de los productos (P21).
4. La expresión del receptor H<sub>1</sub> y el nivel de histamina en la corteza cerebral frontal de los productos (P21).
5. La activación de los receptores H<sub>1</sub> y/o H<sub>2</sub> en las neuronas piramidales de la corteza motora de los productos (P21).

## 4. Métodos

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



Clor, Clorfeniramina; Control, Control; qPCR, PCR cuantitativa; WB, Western blot; IHF, inmunohistofluorescencia; P0, día postnatal 0; P21, día postnatal 21.

Se utilizaron ratas hembra gestantes (Wistar, 230-300 g) las cuales se mantuvieron en las condiciones ya mencionadas en el Capítulo 1. En el día de gestación E12, las ratas preñadas fueron asignadas de manera aleatoria a cada grupo experimental (control o clorfeniramina). A las hembras gestantes destinadas para el bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub>, se les administró clorfeniramina (Sigma-Aldrich) a una dosis de 5 mg/kg, por vía ip (Naranjo y Naranjo, 1968; *National Toxicology Program*, 1986) durante el periodo de formación de las láminas profundas V y VI de la corteza cerebral (E12-E14), mientras que al grupo control se le administró solución salina (agua inyectable; Laboratorios PiSA, S.A. de C.V., Guadalajara, Jal., México) en el mismo periodo.

Las técnicas experimentales empleadas en el presente estudio fueron: RT-qPCR, inmunofluorescencia, Western Blot (WB), tinción histológica de Golgi-Cox, ensayo de unión de [<sup>3</sup>H]-mepiramina, ensayo de ELISA y registros electrofisiológicos (ver Capítulo I, sección 4)



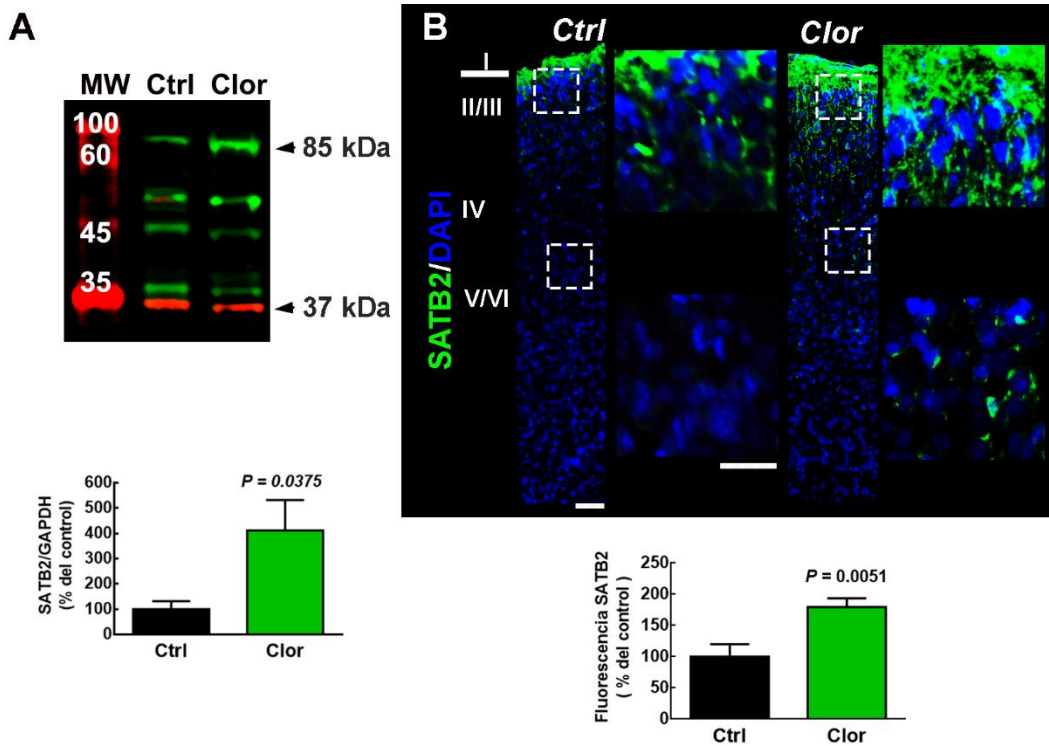
## **5. Resultados**

### **5.1 Efecto del bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> en la expresión y localización de los marcadores SATB2, FoxP2 y TBR1 de la CxM1 en crías P0**

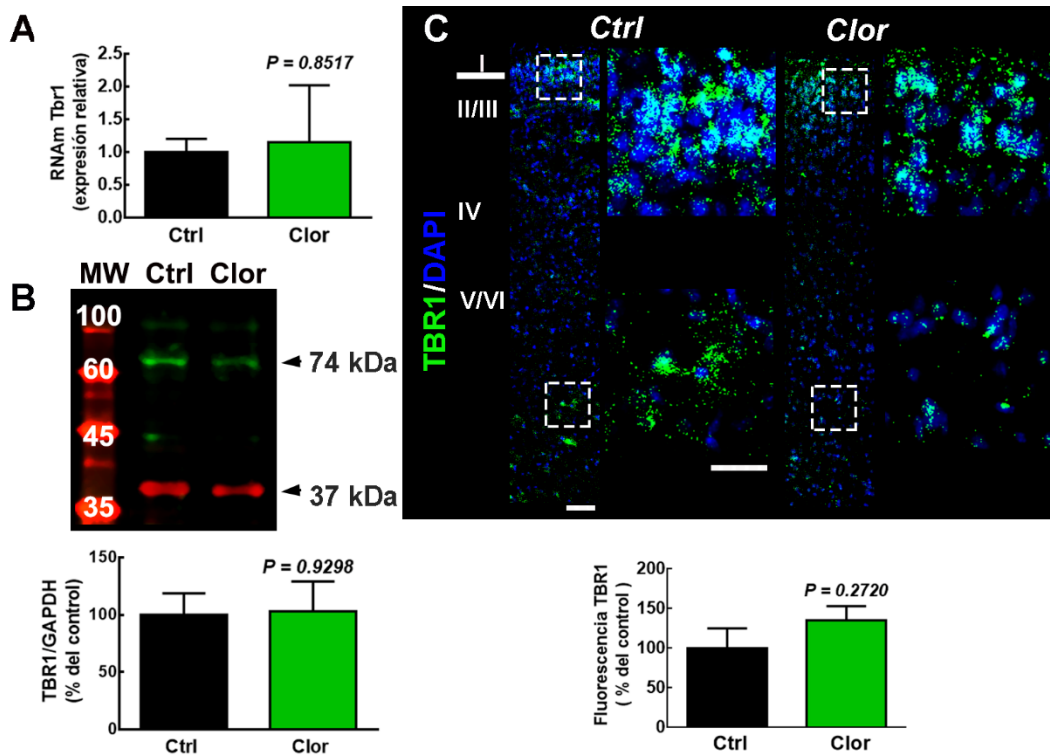
El análisis por WB para SATB2 mostró un aumento en la expresión de este factor de transcripción en la corteza cerebral frontal para las crías del grupo Clor en P0, que correspondió a  $235 \pm 24$  % del valor obtenido para el grupo Ctrl (Figura 18A). La señal inmunofluorescente de SATB2 en la CxM1 control se localiza en la lámina I, mientras que en las crías de ratas tratadas con clorfeniramina lo hace en la lámina IV. En concordancia con el resultado obtenido por WB, la señal fluorescente aumenta significativamente en el grupo Clor con relación al grupo Ctrl (Figura 18B).

Para el factor de transcripción TBR1 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de RNAm o de proteína (corteza frontal), ni cambios en la distribución y la intensidad de fluorescencia en la CxM1 en los neonatos del grupo Clor y el grupo Ctrl (Figura 19).

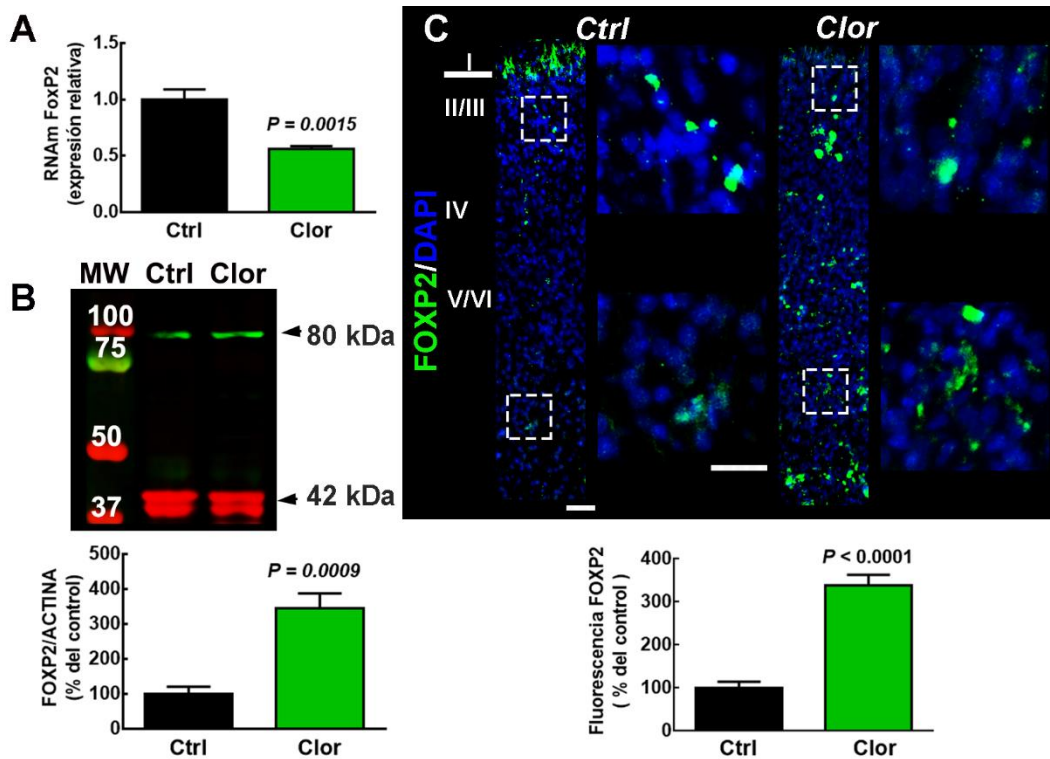
La cantidad de RNAm de Foxp2 es menor en el grupo Clor en comparación con el grupo Ctrl (Figura 20A). Sin embargo, el WB reveló un aumento significativo en el nivel de la proteína FOXP2 ( $245 \pm 47$  %) en la corteza frontal de neonatos del grupo de Clor con relación al grupo Ctrl (Figura 20B). El análisis de inmunofluorescencia mostró que en los neonatos de ratas Ctrl, FOXP2 se localiza en las láminas II/III y IV, mientras que las crías de ratas tratadas con Clor mostraron un cambio en el dominio de la marca hacia zonas más profundas de la CxM1. La señal fluorescente promedio de FOXP2 aumenta en el grupo Clor, confirmando lo encontrado por WB (Figura 20C).



**Figura 18. Expresión y distribución del factor de transcripción SATB2 en neonatos (P0) de ratas control y tratadas con clorfeniramina.** **A) Arriba.** Western Blot representativo que muestra la banda correspondiente a SATB2 (verde, ~85 kDa) y GAPDH (rojo, ~37 kDa) en la corteza cerebral frontal de los neonatos de los grupos control (Ctrl) y Clorfeniramina (Clor). **Abajo.** Análisis cuantitativo de la razón de fluorescencia de SATB2/GAPDH de 3 experimentos por grupo. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo Ctrl y son promedios  $\pm$  EEM. **B) Arriba.** Imágenes representativas de la reconstrucción de 4 microfotografías (10 $\times$ ) de la inmunodetección de SATB2 (verde) en la corteza motora primaria de los grupos Ctrl y Clor. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI (3-4 experimentos). **Derecha.** Aumento electrónico (400%) de las regiones enmarcadas con líneas discontinuas en la parte superior e inferior de la corteza motora primaria para cada grupo. Las barras de escala corresponden a 50 y 25  $\mu$ m para la imagen 10 $\times$  y el aumento, respectivamente. **Abajo.** Análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de SATB2. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo Ctrl y son promedios  $\pm$  EEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.



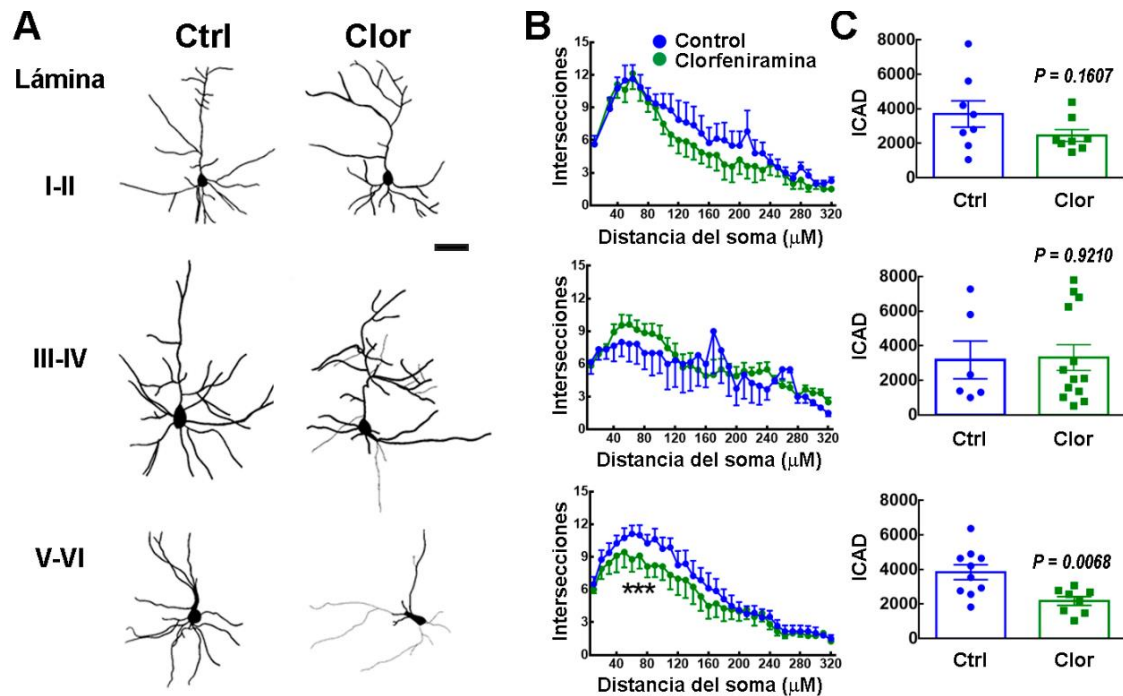
**Figura 19. Expresión y distribución del factor de transcripción SATB2 en la corteza motora primaria de neonatos (P0) de ratas control y tratadas con clorfeniramina.** **A)** La gráfica muestra la expresión relativa del RNAm de Tbr1 en la corteza cerebral frontal del grupo Control (Ctrl; 4 determinaciones) y Clorfeniramina (Clor; 3 determinaciones) utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . **B) Arriba.** Western Blot representativo que muestra la banda correspondiente a TBR1 (verde, ~74 kDa) y GAPDH (rojo, ~37 kDa) en la corteza frontal de neonatos de los grupos Ctrl y Clor. **Abajo.** Análisis cuantitativo de la tasa de fluorescencia de TBR1/GAPDH de 4 experimentos por grupo. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son los promedios  $\pm$  EEM. **C) Arriba.** Imágenes representativas de la reconstrucción de 4 microfotografías (10 $\times$ ) de la inmunodetección de TBR1 (verde) en la corteza motora primaria de los grupos Ctrl y Clor. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI (3-4 experimentos). **Derecha.** Aumento electrónico (400%) de las regiones enmarcadas con líneas discontinuas en la parte superior e inferior en la corteza motora primaria. Las barras de escala corresponden a 50 y 25  $\mu$ m para la imagen 10 $\times$  y el aumento, respectivamente. **Abajo.** Análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de TBR1. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son promedios  $\pm$  EEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.



**Figura 20. Expresión y distribución del factor de transcripción FOXP2 en la corteza motora primaria de neonatos (P0) de ratas control y tratadas con clorfeniramina.** **A)** La gráfica muestra la expresión relativa del RNAm de Foxp2 en la corteza cerebral frontal del grupo control (Ctrl; 5 determinaciones) y clorfeniramina (Clor; 5 determinaciones) utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . **B) Arriba.** Western Blot representativo que muestra la banda correspondiente a FOXP2 (verde, 80 kDa) y  $\alpha$ -actina (rojo, 42 kDa) en la corteza cerebral frontal de neonatos de los grupos Ctrl y Clor. **Abajo.** Análisis cuantitativo de la razón de fluorescencia FOXP2/ACTINA de 5 experimentos. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son promedios  $\pm$  EEM. **C)** Imágenes representativas de la reconstrucción de 4 micrografías (10 $\times$ ) de la inmunodetección de FOXP2 (verde) en la corteza motora primaria de los grupos Ctrl y Clor. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI (3-4 experimentos). *Derecha.* Los cuadrados muestran un aumento electrónico (400%) de las regiones enmarcadas con líneas discontinuas en parte superior e inferior en la corteza motora primaria. Las barras de escala corresponden a 50 y 25  $\mu$ m para la imagen a 10 $\times$  y el aumento, respectivamente. *Abajo.* Análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de FOXP2. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son promedios  $\pm$  EEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.

## 5.2 Efecto del bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> en el establecimiento del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la CxM1 en ratas P21

A partir de las reconstrucciones de las neuronas piramidales teñidas con el método de Golgi-Cox, se analizó la morfología neuronal en la CxM1 en el día P21 (Figura 21A).

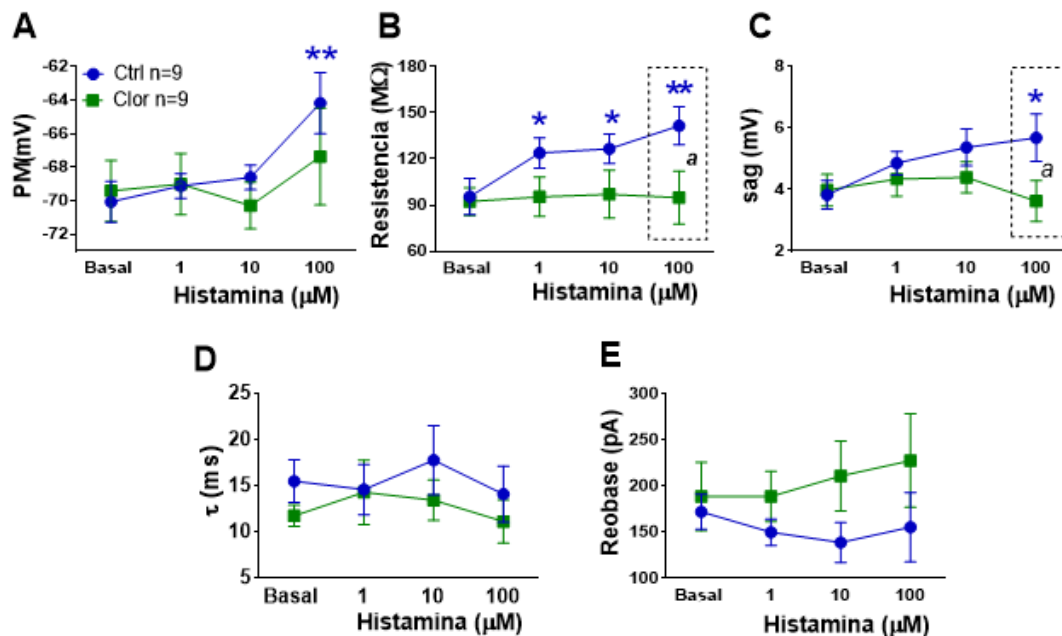


**Figura 21. Análisis del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de crías de 21 días de edad (P21) de ratas control y tratadas con clorfeniramina.** **A)** Dibujos representativos obtenidos de las reconstrucciones de neuronas piramidales de las láminas corticales II a VI de la corteza motora primaria teñidas con el método de Golgi-Cox del grupo control (Ctrl) y clorfeniramina (Clor). La barra corresponde a 100  $\mu\text{m}$ . **B)** Análisis de Sholl. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  EEM del valor de la intersección de las dendritas en relación con la distancia del soma, del grupo Ctrl (azul) y el de Clor (verde) para cada par de láminas. \*\*\* $P < 0.0001$  vs el control seguida de la prueba *t de Student* múltiple. **C)** Análisis del índice de complejidad del árbol dendrítico (ICAD). Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  EEM del ICAD de las neuronas de las ratas del grupo Ctrl (barras azules) y Clor (barras verdes), para cada par de láminas. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t de Student* no pareada (5-12 neuronas).

La clorfeniramina indujo la disminución de procesos proximales a una distancia de ~80  $\mu$ M durante el periodo de formación de las láminas profundas V y VI (E12-E14) (Figura 21B), y reducción en la complejidad del árbol dendrítico, así como cambios en el establecimiento de la polaridad celular de las neuronas piramidales de láminas V y VI de ratas en la etapa juvenil (P21), comparado con el grupo control (Figura 21C). Sin embargo, el tratamiento no indujo cambios significativos de estos parámetros en las neuronas piramidales de las láminas corticales II, III y IV (Figura 21B y C).

### 5.3 Efecto del bloqueo farmacológico del receptor $H_1$ en la excitabilidad neuronal de las láminas V/VI de la CxM1 en ratas P21

Los parámetros evaluados de los registros electrofisiológicos en condición basal de las neuronas piramidales del grupo clorfeniramina, no difieren estadísticamente del grupo control (Figura 22; Tabla 4). Sin embargo, la HA (100  $\mu\text{M}$ ) induce despolarización del potencial de membrana (PM) y aumento de la amplitud de la despolarización debida a una corriente catiónica activada por hiperpolarización (*sag*) en las neuronas del grupo control. Así mismo, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  de HA inducen aumento de la resistencia de membrana, mientras que en las neuronas del grupo tratado con clorfeniramina el *sag* no se modificó (Figura 22; Tabla 4).



**Figura 22. Efecto de la clorfeniramina en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de las láminas V y VI (P21).** Gráficas del potencial de membrana en reposo (PM, **A**); resistencia de membrana (**B**); amplitud de la rectificación del voltaje debido a una corriente  $I_h$  (*sag*, **C**); constante de tiempo ( $\tau$ , **D**) y corriente de reobase (**E**) de los grupos control (Ctrl, azul) y clorfeniramina (Clor, verde). Los círculos y cuadros representan el promedio  $\pm$  EEM del valor basal o en presencia de histamina del número de neuronas indicado en **A**. \* $P < 0.05$  vs basal; Análisis de varianza (ANOVA) de Medidas Repetidas y prueba de Sidak. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs Ctrl; prueba *t* de Student.

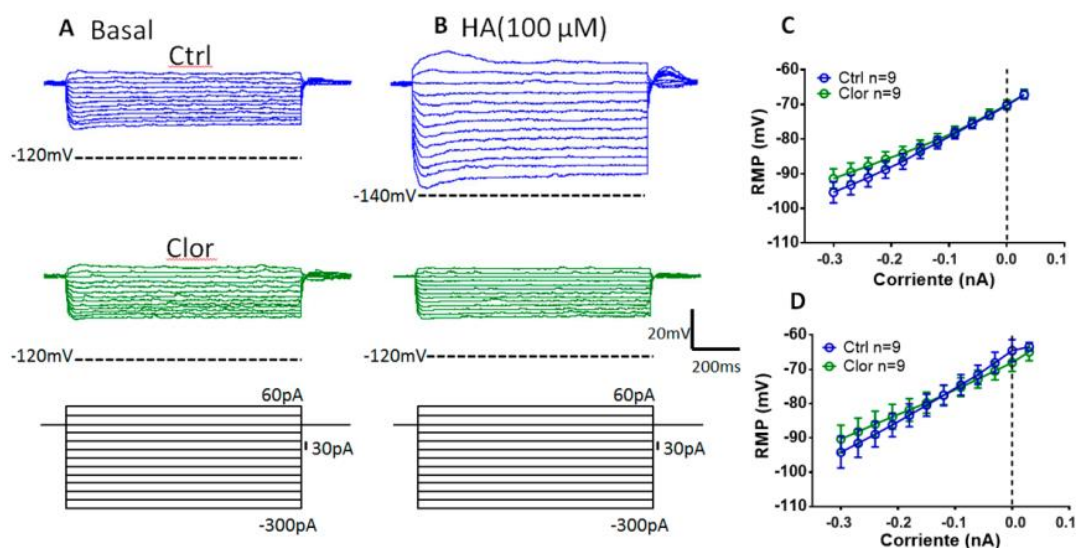
**Tabla 4. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza cerebral de crías de 21 días de edad de ratas control y tratadas con clorfeniramina.**

	Control				Clorfeniramina			
	Basal	HA (1μM)	HA (10μM)	HA (100μM)	Basal	HA (1μM)	HA (10μM)	HA (100μM)
RMP (mV)	-70.0 ± 1.2	-69.1 ± 0.7	-68.6 ± 0.7	-64.1 ± 1.8**	-69.4 ± 1.8	-69.0 ± 1.8	-70.2 ± 1.3	-67.3 ± 2.8
Rin (MΩ)	95.5 ± 11.8	123.9 ± 9.8*	126.6 ± 9.5**	141.6 ± 12.4***	92.3 ± 9.0	95.3 ± 12.7	97.0 ± 15.6	94.8 ± 17.2 <sup>b</sup>
τ (ms)	15.5 ± 2.3	14.6 ± 2.7	17.8 ± 3.7	14.1 ± 3.0	11.7 ± 1.1	14.3 ± 3.5	13.4 ± 2.1	11.1 ± 2.3
Rheobase (pA)	172.2 ± 18.8	150.0 ± 14.4	138.8 ± 21.6	155.5 ± 37.6	188.8 ± 37.0	188.8 ± 27.3	211.1 ± 37.9	227.7 ± 50.7
Sag (mV)	3.8 ± 0.4	4.8 ± 0.3	5.3 ± 0.5	5.6* ± 0.7	3.6 ± 0.5	4.3 ± 0.5	4.3 ± 0.5	3.6 ± 0.6 <sup>a</sup>

Los valores son promedios ± EEM de 9 neuronas provenientes de 3 animales diferentes de camadas distintas por grupo. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs basal; <sup>a</sup> $P < 0.05$  y <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs el grupo Control, a partir de ANOVA Mixto de Medidas Repetidas seguido de la prueba de Sidak.

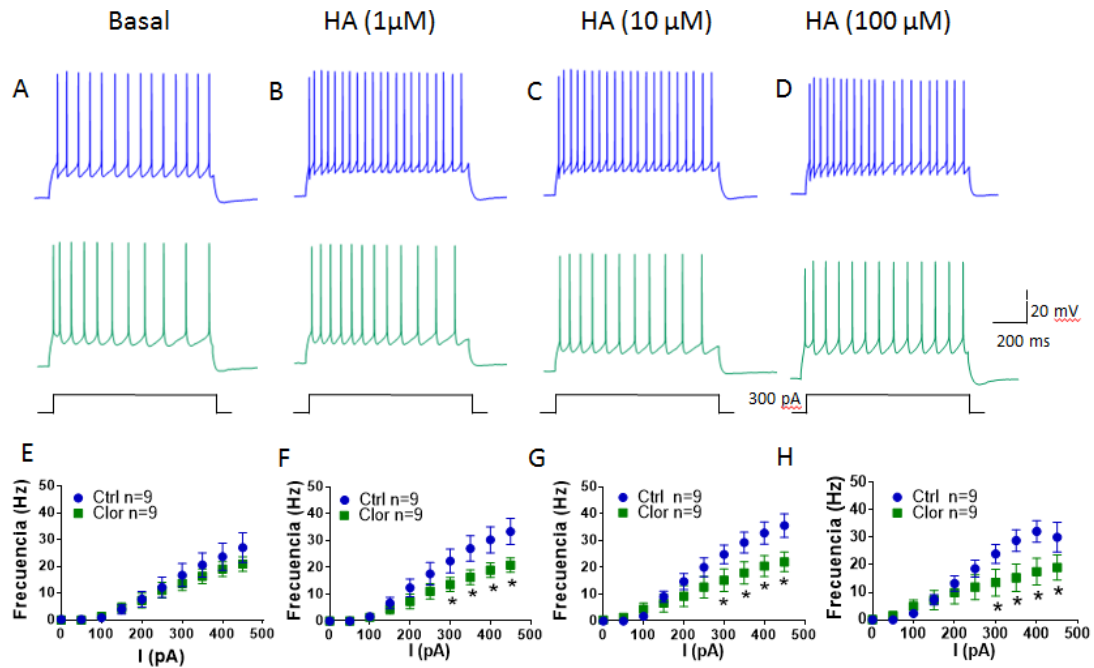
Además, los trazos de la curva I/V mostraron que la inyección de corriente negativa en las neuronas del grupo control hiperpolariza el potencial de membrana en presencia de 100 μM de HA, lo que no ocurre en las neuronas del grupo tratado con clorfeniramina (Figura 23B).





**Figura 23. La histamina no modifica la resistencia de entrada de las neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza motora.** **A y B)** Trazos representativos del cambio en el potencial de membrana en respuesta a la aplicación de corriente (-300 a 60 pA en incrementos de 30 pA) en condiciones basal (**A**) y en presencia de histamina (HA, 100 μM; **B**) en neuronas de los grupos control (Ctrl, azul) y clorfeniramina (Clor, verde). **C y D)** Curvas I/V construidas a partir de los registros obtenidos de 9 neuronas de al menos 3 animales diferentes de camadas distintas en condiciones basal (**C**) y en presencia de histamina (100 μM; **D**). Los círculos son el promedio ± EEM del potencial de membrana obtenido en cada pulso de corriente. ANOVA Mixto de Medidas Repetidas seguido de la prueba de Sidak.

A fin de determinar si el tratamiento con clorfeniramina modifica la excitabilidad de las neuronas piramidales de la corteza motora durante el periodo de formación de las láminas profundas (E12-E14), se aplicaron pulsos de corriente despolarizante (0 a 500 pA, en incrementos de 50 pA con duración de 1 s) y se determinó el número de potenciales de acción generados por segundo (frecuencia en Hz). En la condición basal no se observaron diferencias en la frecuencia de disparo entre los grupos control y el grupo tratado con clorfeniramina. En presencia de HA (1, 10 y 100 μM) las neuronas de los animales del grupo clorfeniramina disparan con menor frecuencia, con respecto al grupo control, a partir de 300 pA (Figura 24).



**Figura 24. El tratamiento con clorfeniramina disminuye la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza motora primaria (P21).** A-D) Trazos representativos de los potenciales de acción evocados por la aplicación de una corriente de 300 pA durante 1 s en condiciones basal (A) y en presencia de 1 μM (B), 10 μM (C) y 100 μM (D) de histamina (HA) en el grupo control (azul) y clorfeniramina (verde). E-H) Análisis de la frecuencia de potenciales de acción generados por la inyección de pulsos de corriente (I, en pA) en condiciones basal (E) y en presencia de histamina para ambos grupos (F-H). Los puntos representan el promedio ± EEM obtenido de 9 neuronas de al menos 3 animales diferentes de camadas distintas de los grupos control (Ctrl, azul) y clorfeniramina (Clor, verde). \* $P < 0.05$  vs el grupo control; ANOVA de Medidas Repetidas y prueba de Sidak.

#### 5.4 Efecto del bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> en la expresión del RH<sub>1</sub> y el nivel de la histamina en la CxM1 en ratas P21

Con el propósito de analizar si la administración de clorfeniramina en el periodo de formación de las láminas profundas (E12-E14) genera cambios en el sistema histaminérgico cortical, que puedan explicar el efecto de la HA en las propiedades electrofisiológicas, en la corteza cerebral de las crías P21 se evaluaron la densidad del RH<sub>1</sub>, mediante ensayos de unión de [<sup>3</sup>H]-mepiramina, y el contenido de HA, mediante ensayos de ELISA.

En los productos tratados con clorfeniramina aumentó la densidad del RH<sub>1</sub> en comparación con el grupo control ( $69 \pm 7$  y  $42 \pm 7$  fmol/mg de proteína, respectivamente; 5 determinaciones,  $P = 0.0046$ , prueba *t* de *Student* no pareada) y el contenido de histamina cortical ( $826 \pm 278$  y  $260 \pm 30$  ng/mg de proteína, respectivamente; 5 determinaciones,  $P = 0.0170$ , prueba *t* de *Student* no pareada).

### **5.5 Efecto del bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> en la activación del RH<sub>1</sub> y RH<sub>2</sub> en las neuronas piramidales de la CxM1 en ratas P21**

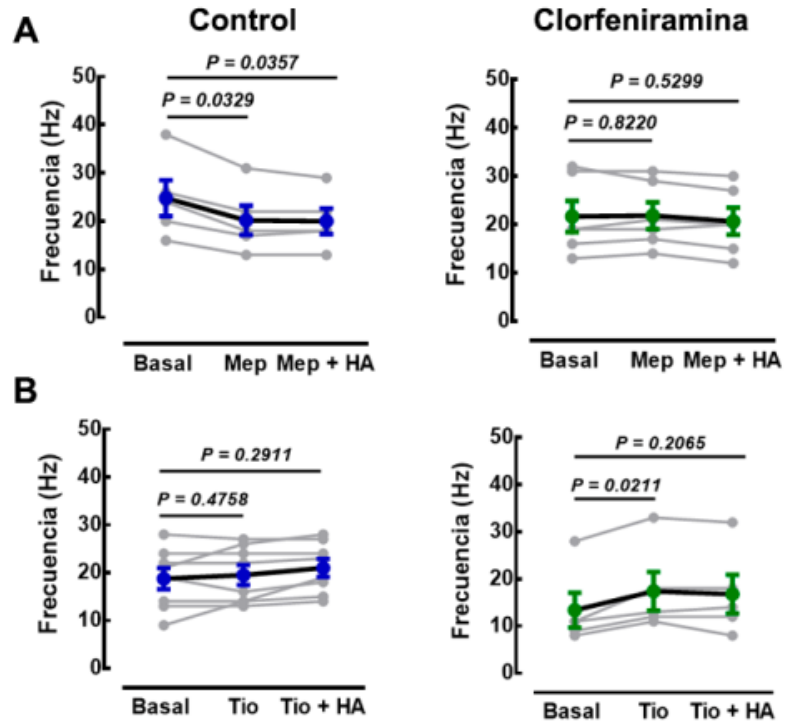
El aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de las láminas V y VI de las crías de ratas tratadas con clorfeniramina, podría ser resultado de la activación de los receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>. Para investigar esta posibilidad se aplicó mepiramina (1 μM) o tiotidina (1 μM), antagonistas/agonistas inversos de los receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, respectivamente, en ausencia o presencia de HA (10 μM).

Se determinó la frecuencia de potenciales de acción en respuesta a pulsos de corriente despolarizante (0 a 500 pA en incrementos de 50 pA, durante 1 s) en la condición basal, seguido de la perfusión de mepiramina o tiotidina, y posteriormente de la perfusión del antagonista/agonista inverso e HA (10 μM). El análisis de la frecuencia se realizó en el trazo con estimulación de 300 pA.

Con relación al RH<sub>1</sub>, en las neuronas de los animales del grupo Ctrl, la perfusión con mepiramina disminuyó la frecuencia de disparo con relación al valor basal y previno el aumento de la frecuencia de disparo producido por HA. La perfusión con mepiramina no modificó la frecuencia de disparo en las neuronas del grupo Clor y no se observaron diferencias cuando, además, se perfundió mepiramina + HA, en comparación con la condición basal (Figura 25A).

Con respecto al RH<sub>2</sub>, en las neuronas de los animales del grupo Ctrl la perfusión con tiotidina no modificó la frecuencia de disparo con relación a la condición basal, pero de manera semejante al antagonista/agonista inverso del RH<sub>1</sub>, previno el aumento en

la frecuencia de disparo producido por la HA. Por otra parte, en las neuronas del grupo Clor la perfusión con tiotidina indujo un aumento significativo en la frecuencia de disparo en relación con la condición basal, y previno el el aumento en la frecuencia producido por HA (Figura 25B).



**Figura 25.** El tratamiento con clorfeniramina altera la actividad constitutiva del  $RH_1$  en las neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza motora primaria (P21). Análisis de la frecuencia de potenciales de acción generados por la inyección de un pulso de corriente de 300 pA durante 1 s en condiciones basal, en presencia de 1  $\mu$ M de mepiramina (Mep; **A**) o 1  $\mu$ M de tiotidina (Tio; **B**), en ausencia o presencia de histamina (HA, 10  $\mu$ M), en los grupos control (azul) y clorfeniramina (verde). Los puntos azules y verdes representan el promedio  $\pm$  EEM obtenido de 5-8 neuronas (círculos y trazos en gris) de al menos 3 animales diferentes de camadas distintas. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de medidas repetidas y la prueba de Sidak.

## 6. Discusión

Durante el embarazo, el 80% de las mujeres presentan náuseas, vómitos y reacciones alérgicas, y el tratamiento de dichas reacciones se basa en el uso de antihistamínicos, por lo que 10-15% de las mujeres embarazadas ingiere dichos fármacos en el primer trimestre de gestación. La clorfeniramina es un antihistamínico (antagonista/agonista inverso del receptor  $H_1$ ) clasificado por la FDA (*Food and Drug Administration*) en la categoría B, donde se ubican los fármacos en los que no se ha demostrado riesgo fetal en estudios realizados en animales, pero para los cuales no se han realizado estudios controlados en mujeres embarazadas (So et al., 2010; Shawky et al., 2015; Gilboa et al., 2014).

Cabe señalar que para nuestro conocimiento no existe evidencia directa del paso de la clorfeniramina a través de la barrera feto-placentaria. Sin embargo, dada la alta permeabilidad membranal, unión moderada a proteínas (Mahar et al., 2004; Xu et al., 2018), distribución rápida en diversos tejidos (incluido el cerebro), y una mayor concentración en los tejidos que en el plasma (Huang y Chiou, 1981; Sakurai et al., 1992; Koch et al., 1998), en conjunto con los efectos reportados en este trabajo, se sugiere que este fármaco es capaz de cruzar la barrera feto-placentaria.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación mostraron que la inyección intrauterina (E12; 25  $\mu\text{g}$ ) o sistémica (E12-E14; 5 mg/kg/día) de clorfeniramina, disminuye la neurogénesis temprana cortical e impide la formación normal del núcleo dopaminérgico de la sustancia negra parte compacta (Molina-Hernández et al., 2013; Márquez-Valadez et al., 2019).

Una inyección única de clorfeniramina en el lumen ventricular de ratas en E12 reduce el nivel de FOXP2 y  $\beta$  III-tubulina, marcadores de neuronas de las capas profundas de la corteza cerebral y de neuronas inmaduras, respectivamente (Molina-Hernández et al. 2013). Este resultado, en conjunto con la evaluación *in vitro* de diversos marcadores de láminas corticales, indica que la HA aumenta el número de neuronas inmunopositivas para FOXP2 (FOXP2<sup>+</sup>) mediante la activación del RH<sub>1</sub>.

Por otro lado, Márquez-Valadez et al. (2019) demostraron que la clorfeniramina induce una disminución en el número de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta, y en el contenido y liberación de dopamina en el neocórtex, así como de la actividad motora estimulada por metanfetamina en ratas juveniles (P21), indicando alteraciones de la transmisión dopaminérgica nigro-estriatal.

Ambos estudios son pioneros en la evaluación de los efectos adversos a corto o largo plazo de la administración de clorfeniramina durante el embarazo, e implican a este fármaco en la programación fetal de patologías idiopáticas del SNC. Por lo anterior, es de nuestro interés continuar y extender el estudio de los efectos a largo plazo de la administración de los antihistamínicos clásicos en otras áreas cerebrales, como la corteza cerebral. Así, en la presente tesis se estudió el efecto de la administración sistémica de clorfeniramina durante el periodo de formación de capas profundas de la corteza cerebral (E12-E14) con el propósito de bloquear al  $RH_1$  y analizar las consecuencias en etapas postnatales tempranas en relación a la citoarquitectura y la función cortical.

Además de ser un antagonista/agonista inverso del  $RH_1$ , la clorfeniramina es un antagonista de los receptores muscarínicos (M1-M5); sin embargo, los valores de  $IC_{50}$  (17-78  $\mu M$ ) para inhibir la unión de [ $^3H$ ]-N-metil-escopolamina a los 5 tipos de receptores muscarínicos expresados en células CHO (*Chinese hamster ovary*) indican una muy baja afinidad (Yasuda y Yasuda, 1999), en comparación con la alta afinidad de la clorfeniramina por el  $RH_1$  con una constante de inhibición ( $K_i$ ) de 1-3 nM (Arias Montaña y Young, 1993; Hishinuma et al., 2017). Así mismo, la expresión de los receptores muscarínicos en la corteza cerebral de la rata inicia en E16, por lo que es poco probable que la clorfeniramina interactúe con los receptores muscarínicos en el periodo de administración (E12-E14).

La clorfeniramina también tiene una alta afinidad por el transportador de serotonina (SERT), con una  $K_i$  de 25 nM en la rata y una constante de disociación ( $K_D$ ) de 15 nM en el humano (Tatsumi et al, 1997; Tanda et al., 2008). En el desarrollo prenatal del SNC de la rata, se ha reportado la expresión del SERT en los núcleos del rafe dorsal (RD) a partir de E12 y transitoriamente en el periodo de E15 a P10 en los

axones de la vía tálamo-cortical (Lebrand et al., 1998; Bonnin et al., 2007; Narboux-Nême et al., 2008). En ratones KO del SERT, en los cuales la concentración extracelular de 5-HT es elevada, se previene la formación de la estructura de barriles, que configura los mapas sensoriales en la corteza cerebral (Salichon et al., 2001; Persico et al., 2001). Lo anterior sugiere que la síntesis y liberación de 5-HT por los axones provenientes del RD, así como la captura y el almacenamiento transitorio del neurotransmisor por los axones tálamo-corticales, son eventos críticos en la formación de la corteza somatosensorial (Lesh et al., 2012).

En relación con lo anterior, Chen y cols. (2015) reportaron que el fenotipo de pérdida de los barriles corticales solo lo presenta el ratón KO del SERT condicionado a los axones tálamo-corticales y no el ratón KO para SERT condicionado a las neuronas del RD, lo que indica que la expresión espacio-temporal del SERT (E15-P10) es crítica para la formación de los mapas sensoriales en la corteza somatosensorial. Así, ya que este periodo es posterior a la ventana de tratamiento con clorfeniramina del presente trabajo (E12-E14), resulta poco probable que los efectos observados en el desarrollo cortical se deban a la interacción de la clorfeniramina con el SERT.

Los resultados de esta tesis sugieren efectos nocivos de la clorfeniramina en etapas tempranas de la corticogénesis (E12-E14), así como una función relevante del  $RH_1$  al inicio de la misma, ya que la administración de clorfeniramina a ratas gestantes indujo modificaciones en la localización y expresión de los marcadores de láminas corticales SATB2 y FOXP2 en los neonatos (P0), así como alteraciones morfológicas y funcionales en las neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza motora primaria en las ratas de 21 días de edad (P21).

Los efectos de la clorfeniramina aquí descritos podrían deberse a la disminución de la actividad constitutiva del receptor sugerida por la alta expresión del  $RH_1$  en E12 (Márquez-Valadez et al., 2019) y/o el bloqueo de su activación por su ligando endógeno, la HA. Lo anterior se apoya con los estudios previos de nuestro grupo, en los que la administración de clorfeniramina en el lumen ventricular de embriones E12 disminuyó la diferenciación neuronal FoxP2<sup>+</sup> en el neuroepitelio cortical de embriones de rata E14 (Molina-Hernández et al., 2013), y la inyección sistémica en

E12-E14 disminuye el fenotipo dopaminérgico en la sustancia negra parte compacta de crías P21 (Marquez-Valadez et al., 2019).

En este trabajo mostramos que la administración sistémica de clorfeniramina durante el pico neurogénico (E12-E14) produjo cambios citoarquitectónicos, morfológicos y funcionales de la corteza cerebral postnatal.

Con relación a la expresión de los factores de transcripción, encontramos una falta de concordancia entre el nivel de RNAm y el de proteína para FOXP2 en los neonatos provenientes de ratas tratadas con clorfeniramina. Lo anterior puede explicarse por cambios en la regulación de la traducción, o bien por disminución en la estabilidad del RNAm (Clovis et al., 2012; Fu et al., 2014).

El incremento de los marcadores neuronales SATB2 y FOXP2 en los neonatos de ratas tratadas con clorfeniramina, sugiere un aumento en la diferenciación neuronal de las láminas superiores (II, III y IV) y profundas (V y VI) de la corteza cerebral frontal. Esta posibilidad es apoyada por el aumento en la transición de NSC a IP, y consecuentemente en la neurogénesis, debido a la mayor expresión de FOXP2 en la VZ, y el menor número de células inmunopositivas a nestina (marcador de NSC), lo que promueve el aumento de la neurogénesis directa o indirecta mediante la producción de IP inmunopositivos a TBR2, comprometidos a neuronas en el neuroepitelio cortical de embriones de 14 días de ratas tratadas con clorfeniramina (i.p; 5 mg/kg) en E12 (De la Merced, 2019). En este sentido, Tsui y cols. (2013) reportaron que FOXP2 promueve la transición de las NSC a IP, al aumentar la división asimétrica de las RGC, para la adquisición del compromiso neuronal y el establecimiento de las láminas profundas de la corteza cerebral, por lo que la mayor diferenciación neuronal en los productos de madres tratadas con clorfeniramina podría deberse al aumento de FOXP2 en las RGC durante el periodo embrionario.

A nivel de la citoarquitectura, los cambios en la distribución de SATB2 y FOXP2 en la CxM1 de los productos de madres tratadas con clorfeniramina sugieren alteraciones durante el proceso de migración neuronal; sin embargo, la inmunodetección de reelina en P0 no mostró diferencias en la inmunofluorescencia en



la CxM1 entre los grupos control y clorfeniramina (Anexos, Figura suplementaria 1; datos no publicados).

De manera interesante, los efectos en la forma neuronal de las crías P21 indica que el bloqueo farmacológico del RH<sub>1</sub> origina pérdida de la polaridad neuronal y disminuye la complejidad dendrítica de las neuronas piramidales de las láminas V y VI, sugiriendo que la migración neuronal está comprometida durante el periodo de formación de las capas profundas, que coincide con el periodo del tratamiento, posiblemente por una disminución temporal de la expresión de reelina y/o sus receptores. En relación con lo anterior, O'Dell y cols. (2012) reportaron que en el ratón mutante *scrambler* (carente de la proteína Dab1) las neuronas de la lámina VI presentan árboles dendríticos desorientados y con menor complejidad con relación al grupo control, lo que sugiere que la señalización mediada por reelina-Dab1 en la corticogénesis temprana es necesaria para regular la orientación y el crecimiento del árbol dendrítico. Por lo anterior, sería importante evaluar la expresión de reelina y de Dab1 en el neuroepitelio cortical de los embriones tratados con clorfeniramina.

En este contexto, resultados preliminares de nuestro grupo sugieren la expresión del RH<sub>1</sub> durante el desarrollo en las células de Cajal-Retzius (CR; Anexo Figura suplementaria 2), por lo que es probable que el bloqueo del receptor en estas células afecte la síntesis y la secreción de reelina. El periodo de tratamiento con el antihistamínico (E12-E14) coincide con la separación de la MZ, donde residen las células CR que sintetizan reelina y la lámina VI (positiva para FOXP2 y TBR1), por lo que era factible que este estrato cortical fuera uno de los más afectados.

Además de la expresión del RH<sub>1</sub> en E12 por las NSC en la VZ del neuroepitelio cortical y las células CR, es importante mencionar que en E14 la marca del RH<sub>1</sub> también se observa en la placa cortical (Anexos, Figura suplementaria 2; datos no publicados).

Lo anterior indica que el tratamiento con clorfeniramina podría afectar a estas tres poblaciones celulares (NSC, CR y neuronas de las capas profundas), afectando los procesos de proliferación, diferenciación, migración y establecimiento del árbol dendrítico durante el desarrollo embrionario.

Los registros electrofisiológicos en las neuronas piramidales de las láminas V/VI en presencia o ausencia de HA, que ejerce un efecto excitador a través de la activación del RH<sub>1</sub> (Wenger et al., 2016), indicaron que los productos de ratas tratadas con clorfeniramina tienen, además de alteraciones citoarquitectónicas y morfológicas, cambios en la excitabilidad de las neuronas de las capas profundas. Nuestros resultados muestran que el grupo clorfeniramina presenta una menor resistencia de membrana en presencia de HA con respecto al grupo control. La resistencia de membrana determina la magnitud de los cambios pasivos en el potencial de membrana, y la curva I/V muestra una relación lineal entre la magnitud de la corriente negativa y la hiperpolarización en estado estable. En este sentido, la disminución de la resistencia de membrana sugiere una mayor expresión de canales de K<sup>+</sup>, lo que se ve apoyado por la menor excitabilidad neuronal en presencia de HA.

En relación con lo anterior se ha reportado que los genes *kcnb1* y *kcmd1*, que codifican las subunidades de los canales de potasio K<sub>v2.1</sub> (*DR potassium channel subunit*) y K<sub>v4.1</sub> (*A-type potassium channel subunit*), respectivamente, son reprimidos por FOXP2 (Spiteri et al., 2007; Vernes et al., 2007), y aunque en el presente estudio se encontró un aumento de FOXP2 en P0, se desconoce el nivel de la proteína en P21 y, aún más, si ejerce una función de represor transcripcional en las neuronas piramidales de los productos de madres tratadas con clorfeniramina. En este contexto Druart y cols. (2020) reportaron que las neuronas piramidales FOXP2<sup>+</sup> de la lámina VI de la corteza auditiva presentaron una menor arborización apical y una menor excitabilidad en ratones con la mutación R552H en la proteína de FOXP2, un fenotipo morfológico y funcional similar al reportado en este trabajo para las neuronas piramidales de los animales del grupo clorfeniramina. Por lo anterior, sería importante determinar la expresión de FOXP2, así como el de las subunidades de los canales de potasio K<sub>v2.1</sub> y K<sub>v4.1</sub>, en la CxM1 de estos productos en la etapa P21.

Los trazos de la curva I/V también mostraron que la HA favorece la hiperpolarización del potencial de membrana en las neuronas control, probablemente debido al bloqueo de canales de K<sup>+</sup> rectificadores entrantes (GIRK), regulados por receptores acoplados a proteínas G, ya que el bloqueo de estas conductancias también promueve el

aumento de la excitabilidad neuronal (Hibino et al., 2010), y aunque no existen reportes de la modulación directa de GIRKs por la activación del RH<sub>1</sub>, estos canales pueden ser fosforilados por PKC, lo que inhibe su actividad (Henry et al., 1996; Lin et al., 2002; Lüsher et al., 2010; Jeremic et al., 2021). Posiblemente las neuronas del grupo de clorfeniramina presenten una menor expresión de GIRKs, o bien, una disminución en la densidad y/o activación del RH<sub>1</sub>.

Por otra parte, los cambios en la excitabilidad neuronal aquí reportados también podrían deberse a disminución en la expresión del RH<sub>1</sub> o alteración del nivel de HA. Sin embargo, y opuesto a lo esperado, el grupo Clor mostró aumento en la densidad del RH<sub>1</sub> y en el contenido cortical de HA. Lo anterior sugiere la participación del RH<sub>2</sub> en los efectos observados, ya que como se mencionó en el primer capítulo de esta tesis, la HA ejerce su efecto excitador mediante la activación de los receptores RH<sub>1</sub> y RH<sub>2</sub>, favoreciendo la despolarización y aumentando la frecuencia de disparo de las neuronas de la lámina VIb en la corteza somatosensorial primaria del ratón (Wenger et al., 2016).

También es importante señalar que el RH<sub>1</sub> se expresa tanto en neuronas como por astrocitos, por lo que los ensayos realizados no descartan la reducción de la expresión del receptor en las neuronas. Aún así, la mayor densidad del RH<sub>1</sub> en membranas totales podría deberse al aumento en el contenido de HA, lo que es apoyado por el reporte de Das y cols. (2007) que muestra que la HA promueve la expresión del RH<sub>1</sub> al aumentar la actividad del promotor del gen del receptor. Lo anterior sugiere que los animales P21 de madres tratadas con clorfeniramina en la etapa prenatal podrían experimentar una mayor exposición a la histamina, la que podría inducir la expresión del RH<sub>1</sub> en la corteza cerebral.

Por otro lado, los experimentos que abordan el efecto de los antagonistas para los receptores RH<sub>1</sub> y RH<sub>2</sub> en la frecuencia de disparo sugieren que en las neuronas de las capas profundas de la corteza cerebral de animales control el incremento en la frecuencia de disparo por HA se debe a la activación de ambos receptores y/o a la actividad constitutiva del RH<sub>1</sub> en las neuronas piramidales de las láminas V y VI de

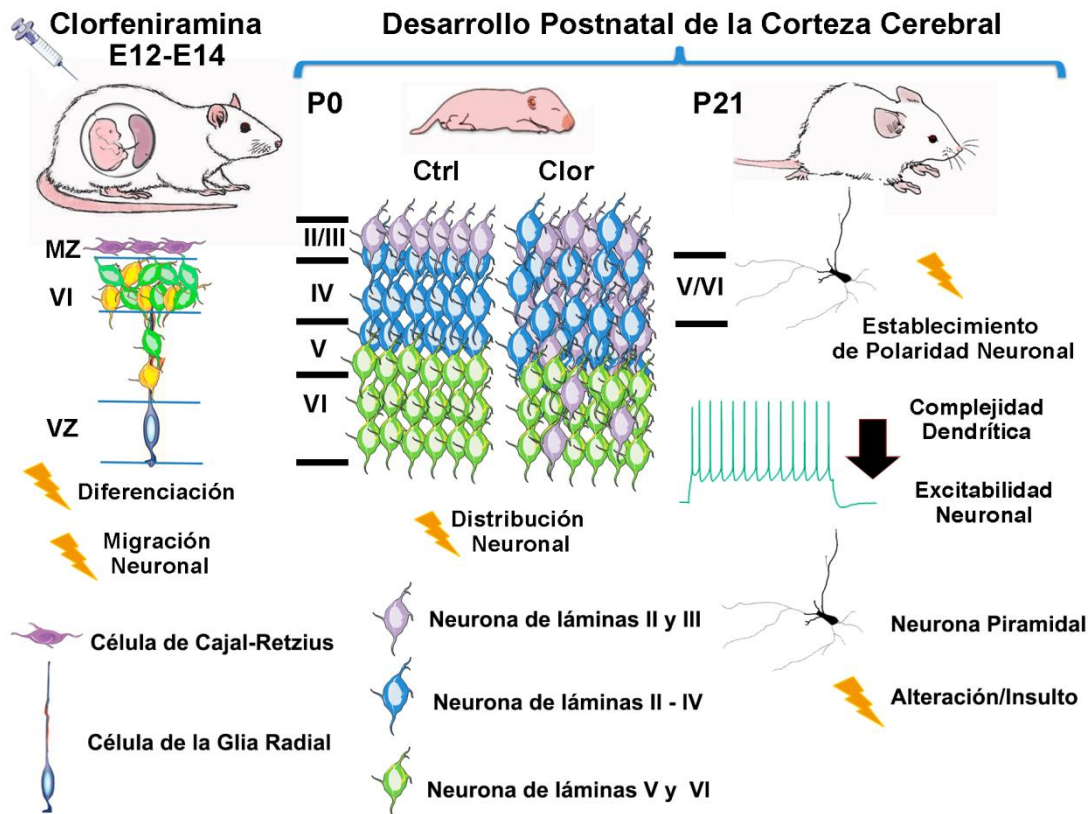
la corteza cerebral, ya que la mepiramina por si sola es capaz de disminuir la frecuencia de disparo.

En contraste, en las neuronas del grupo Clor la presencia de mepiramina no modificó la frecuencia de disparo, lo que sugiere que a pesar de una mayor expresión del RH<sub>1</sub> en las neuronas, el receptor no presenta actividad constitutiva. De manera general este resultado sugiere que el incremento en la expresión del RH<sub>1</sub> no ocurre en el fenotipo neuronal o bien que el receptor ha sido desensibilizado por una mayor liberación de HA endógena.

De manera interesante, en las neuronas del grupo Clor la tiotidina favoreció el aumento en la frecuencia de disparo con relación a la condición basal, sugiriendo que la activación del RH<sub>2</sub> podría disminuir aún más la actividad del RH<sub>1</sub>. En este contexto, el aumento en el contenido de HA cortical podría incrementar aún más esta inhibición “tónica” del RH<sub>1</sub> a través de la estimulación del RH<sub>2</sub>.

En relación a lo anterior, Traiffort y cols. (1992) reportaron que en células CHO co-transfectadas con el RH<sub>2</sub>, la HA inhibe la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y la liberación de ácido araquidónico, y dado que la activación del RH<sub>1</sub> induce la liberación de ácido araquidónico, estos autores sugieren que los receptores H<sub>2</sub> y H<sub>1</sub> podrían generar respuestas fisiológicas opuestas.

En resumen, los cambios en la expresión y distribución de SATB2 y FOXP2 sugieren que el tratamiento de las madres con clorfeniramina durante el periodo de formación de las láminas profundas de la corteza cerebral (E12-E14) induce alteraciones en los procesos de proliferación y migración neuronal en esta etapa, teniendo como consecuencias a largo plazo el empobrecimiento del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de las láminas V y VI de la corteza motora primaria y el aumento en el nivel de histamina y en la densidad del receptor H<sub>1</sub> corticales, además de una menor excitabilidad en respuesta a histamina de las neuronas piramidales de las láminas V y VI debido a los propios cambios morfológicos, a una menor expresión del RH<sub>1</sub> o a modificación de la dinámica de activación e inactivación del RH<sub>1</sub> (desensibilización) en las neuronas de las láminas corticales profundas (Figura 26).



**Figura 26. Efecto de la administración prenatal de clorfeniramina en la citoarquitectura y función de las neuronas piramidales de la corteza motora primaria.** La administración de clorfeniramina en el periodo de formación de las láminas profundas de la corteza cerebral (E12-E14) induce cambios en la expresión y distribución de los marcadores de láminas profundas y superficiales (P0), alteraciones que sugieren modificaciones en los procesos de diferenciación y migración neuronales, aberraciones en el establecimiento de la polaridad celular y arboles dendríticos empobrecidos en las neuronas piramidales de las láminas V y VI. Además, estas células presentaron disminución en la excitabilidad en respuesta a histamina (P21). Abreviaturas: **E**, día embrionario; **P**, día post-natal; **MZ**, zona marginal; **VZ**, zona ventricular; **Ctrl**, grupo control; **Clor**, grupo clorfeniramina.

## 7. Conclusiones

El bloqueo farmacológico del receptor H<sub>1</sub> con clorfeniramina en el periodo de formación de las láminas corticales V/VI (E12-E14):

1. Induce cambios en la distribución de los marcadores de las neuronas de proyección cortico-corticales y cortico-estriatales de la CxM1 de ratas neonatas.
2. Altera el establecimiento del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de las láminas V/VI, con disminución de la complejidad dendrítica y anomalías en la polaridad neuronal en ratas P21.
3. Aumenta la densidad del receptor H<sub>1</sub> y el contenido de histamina cortical en ratas P21.
4. Disminuye la excitabilidad de las neuronas piramidales de las láminas V/VI de la CxM1 de ratas P21 en respuesta a histamina.

## Referencias

- Alcamo, E.A., Chirivella, L., Dautzenberg, M., Dobreva, G., Farinas, I., Grosschedl, R., McConnell SK. (2008). *Satb2* regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron*, 57(3), 364-377. doi: 10.1016/j.neuron.2007.12.012
- Ambrée, O., Buschert, J., Zhang, W., Arold, V., Dere, E., Zlomuzica, A. (2014). Impaired spatial learning and reduced adult hippocampal neurogenesis in histamine H1 receptor knockout mice. *Eur Neuropsychopharm*, 24: 1394-1404. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.04.006.
- Arias-Montaña, J. A., Young, J. M. (1993). Characteristics of histamine H<sub>1</sub> receptors on HeLa cells. *Eur. J. Pharmacol.* 245, 291–295. doi: 10.1016/0922-4106(93)90110-U
- 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. doi: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb17489.x.
- Arrang JM, Garbag M, Lancelot JC, Lecomte JM, Pollard H, Robba M, et al. (1987). Highly potent and selective ligands for histamine H<sub>3</sub>-receptors. *Nature*, 327:117-23.
- Arlotta, P., Molyneaux, BJ., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., Macklis, JD. (2005) Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, 45:207–221. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.036.
- Auvinen, S., Panula, P. (1988). Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain. *J Comp Neurol*, 276:289-303. doi: 10.1002/cne.902760211.
- Bakker R.A., Wieland K., Timmerman H., Leurs R. (2000) Constitutive activity of the histamine H<sub>1</sub> receptor reveals inverse agonism of histamine H<sub>1</sub> receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 387, 5-7. doi: 10.1016/s0014-2999(99)00803-1.
- Bakker RA, Nicholas MW, Smith TT, Burstein ES, Hacksell U, Timmerman H, et al. (2007). In vitro pharmacology of clinically used central nervous system-active drugs as inverse H1 receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther*; 322:172-9.
- Baranek, C., Dittrich, M., Parthasarathy, S., Bonnon, CG., Britanova, O., Lanshakov, D., Boukhtouche, F., Sommer, JE., Colmenares, C., Tarabykin, V, Atanasosky, S. (2012) Protooncogene *Ski* cooperates with the chromatin-remodeling factor *Satb2* in specifying callosal neurons. *Proc Natl Acad Sci*, 109:3546–3551. doi: 10.1073/pnas.1108718109.
- Barnes, A.P. and Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci*, 32:347-381. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125536.
- Bayer, S. and Altman, J. (1990). Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Exp Neurol*, 107: 48-62. doi: 10.1016/0014-4886(90)90062-w.

- Bean, B. P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 451–465. doi: 10.1038/nrn2148.
- Bell JK, McQueen DS, Rees JL. (2004). Involvement of histamine H<sub>4</sub> and H<sub>1</sub> receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in Balb C mice. *Br J Pharmacol*, 142:374-80.
- Blane, A., Dirr, H. W., Fanucchi, S. (2018). A phosphomimetic study implicates Ser<sup>557</sup> in regulation of FOXP2 DNA binding. *Protein J.* 37, 311–323. doi: 10.1007/s10930-018-9777-7.
- Bocchi, R., Egervari, K., Carol-Perdiguer, L., Viale, B., Charles, Q., De roo, M., Boitard, M., Oskouie, S., Salmon, P., Kiss, J. (2017). Perturbed Wnt signaling leads to neuronal migration delay, altered interhemispheric connections and impaired social behavior. *Nat Commun*, 8:1158. doi: 10.1038/s41467-017-01046-w.
- Bonnin, A., Torii, M., Wang, L., Rekić, P., Levitt, P. (2007). Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. *Nat Neurosci*, 10:588-597. doi: 10.1038/nn1896.
- 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. doi: 10.1177/0883073815575574.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Buchsbaum, I. and Cappello, S. (2019). Neuronal migration in the CNS during development and disease: insights from in vivo and in vitro models. *The company of Biologists Ltd, Development*, 146:1-17. doi: 10.1242/dev.163766.
- Buckland KF, Williams TJ, Conroy DM. (2003). Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H<sub>4</sub> receptor. *Br J Pharmacol*; 140:1117-27.
- Bystron, L., Blackemore, C., Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: boulder committee revisited. *Nat Rev Neurosci*, 9: 110-122. doi: 10.1038/nrn2252.
- Calderon de Anda, F., Gärdner, A., Tsai, Li-Huei., Dotti, C. (2008). Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *J Cell Sci*, 121: 178-185. doi: 10.1242/jcs.023143.
- Castellucci, G. A., McGinley, M. J., McCormick, D. A. (2016). Knockout of FoxP2 disrupts vocal development in mice. *Sci. Rep.* 6:23305. doi: 10.1038/srep23305.
- Castellucci, G. A., McGinley, M. J., McCormick, D. A. (2017). Corrigendum: knockout of FoxP2 disrupts vocal development in mice. *Sci. Rep.* 7:39722. doi: 10.1038/srep39722.
- Cervera-Mérida, J., Baixauli-Fortea, I., Ygual-Fernández, A. (2011). Intervención logopédica en un caso de dispraxia verbal y trastorno por déficit de atención con hiperactividad. *Logopedia, Foniatría y Audiología*, 31(4):203-218. doi:10.1016/S0214-4603(11)70189-9.



- Chabout, J., Sarkar, A., Patel, S. R., Radden, T., Dunson, D. B., Fisher, S. E., et al. (2016). A FoxP2 mutation implicated in human speech deficits alters sequencing of ultrasonic vocalizations in adult male mice. *Front. Behav. Neurosci.* 10:197. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00197.
- Chen, L., Ma, Y., Qian, L., Wang, J. (2013). Sumoylation regulates nuclear localization and function of finger transcription factor ZIC3. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833 (2013) 2725-2733. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.07.009.
- Chen, X., Ye, R., Gargus, J., Blakely, R., Dobreins, K., Ying Sze, J. (2015). Disruption of transient serotonin accumulation by non-serotonin-producing neurons impairs cortical map development. *Cell Reports*, 10: 346-358. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.033.
- Chen, Y. C., Kuo, H. Y., Bornschein, U., Takahashi, H., Chen, S. Y., Lu, K. M., et al. (2016). FoxP2 controls synaptic wiring of corticostriatal circuits and vocal communication by opposing Mef2c. *Nat. Neurosci.* 19, 1513–1522. doi: 10.1038/nn.4380.
- Cilz, N. I. y Lei, S. (2017). Histamine facilitates GABAergic transmission in the rat entorhinal cortex: roles of H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors, Na<sup>+</sup> permeable cation channels, and inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Hippocampus* 27, 613–631. doi: 10.1002/hipo.22718.
- Clovis, Y., Enard, W., Mariano, F., Huttner, W., De Pietri, D. (2012). Convergent repression of FoxP2 3'UTR by miR-9 and miR-132 in embryonic mouse neocortex: implications for radial migration of neurons. *Development* 139:3332-3342. doi: 10.1242/dev.078063.
- Connelly, W.M., Shenton, F.C., Lethbridge, N., Leurs, R., Waldvogel, H.J., Faull, R.L., Lees, G., Chazot, P.L., 2009. The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *Br. J. Pharmacol.* 157:55-63. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00227.x.
- Crosson, B. (2019). The role of cortico-thalamo-cortical circuits in language: recurrent circuits revisited. *Neuropsychol. Rev.* 1–18. doi: 10.1007/s11065-019-09421-8.
- 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. doi: 10.1016/j.neures.2006.10.020.
- D'Arcangelo, G., Miao, G., Chen, C., Soares, H., Morgan, J. y Carrant, T. (1995). A protein related to extracellular matrix protein deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, 374:719-723. doi: 10.1038/374719a0.
- 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 H1 receptor up-regulates histamine H1 receptor itself through activation of receptor gene transcription. *J Pharmacol Sci*, 103:374-382. doi: 10.1254/jphs.fp0061411.
- De la Merced, D.S. (2019). Participación del receptor H<sub>1</sub> en la expresión de FoxP2 en el neuroepitelio cortical de embriones de ratas sanas e hiperglucémicas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Estado de México, México.

- Dobрева G, Dambacher J, Grosschedl R. (2003) SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression. *Genes Dev*, 17:3048–3061. doi: 10.1101/gad.1153003.
- Docker, D., Schubach, M., Menzel, M., Munz, M., Spaich, C., Biskup, S., Bartholdi, D. (2014). Further delineation of the SATB2 phenotype. *Eur J Hum Genet*, 22(8) 1034-1039. doi: 10.1038/ejhg.2013.280.
- Dong, H., Zhang, W., Zeng, X., Hu, G., Zhang, H., He, S., Zhang, S. (2014). Histamine induces upregulated expression of histamine receptors and increases release of inflammatory mediators from microglia. *Mol Neurobiol*, 49:1487-1500. doi: 10.1007/s12035-014-8697-6
- Druart, M., Groszer, M., Le Magueresse, C. (2020). An etiological FoxP2 mutation impairs neuronal gain in layer VI cortico-thalamic cells through increased GABAB/GIRK signaling. *J. Neurosci.*, 40(44): 8543-8555. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2615-19.2020.
- Elston, G. and Fujita I. (2014). Pyramidal cell development: postnatal spinogenesis, dendritic growth, axon growth, and electrophysiology. *Frontiers in neuroanatomy*. 8:78. doi: 10.3389/fnana.2014.00078.
- Enard, W., Gehre, S., Hammerschmidt, K., Hölter, S. M., Blass, T., Somel, M., et al. (2009). A humanized version of FoxP2 affects cortico-basal ganglia circuits in mice. *Cell* 137, 961–971. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.041.
- Enard, W. (2011). FOXP2 and the role of cortico-basal ganglia circuits in speech and language evolution. *Curr Opin Neurobiol*. 21(3):415-424. doi: 10.1016/j.conb.2011.04.008.
- Escobedo-Ávila I, Vargas-Romero F, Molina-Hernández A, López-González R, Cortés D., De Carlos J.A., Velasco I. (2014) Histamine impairs midbrain dopaminergic development in vivo by activating histamine type 1 receptors. *Mol Brain*. 7, 58. doi: 10.1186/s13041-014-0058-x.
- Ferreira, R., Santos, T., Goncalves, J., Baltazar, G., Ferreira, L., Agasse, F., Bernardino, L. (2012). Histamine modulates microglia function. *J Neuroinflammation*, 9:90. doi:10.1186/1742-2094-9-90.
- 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.
- Friedman R. C., Farh K. K., Burge C. B., Bartel D. P. (2009). Most Mammalian mRNAs Are Conserved Targets of MicroRNAs. *Genome Research*, 19:92-105. doi:10.1101/gr.082701.108.
- Friedenauer, S. and Berlet H. (1989). Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal biochem*, 178:263-268. doi: 10.1016/0003-2697(89)90636-2.

- Frotscher, M. (1997). Cajal Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol*, 8: 570-575. doi: 10.1016/s0959-4388(98)80082-2.
- 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. doi: 10.1007/s00125-006-0153-3.
- Fu, L., Shi, Z., Luo, G., Tu, W., Wang, X., Fang, Z., Li, X. (2014) Multiple microRNAs regulate human FOXP2 gene expression by targeting sequences in its 3' untranslated region. doi: 10.1186/s13041-014-0071-0.
- Fujita, E., Tanabe, Y., Shiota, A., Ueda, M., Suwa, K., Momoi, M., Momoi, T. (2008). Ultrasonic vocalization impairment of FoxP2 (R552H) knockin mice related to speech-language disorder and abnormality of Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3117–3122. doi: 10.1073/pnas.0712298105.
- Gajtkowski GA, Norris DB, Rising TJ, Wood TP (1983). Specific binding of <sup>3</sup>H-tiotidine to histamine H<sub>2</sub> receptors in guinea pig cerebral cortex. *Nature*; 304:65-7
- García-Carrapato M. (2003). The offspring of gestational diabetes. *J Perinat Med*, 31:5-11. doi: 10.1515/JPM.2003.001.
- García-Gálvez, AM y Arias-Montaño, JA. (2016). Isoformas del receptor a histamina H3 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. doi: 10.1038/nature07287.
- Gilboa S.M., Ailes E.C., Rai R.P., Anderson J.A., Honei M.A. (2014) Antihistamines and birth defects: a systemic review of the literature. *Expert Opin Drug Saf*. 13, 1667-98. doi: 10.1517/14740338.2014.970164.
- Goswami, T., Li, X., Smith, A. M., Luderowski, E. M., Vincent, J. J., Rush, J., Ballif, B. (2012). Comparative phosphoproteomic analysis of neonatal and adult murine brain. *Proteomics* 12, 2185–2189. doi: 10.1002/pmic.201200003.
- Glover, J. (2009). “The developmental and functional logic of neuronal circuits”: commentary on the Kavli Prize in Neuroscience. *Neurosci* 163: 977-984. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.07.047
- Groszer, M., Keays, D., Deacon R., de Bono, J., Prasad-Mulcare, S., Gaub, S., Baum, M., French, C., Nicod, J., Coventry, J., Enard, W., Fray, M., Brown, S., Nolan, P., Pääbo, S., Channon, K., Costa, r., Eilers, J., Ehret, G., Rawlins, J., Fisher, S. (2008). Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech deficits. *Curr Biol*, 18:354-362. doi: 10.1016/j.cub.2008.01.060.

- Haas, H y Konnerth, A. 1983. Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal piramidal cells. *Nature*, 302(5907), 432-434. doi: 10.1038/302432a0.
- Haas, H.L., Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 4:121-130. doi: 10.1038/nrn1034.
- Haas, H.L., Sergeeva, O.A., Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiol Rev*, 88:1183-1241. doi: 10.1152/physrev.00043.2007.
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Ik-Tsen, J., Guerrier, S., Boutt, E., Petters, E., Barnes, A., Parras, C., Schuumans, C., Guillemot, F., Polleux, F. (2005). Phosphorylation of neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron*, 48:45-62. doi: 10.1016/j.neuron.2005.08.032.
- Hasen, A., Duellberg, C., Mieck, C., Loose, M., Hippenmeyer, S. (2017). Cell polarity in cerebral cortex development-cellular architecture shaped by biochemical networks. *Front Cell Neurosci*. 11:176. doi 10.3389/fncel.2017.00176/full
- Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Sarkisian, MR., Bartley, CM., Shen, J., Radtke, F., Gridley, T., Sestan, N., Rakic, P. (2008) Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron* 60:273-284. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.026.
- Hatanaka, Y., Yamauchi, K., Murakami, F. (2012). Formation of axon-dendrite polarity in situ: Initiation of axon from polarized and non-polarized cells. *Dev Growth Differ*, 54: 398-407. doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01344.x.
- Henry P, Pearson WL, Nichols CG. (1996). Protein kinase C inhibition of cloned inward rectifier (HRK1/KIR2.3) K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 495: 681–688. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021625.
- Hew RW, Hodgkinson CR, Hill SJ. (1990). Characterization of histamine H<sub>3</sub>-receptors in guinea-pig ileum with H<sub>3</sub>-selective ligands. *Br J Pharmacol*; 101:621-4.
- Hevner, R., Shi, L., Justice, N., Hsueh, T., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A., Campagnoni, A., Rubenstein, J. (2001) Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29: 353–366. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00211-2.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90: 291-366. Doi: 10.1152/physrev.00021.2009.
- Hill SJ, Young JM, Marrian DH. (1977). Specific binding of <sup>3</sup>H-mepyramine to histamine H<sub>1</sub> receptors in intestinal smooth muscle. *Nature*; 270:361-3.
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, et al. (1997) International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev*; 49:253-78.

- Hishinuma, S., Kosaka, K., Akatsu, C., Uesawa, Y., Fukui, H., Shoji, M. (2017). Asp73-dependent and -independent regulation of the affinity of ligands for human histamine H1 receptors by Na. *Biochem. Pharmacol.* 128,46–54. doi: 10.1016/j.bcp.2016.12.021
- Honrubia M.A., Vilaró M.T., Palacios J.M., Mengod G. (2000) Distribution of the histamine H2 receptor in monkey brain and its mRNA localization in monkey and human brain. *Synapse.* 38, 343-354. doi: 10.1002/1098-2396(20001201)38:3<343::AID-SYN14>3.0.CO;2-M.
- Houshmand-Oeregaard, A., Schrolkamp, M., Kelstrup, L., Hansen, N. S., Hjort, L., Thuesen, A. C. B., et al. (2018). Increased expression of microRNA-15a and microRNA-15b in skeletal muscle from adult offspring of women with diabetes in pregnancy. *Hum. Mol. Genet.* 27, 1763–1771. doi: 10.1093/hmg/ddy085.
- Huang, S., Chiou, L. (1981). Pharmacokinetics and tissue distribution of chlorpheniramine in rabbits after intravenous administration. *J Pharmacokinet Biopharm.* 9(6):711-23. doi: 10.1007/BF01070902
- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 9<sup>th</sup> edn.* Brussels, Belgium: 2019. Available at: .
- Jablonowski JA, Grice CA, Chai W, Dvorak CA, Venable JD, Kwok AK, et al. (2003) The first potent and selective non-imidazole human histamine H<sub>4</sub> receptor antagonists. *J Med Chem.* 46:3957-60.
- Jawerbaum, A., and White, V. (2010). Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocr Rev.* 31:680-701. doi: 10.1210/er.2009-0038. Epub 2010 Jun 9.
- Jeremic, D., Sanchez-Rodriguez, I., Jimenez-Diaz, L., Navarro-Lopez, J. (2021). Therapeutic potential of targeting G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in the central nervous system. *Pharmacology and Therapeutics*, 223(107808): 1-18. doi:10.1016/j.pharmthera.2021.107808.
- Johnson. E. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev. Biochem.* 73:355-382.
- Ji, S., Zhou, W., Li, X., Liu, S., Wang, F., Li, X., Zhao, T., Ji, G., Du, J., Hao, A. (2019). Maternal hyperglycemia disturbs neocortical neurogenesis via epigenetic regulation in C57BL/6J mice. *Cell Death and Disease.* 10:211. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.021.
- Ji, M.-J., Zhang, X.-Y., Peng, X.-C., Yang, X.-Z., Chen, Z., Yu, L., et al. (2018). Histamine excites rat GABAergic ventral pallidum neurons via co-activation of H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors. *Neurosci. Bull.* 34, 1029–1036. doi: 10.1007/s12264-018-0277-8.
- Jiang, X. y Nardelli, J. (2016). Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiology of Disease* 92: 3-17. doi: 10.1016/j.nbd.2015.07.007.
- Jin, C., Panula, P. (2005). The laminar histamine receptor system in human prefrontal cortex suggests multiple levels of histaminergic regulation. *Neuroscience*, 132:137-149. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.12.017.

- Kahlson, G., Rosengren, E., White T. (1960) The formation of histamine in the rat foetus. *J Physiol*, 151:131-138. doi:10.1113/jphysiol.1960.sp006427.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S., Hudapeth, A. (2013) *Principles of Neural Science*. Fifth Edition, New York, USA: McGraw-Hill. pp.1194-1197.
- Kathmann M, Schlicker E, Detzner M, Timmerman H. (1993). Nordimaprit, homodimaprit, clobenpropit and imetit: affinities for H<sub>3</sub> binding sites and potencies in a functional H<sub>3</sub> receptor model. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 348:498-503.
- Karlstedt K., Senkas A., Ahman M., Panula P. (2001) Regional expression of the histamine H<sub>2</sub> receptor in adult and developing rat brain. *Neuroscience*. 102, 201-208. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00464-4.
- Kast, R., Lanjewar, A., D Smith, C., Levitt, P. (2019). FOXP2 exhibits neuron class specific expression, but is not required for multiple aspects of cortical histogenesis. *Elife*, 8:e42012. doi.org/10.7554/eLife.42012.001.
- Koch, K., O Connor-Semmes, R., Davus, I., Yin, Y. (1998). Stereoselective pharmacokinetics of chlorpheniramine and the effect of ranitidine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 87(9):1097-1100. doi:10.1021/js980045m
- 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. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007
- Ladriou, P. y Goffinet, A. (1981). Inverted pyramidal neurons and their axons in the neocortex of reeler mutant mice. *Cell Tissue Res*, 218: 293-301. doi: 10.1007/BF00210345.
- Lamadrid-Romero, M., Solís, K.H., Cruz-Resendiz, M.S., Pérez, J.E., Díaz, N.F., Flores-Herrera, H., García-López, G., Perichart, O., Reyes-Muñoz, E., Arenas-Huertero, F., Eguía-Aguilar, P., Molina-Hernández, A. (2017). Central nervous system development-related microRNAs levels increase in the serum of gestational diabetic women during the first trimester of pregnancy. *Neuroscience Research*, 130. doi: 10.1016/j.neures.2017.08.003.
- Lambracht-Hall, M., Dimitriadou, V., Theoharis, C., T. (1990). Migration of mast cells in the developing rat brain. *Dev Brain Res*, 56:151-159. doi: 10.1016/0165-3806(90)90077-c.
- Lebrand, C., Cases, O., Wehrlé, R., Blakely, R., Edwards, R., Gaspar, P. (1998). Transient developmental expression of monoamine transporters in the rodent forebrain. *The journal of comparative neurology*, 401: 506-524. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19981130)401:4<506::AID-CNE5>3.0.CO;2-%23
- Lee, GH y D'Arcangelo, G. (2016). New insights into reelin-mediated signaling pathways. *Front. Cell. Neurosci*, 10:122. doi: 10.3389/fncel.2016.00122.

- Leone, D.P., Heavner, W.E., Ferenczi, E.A., Dobрева, G., Huguenard, J.R., Grosschedl, R., et al. (2015). *Satb2* regulates the differentiation of both callosal and subcerebral projection neurons in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex* 25(10), 3406-3419. doi: 10.1093/cercor/bhu156. Epub 2014 Jul 17.
- Lesh, K-P., Waider, J. (2012). Serotonin in the modulation of neuronal plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron*, 76: 175-191. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.013.
- Leurs, R., Chazot, P.L., Shenton, F.C., Lim, H.D., de Esch, I.J.P., 2009. Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H4 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 157, 14–23. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00250.x.
- Lin D, Sterling H, Lerea KM, Giebisch G, Wang WH. (2002) Protein kinase C (PKC)-induced phosphorylation of ROMK1 is essential for the surface expression of ROMK1 channels. *J Biol Chem* 277:44278–44284. doi: 10.1074/jbc.M203702200.
- Ling P, Ngo K, Nguyen S, Thurmond RL, Edwards JP, Karlsson L, et al. (2004). Histamine H<sub>4</sub> receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol*,142:161-71.
- Lintunen, M., Sallmen, T., Karlstedt, K., Fukui, H., Ericksson, K., Panula, P. (1998). Postnatal expression of H1-receptor mRNA in the rat brain: correlation to L-histidine decarboxylase expression and local upregulation in limbic seizures. *Eur Jour Neurosci*, 10:2287-2301. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00240.x.
- Lodato, S y Arlotta, P. (2015). Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31:11.1-11.22. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125353.
- 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. doi: 10.1155/EDR.2003.107.
- Leurs R, Smit MJ, Timmerman H. (1995). Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther*, 66:413-63.
- Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, de Esch IJ. (2005) The histamine H<sub>3</sub> receptor: from gene cloning to H<sub>3</sub> receptor drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 4:107-20.
- 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. doi: 10.1007/s00125-004-1351-5.
- Livak, K. J. y 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. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lüscher, C., Slesinger, P., (2010). Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, 11:301-315. doi:10.1038/nrn2834.

- Mahar, K., Wring, S., Shampine, L., Jordan, K., Kratz, J., Yang, E., Serabjit-Singh, C., Adkinson, K., Polli, J. (2004). Steady-state brain concentrations of antihistamines in rats - interplay of membrane permeability, P-glycoprotein efflux and plasma protein binding. *Pharmacology*, 72 (2):92-8. doi:10.1159/000079137
- Márquez-Valadez, B., Aquino-Miranda, G., Quintero-Romero, M.O., Papacostas-Quintanilla H., Bueno-Nava, A., López-Rubalcava, C., Díaz, N. F., Arias-Montaña, J.A., Molina-Hernández, A. (2019). The systemic administration of the histamine H<sub>1</sub> receptor antagonist/inverse agonist chlorpheniramine to pregnant rats impairs the development of nigro-striatal dopaminergic neurons. *Front Neurosci*, 13:360. doi: 10.3389/fnins.2019.00360.
- Márquez-Valadez, B., Valle-Bautista, R., García-López, G., Diaz, N. F., Molina-Hernández, A. (2018). Maternal diabetes and fetal programming toward neurological diseases: beyond neural tube defects. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 9: 664. doi: 10.3389/fendo.2018.00664.
- 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. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008.
- Marin-Padilla, M. (2001). Evolución de la estructura de la neocorteza del mamífero: nueva teoría citoarquitectónica. *Rev Neurol*, 33(9): 843-853. doi: 10.33588/rn.3309.2001393
- McKenna, W., Betancourt, J., Larkin, K., Abrams, B., Guo, C., Rubenstein, JLR., Chen, B. (2011) *Tbr1* and *Fezf2* regulate alternate corticofugal neuronal identities during neocortical development. *J Neurosci*, 31: 549–564. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4131-10.2011.
- McCormick, D. A., y Williamson, A. (1991). Modulation of neuronal firing mode in cat and guinea pig LGNd by histamine: possible cellular mechanisms of histaminergic control of arousal. *J. Neurosci.* 11, 3188–3199. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-10-03188.1991.
- Meredith, L. J., Wang, C. M., Nascimento, L., Liu, R., Wang, L., Yang, W. H. (2016). The key regulator for language and speech development, *FOXP2*, is a novel substrate for SUMOylation. *J. Cell. Biochem.* 117, 426–438. doi: 10.1002/jcb.25288.
- 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. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05424.x.
- Molina-Hernández, A., Díaz, N. F., Arias-Montaña, J.A. (2012). Histamine in brain development. *J Neurochem*, 125:872-882. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07863.x.
- Molina-Hernández, A., Martínez-Rodríguez G., Escobedo-Ávila I., Velasco, I. (2013). Histamine 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. doi: 10.1186/1749-8104-8-4.



- Molyneaux, BJ., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., Macklis, JD (2005) Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron*, 47:817–831. doi: 10.1016/j.neuron.2005.08.030.
- Mooney, R. (2020). The neurobiology of innate and learned vocalizations in rodents and songbirds. *Curr. Opin. Neurobiol.* 64, 24–31. doi: 10.1016/j.conb.2020.01.004.
- Moreno-Delgado D, Torrent A, Gomez-Ramirez J, De EI, Blanco I, Ortiz J. (2006) Constitutive activity of H3 autoreceptors modulates histamine synthesis in rat brain through the cAMP/PKA pathway. *Neuropharmacology* 51: 517–523. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.04.010.
- Narboux-Nême, N., Pavone, L., Avallone, L., Zhuang, X., Gaspar, P. (2008). Serotonin transporter transgenic (SERT<sup>ctc</sup>) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). *Neuropharmacology*, 55:994-1005. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.08.020.
- Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K.(2000) Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4 R. *Biochem Biophys Res Commun* 2000. 279:615-20. doi: 10.1006/bbrc.2000.4008.
- Naranjo, P., Naranjo, E. (1968). Embryotoxic effects of antihistamines. *Arzneimittelforschung*, 18:188-195.
- National Toxicology Program (1986). Toxicology and carcinogenesis studies of chlorpheniramine maleate in F344/N rats and B6C3F1 mice.
- Noctor, S., Martínez-Cerdeño, V., Lidija, I. y Kriegstein, A. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci*, 7:136-144. doi: 10.1038/nn1172. Epub 2004 Jan 4.
- Nijmeijer S., Leurs R., Vischer H.F. (2010) Constitutive activity of the histamine H<sub>1</sub> receptor. *Meth. Enzymol.* 484,127-47. doi: 10.1016/B978-0-12-381298-8.00007-1.
- Niu S., Renfro A., Quattrocchi C. C., Sheldon M., D’Arcangelo G. (2004) Reelin promotes Hippocampal Dendrite Development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 Pathway. *Neuron*, 41:71–84. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00819-5.
- Nieder, A., and Mooney, R. (2020). The neurobiology of innate, volitional and learned vocalizations in mammals and birds. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol.Sci.* 375:20190054. doi: 10.1098/rstb.2019.0054.
- O'Dell RS, Ustine CJM, Cameron DA, Lawless SM, Williams RM, Zipfel WR, Olson EC. (2012) Layer 6 cortical neurons require Reelin-Dab1 signaling for cellular orientation, Golgi deployment, and directed neurite growth into the marginal zone. *Neural Dev* 7:25. doi: 10.1186/1749-8104-7-25.
- Olson, E., Kim, S., Walsh, C. (2006) Impaired neuronal positioning and dendritogenesis in the neocortex after cell-autonomous Dab1 suppression. *J Neurosci*, 26:1767-1775. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3000-05.2006.

- Ornoy, A., Wolf, A., Ratzon, A., Greenbaum, C., Dulitzky, 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. doi: 10.1136/fn.81.1.f10.
- Ornoy, A., Ratzon, N., Greenbaum, C., Wolf, A., Dulitzky, M. (2001). Schoolage children born to diabetic mothers and to mothers with gestational diabetes exhibit a high rate of inattention and fine and gross motor impairment. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 14(Suppl. 1), 681–689. doi: 10.1515/jpem.2001.14.s1.681.
- Panula, P., Pirvola, U., Auvinen, S., Airaksinen, M. (1989). Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience*, 28:585-610. doi: 10.1016/0306-4522(89)90007-9.
- Panula, P. y Nuutinen, S., (2013). The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat Rev Neurosci*, 14:472-487. doi: 10.1038/nrn3526.
- Panula, P., Sundvik, M., Karlstedt, K. (2014). Developmental roles of brain histamine. *Trends Neurosci*, 37:159-168. doi: 10.1016/j.tins.2014.01.001.
- Persico, A., Mengual, E., Moessner, R., Hall, F., Revay, F., Sora, I., Arellano, J., DeFelipe, J., Giménez-Amaya, M., Conciatori, M., Merino, R., Baldi, A., Cabib, S., Pascucci, T., Uhl, R., Murphy, L., Lesh, K., Keller, F. (2001). Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamo cortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J Neurosci*, 21: 6862-6873. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-17-06862.2001.
- 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. Doi: 10.4067/S0034-98872009001200013.
- Pollard, J., Moreau, J., Arrang, JM., Schwartz, JC. (1993). A detailed autoradiographic mapping of histamine H3 receptors in rat brain areas. *Neuroscience*, 52:169-189. doi: 10.1016/0306-4522(93)90191-h.
- Ramos-Jiménez J., Garduño-Torres B., Arias-Montaño J.A. (2009) Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev Biomed.* 20, 100-126.
- Rash, B. G., Micali, N., Huttner, A. J., Morozov, Y. M., Horvath, T. L., Rakic, P. (2018). Metabolic regulation and glucose sensitivity of cortical radial glial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 10142–10147. doi: 10.1073/pnas.1808066115.
- 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. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.049. Epub 2012 Apr 28.
- Ruat M, Traiffort E, Bouthenet ML, Schwartz JC, Hirschfeld J, Buschauer A, et al. (1990). Reversible and irreversible labeling and autoradiographic localization of the cerebral histamine H<sub>2</sub> receptor using [<sup>125</sup>I]iodinated probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87:1658-62.

- 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. doi:10.1016/0165-3806(95)00055-I
- Sadek, B., Saad, A., Sadeq, A., Jalal, F., Stark, H. (2016). Histamine H3 receptor as a potential target for cognitive symptoms in neuropsychiatric diseases. *Behav Brain Res*, 312:415-430. doi: 10.1016/j.bbr.2016.06.051.
- Sakakibara, A. y Hatanaka, Y. (2015). Neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Frontiers in Neuroscience*, 9: 116. doi: 10.3389/fnins.2015.00116. eCollection 2015.
- Sakurai, E., Yamasaki, S., Yukisumi, I., Noboru, H., Niwa, H. (1992). The optical resolution of racemic chlorpheniramine and its stereoselective pharmacokinetics in rat plasma. *Pharmacy and Pharmacology*, 44:44-47. doi:10.1111/j.2042-7158.1992.tb14361.x
- 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. doi: 10.1155/2015/354265.
- Salichon, N., Gaspar, P., Upton, A, L., Picaud, S., Hanoun, N., Hamon, M., De Maeyer, E., Murphy D, L., Mossner R., Lesh K, P., Hen, R. y Self, I. (2001) Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupte the formation of sensory maps in monoamine oxidase and 5-HT transporter knock-out mice. *J Neurosci*, 21: 8884-896. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-03-00884.2001.
- Sanna, M.D., Stark, H., Lucarini, L., Ghelardini, C., Masini, E., Galeotti, N., 2015. Histamine H4 receptor activation alleviates neuropathic pain through differential regulation of ERK, JNK, and P38 MAPK phosphorylation. *Pain*. 156, 2492-2504. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000319.
- Schindelin, J., Carreras, A., Frise, E. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Met*, 9:676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- 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.
- Siegel, G.J. (2006). *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. EU Elsevier; pp. 249-266.
- Simons FE. (2004). Advances in H<sub>1</sub> -antihistamines. *N Engl J Med*; 351:2203-17.
- 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. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Shawky R.M., Seifeldi N.S. (2015) The relation between antihistamine medication during early pregnancy & birth defects. *Egypt J Med Hum Genet* 16, 287-90. doi: 10.1016/j.ejmhg.2015.04.003.

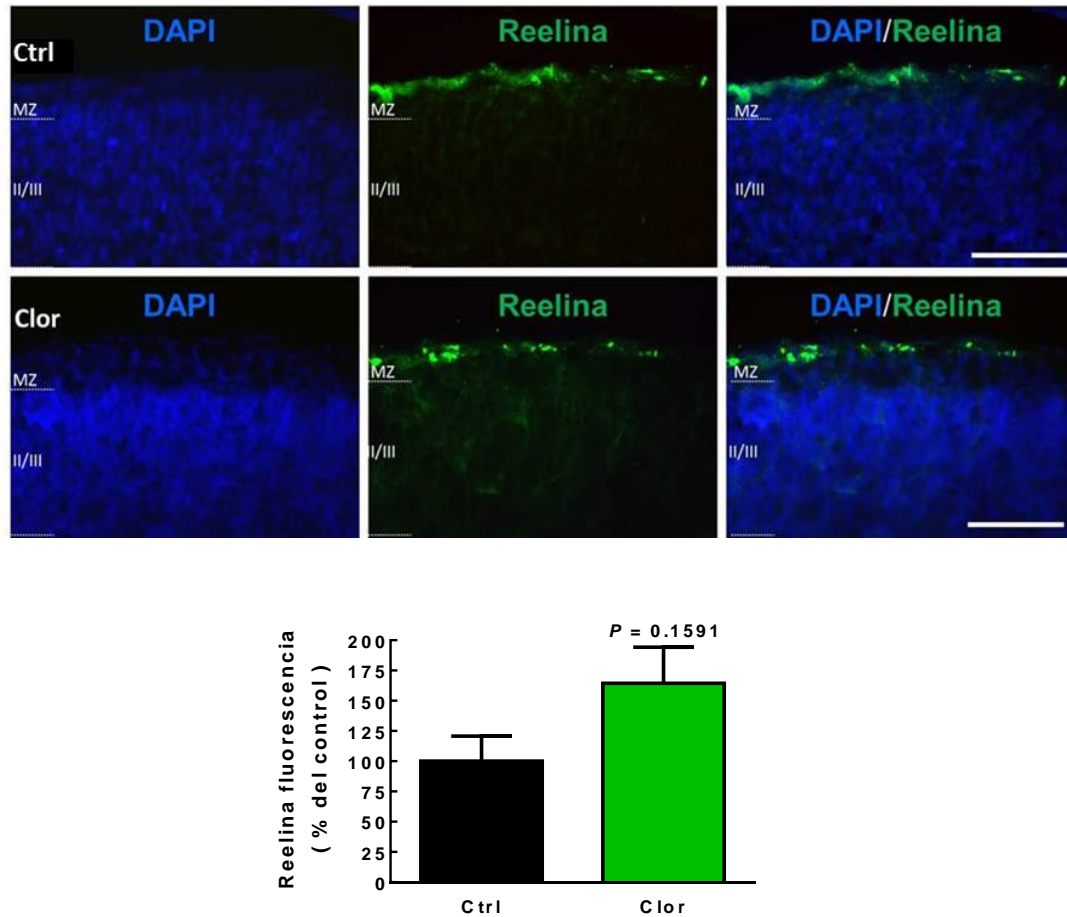
- Sheehan-Rooney, K., Palinkasova, B., Eberhart, J. K., Dixon, M. J. (2010). A cross-species analysis of *Satb2* expression suggests deep conservation across vertebrate lineages. *Dev. Dyn.* 239, 3481–3491. doi: 10.1002/dvdy.22483.
- Sholl, D.A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 87:387-406.1.
- Shu, W., Cho, J., Jiang, Y., Zhang, M., Weisz, D., Elder, G., Schmeidler, J., De Gasperi, R., Sosa, M., Rabidou, D., Santucci, A., Perl, D., Morrisey, E., Buxbaum, J. (2005). Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the *FoxP2* gene. *Proc Natl Acad Sci*, 102:9643–9648. doi: 10.1073/pnas.0503739102
- Smits RA, Lim HD, Stegink B, Bakker RA, de Esch IJ, Leurs R. (2006). Characterization of the histamine H<sub>4</sub> receptor binding site. Part 1. Synthesis and pharmacological evaluation of dibenzodiazepine derivatives. *J Med Chem*; 49:4512-6.
- So M., Bozz P., Inoue M., Einarson A. (2010) Safety of antihistamines during pregnancy and lactation. *Can Fam Physician*. 56, 427-9.
- Solis-González, K.H. (2015). Diferencias ontogénicas del sistema histaminérgico central en embriones de ratas sanas y diabéticas. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Ciudad de México, México.
- Solís, K., Méndez, L., García-López G, Díaz, N.F., Portillo, W., De Nova-Ocampo, M., Molina-Hernández, A. (2017). The histamine H<sub>1</sub> receptor participates in the decreased dorsal telencephalic neurogenesis in embryos from diabetic rats. *Front Neurosci*, 11:676. doi: 10.3389/fnins.2017.00676.
- Soriano, E. y Del Rio, J. (2005). The cells of Cajal-Retzius still a mystery one century after. *Neuron*, 46: 389-394. doi: 10.1016/j.neuron.2005.04.019.
- Spiteri E, Konopka G, Coppola G, Bomar J, Oldham M, Ou J, Vernes SC, Fisher SE, Ren B, Geschwind DH (2007) Identification of the transcriptional targets of *FOXP2*, a gene linked to speech and language, in developing human brain. *Am J Hum Genet* 81:1144–1157. doi: 10.1086/522237.
- Steculorum, S. y Bouret, S. (2011) Maternal diabetes compromises the organization of hypothalamic feeding circuits and impairs leptin sensitivity in offspring. *Endocrinology*, 152:4172-4179. doi: 10.1210/en.2011-1279.
- Strakhova, M.I., Nikkel, A.L., Manelli, A.M., Hsieh, G.C., Esbenshade, T.A., Brioni, J.D., Bitner, R.S., 2009. Localization of histamine H<sub>4</sub> receptors in the central nervous system of human and rat. *Brain Res.* 1250, 41-48. doi: 10.1016/j.brainres.2008.11.018. Epub 2008 Nov 19.
- Sun, T. y Hevner, R. (2014) Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nat. Rev. Neurosci*, 15:217-232. doi: 10.1038/nrn3707.
- Supèr, H., Soriano, E., Uylings, H. (1998). The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res Rev*, 27: 40-64. doi: 10.1016/s0165-0173(98)00005-8.

- Supèr, H., Del Rio, J., Martínez, A., Pérez-Sust, P., Soriano, E. (2000). Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb Cortex*, 10:602-613. doi: 10.1093/cercor/10.6.602.
- Szemes, M., Gyorgy, A., Paweletz, C., Dobi, A., Agoston, D. V. (2006) Isolation and characterization of SATB2, a novel AT-rich D.N.A. binding protein expressed in development- and cell-specific manner in the rat brain. *Neurochem. Res.* 31, 237–246. doi: 10.1007/s11064-005-9012-8.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50(6):537-46.
- Tabarean, I. (2016). Histamine receptor signaling in energy homeostasis. *Neuropharmacology*, 106:13-19. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.04.011.
- Tanda, G., Theresa, AK., Katz, J. (2008). Cocaine-like neurochemical effects of antihistaminic medications. *Journal of neurochemistry*. 147-157. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05361.x
- Tatsumi, M., Froshan, K., Blakely, R., Richelson, E. (1997). Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *European journal of pharmacology*, 340:249-258. doi: 10.1016/s0014-2999(97)01393-9.
- Terashima, T., Takayama, C., Ichicawa, R., Inoue, Y. (1992). Dendritic arborization of large pyramidal neurons in the motor cortex of normal and reeler mutant mouse. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 68: 351-364. doi: 10.2535/ofaj1936.68.6\_351.
- Terzioglu N, van Rijn RM, Bakker RA, De Esch IJ, Leurs R. (2004). Synthesis and structure-activity relationships of indole and benzimidazole piperazines as histamine H<sub>4</sub> receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*;14:5251-6.
- Tissir, F. y Goffinet, AM. (2003). Reelin and brain development. *Nat. Rev. Neurosci*, 4:496-505. doi: 10.1038/nrn1113.
- Torrent A, Moreno-Delgado D, Gomez-Ramirez J, Rodriguez-Agudo D, Rodriguez-Caso C, Sanchez-Jimenez F, Blanco I, Ortiz J. H<sub>3</sub> autoreceptors modulate histamine synthesis through calcium/calmodulin- and cAMP-dependent protein kinase pathways. *Mol Pharmacol* 67: 195–203, 2005. doi: 10.1124/mol.104.005652. Epub 2004 Oct 1.
- Tsui, D., Vessey, J., Tomita, H., Kaplan, D., Miller, F. (2013). FoxP2 regulates neurogenesis during embryonic cortical development. *J Neurosci*, 33:244-258. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1665-12.2013.
- Traiffort, E., Ruat, M., Arrang, JM., Leurs, R., Piomelli, D., Schwartz, JC. (1992). Expression of a cloned rat histamine H<sub>2</sub> receptor mediating inhibition of arachidonate release and activation of cAMP accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:2649-2653. doi: 10.1073/pnas.89.7.2649.

- van Rijn, R.M., van Marle, A., Chazot, P.L., Langemeijer, E., Qin, Y., Shenton, F.C., Lim, H.D., Zuiderveld, O.P., Sansuk, K., Dy, M., Smit, M.J., Tensen, C.P., Bakker, R.A., Leurs, R., 2008. Cloning and characterization of dominant negative splice variants of the human histamine H<sub>4</sub> receptor. *Biochem. J.* 414, 121-131. doi: 10.1042/BJ20071583.
- 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. doi: 10.1002/cne.903470108.
- Vargha-Khadem, F., Watkins, K., Price, C., Ashburner, J., Alcock, K., Connelly, A., Frackowiak, R., Friston, K., Pembrey, M., Mishkin, M., Gadian, D., Passingham, R. (1998). Neural basis of an inherited speech and language disorder. *PNAS*, 95:12695–12700. doi: 10.1073/pnas.95.21.12695.
- Vargha-Khadem, F., Gadian, D. G., Copp, A., Mishkin, M. (2005) FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 131–138. doi: 10.1038/nrn1605.
- Venable JD, Cai H, Chai W, Dvorak CA, Grice CA, Jablonowski JA, et al. (2005). Preparation and biological evaluation of indole, benzimidazole, and thienopyrrole piperazine carboxamides: potent human histamine H<sub>4</sub> antagonists. *J Med Chem*; 48:8289-98.
- Vernes SC, Spiteri E, Nicod J, Groszer M, Taylor JM, Davies KE, Geschwind DH, Fisher SE (2007) High-throughput analysis of promoter occupancy reveals direct neural targets of FOXP2, a gene mutated in speech and language disorders. *Am J Hum Genet* 81:1232–1250. doi: 10.1086/522238.
- Vicario, C. M. (2013) FOXP2 gene and language development: the molecular substrate of the gestural-origin theory of speech? *Front. Behav. Neurosci.* 7:99. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00099.
- Vitalis, T., Dauphinot, L., Gressens, p., Portier MC., Mariani, J. y Gaspar, P. (2017) RoRa coordinates thalamic and cortical maturation to instruct barrel cortex development. *Cereb Cortex*, 2017:1-14. doi: 10.1093/cercor/bhx262.
- 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. doi: 10.1016/0166-2236(91)90034-r.
- Wallace, J. y Lauder, J. (1983). Development of the serotonergic systems in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res Bull*, 10:459-479. doi: 10.1016/0361-9230(83)90144-2.
- Watanabe, M., Takahashi, K., Tomizawa, K., Mizusawa, H., Takahashi, H. (2008). Developmental regulation of Ubc9 in the rat nervous system. *Acta Biochim. Pol.* 55, 681–686. doi:10.1371/journal.pone.0033757.
- Wen, D., Wu, J., Wang, L., Fu, Z. (2017). SUMOylation promotes nuclear import and stabilization of polo-like kinase 1 to support its mitotic function. *Cell Reports* 21, 2147-2159. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.085.

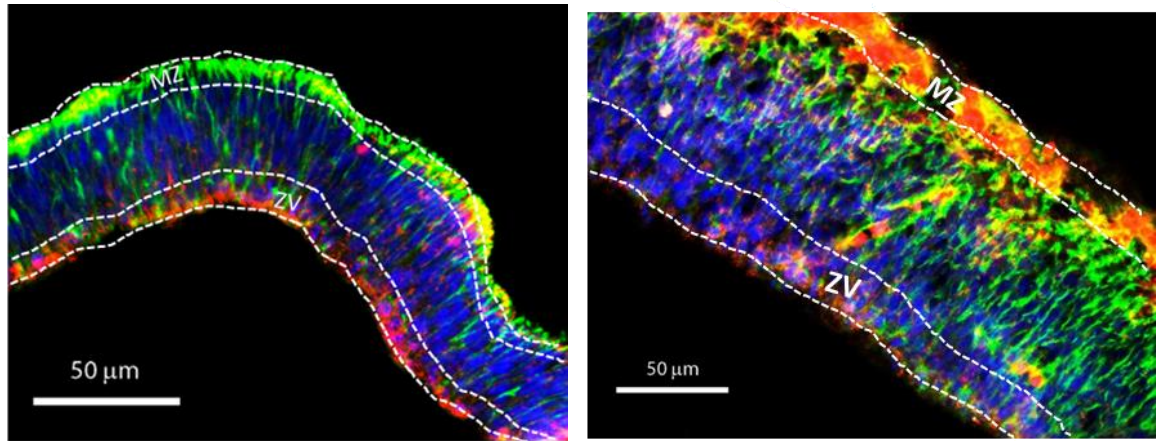
- Wenger Combremont, A. L., Bayer, L., Dupré, A., Mühlethaler, M., Serafin, M. (2016). Slow bursting neurons of mouse cortical layer 6b are depolarized by hypocretin/orexin and major transmitters of arousal. *Front. Neurol.* 7:88. doi: 10.3389/fneur.2016.00088.
- Wu, G. Y., Zhuang, Q. X., Zhang, X. Y., Li, H. Z., Wang, J. J., Zhu, J. N. (2019). Facilitation of spinal alpha-motoneuron excitability by histamine and the underlying ionic mechanisms. *Sheng Acta Physiol. Sin.* 71, 809–823. doi: 10.13294/j.aps.2019.0077.
- Xu, W., Xia, S., Pu, J., Wang, Q., Li, P., Lu, L., Jiang, S. (2018). The antihistamine drugs carbinoxamine maleate and chlorpheniramine maleate exhibit potent antiviral activity against a broad spectrum of influenza viruses. *Frontiers in Microbiology*, 9:2643. doi: 10.3389/fmicb.2018.02643
- Yanai, K., Watanabe, T., Yokoyama, H., Hatazawa, J., Iwata, R., Ishiwata, K., et al., 1992. Mapping of histamine H1 receptors in the human brain using [<sup>11</sup>C] Pyrilamine and positron emission tomography. *J. Neurochem.* 59, 128-136. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb08883.x
- Yasuda, S., Yasuda, R. (1999). Affinities of brompheniramine, chlorpheniramine, and terfenadine at the five human muscarinic cholinergic receptor subtypes. *Pharmacotherapy* 19, 447–451. doi: 10.1592/phco.19.6.447.31041
- Zampeli, E., Tiligada, E., 2009. The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. *Br. J. Pharmacol.* 157, 24–33. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00151.x
- Zhuang, Q.-X., Xu, H.-T., Lu, X.-J., Li, B., Yung, W.-H., Wang, J.-J., Zhu, J.-L. (2018). Histamine excites striatal dopamine D1 and D2 receptor-expressing neurons via postsynaptic H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors. *Mol. Neurobiol.* 55, 8059–8070. doi: 10.1007/s12035-018-0976-1.

## Anexos



**Figura suplementaria 1. Inmunodetección de reelina en la zona marginal (P0).** Arriba. imágenes representativas (20x) de la inmunodetección de reelina (verde) en la corteza motora primaria de los grupos control (Ctrl) y tratado con clorfeniramina (Clor). En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI. MZ, zona marginal; II/III, láminas II y III de la corteza cerebral. La barra blanca corresponde a 100  $\mu$ m. Abajo. análisis cuantitativo de la inmunofluorescencia de reelina en 3 experimentos. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en el grupo control y son promedios  $\pm$  EEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de Student no pareada.





**Figura suplementaria 2. Inmunodetección del RH<sub>1</sub> en el neuroepitelio cortical de embriones de ratas control E12 y E14.** Imágenes representativas (20x) de la inmunodetección del RH<sub>1</sub> (rojo) y de nestina (verde) en el neuroepitelio cortical de embriones E12 (izq.) y E14 (der.) de ratas control. En azul se muestran los núcleos contrateñidos con DAPI. MZ, zona marginal; ZV, zona ventricular.