



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFEECTO TERATOGENICO DE LA HIPERGLUCEMIA
MATERNA SOBRE LA DENSIDAD Y TIPO DE ESPINAS
DENDRÍTICAS DE CA3 DEL HIPOCAMPO DORSAL DE SUS
CRÍAS**

**REPORTE DE
INVESTIGACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A:**

ROSA MARÍA ROMERO VELÁZQUEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. EN C. MARCELA SALAZAR GARCÍA
2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Romero

Velázquez

Rosa María

56 37 33 28

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

084377573

2.-Datos del tutor

Dra en C

Marcela

Salazar

García

3. Datos del sinodal 1

Dra en C

Concepción

Sánchez

Gómez

4. Datos del sinodal 2

M en C

Angélica

González

Maciel

5. Datos del sinodal 3

Dra en C

Marcela

Salazar

García

6. Datos del sinodal 4

M en C

María del Pilar

Torres

García

7. Datos del sinodal 5

M en C

Marco Antonio

Martínez

Ávila

Datos del trabajo escrito

Efecto teratogénico de la hiperglucemia materna sobre la densidad y tipo de espinas dendríticas en CA3 del hipocampo dorsal de sus crías

78 p

2012

DEDICATORIA

A Dios por estar siempre conmigo "*Bendito seas Señor*"

A MIS PADRES

JOSÉ Y JUANA

**A mis Hermanos: Isabel, José, Beatriz, Juan Carlos, Marcos, Hortensia, Elena y
Alberto**

A todos mis sobrinos y en especial a mi sobrina Melissa

Con todo mi amor a Miguel Ángel Franco Flores

**Este trabajo es de todos ya que sin ustedes que son los que más quiero no habría
sido posible.**

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez bajo la dirección de la Dra. Marcela Salazar García y fue apoyado por la Secretaría de Salud con número de Registro HIM/2010/009.



AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Concepción Sánchez Gómez por permitir la realización de este trabajo de Investigación.

De manera muy especial agradezco a la Dra. Marcela Salazar García por todo el apoyo, paciencia, dedicación y sugerencias brindadas a este trabajo.

Así mismo a los miembros del jurado:

Dra. Concepción Sánchez Gómez

M. en C. Angélica González Maciel

Dra. Marcela Salazar García

M. en C. María del Pilar Torres García

M. en C. Marco Antonio Martínez Ávila

Por sus valiosas sugerencias y comentarios al presente trabajo.

En especial a la M en C Angélica González Maciel por permitirme concluir esta fase de mi vida.

Por su colaboración en el desarrollo del trabajo:

A la Química Maricela Sánchez Contreras

Al apoyo de trabajo de Fotografía:

Al Señor Mario Amado Jauregui Castro

A la Mtra. Patricia Santander por su ayuda en el procesamiento estadístico.

Mis más sinceros agradecimientos a mis compañeros del laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto Nacional de Pediatría: Laura, Germán, Andrea, Rafael y Lety por sus palabras alentadoras y ánimos gracias por ser mis amigos.

A la Dra. Rocío Sánchez Urbina por su amistad y ánimos.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 DIABETES MELLITUS	11
Definición y características	11
Epidemiología	11
Alteraciones en el aprendizaje y memoria en pacientes diabéticos	12
1.2 DIABETES DURANTE LA GESTACIÓN	13
Epidemiología	14
Alteraciones en hijos de madres diabéticas	14
Alteraciones en el aprendizaje y memoria en hijos de madres diabéticas	15
1.3 MODELOS EXPERIMENTALES DE DIABETES MELLITUS	16
Estreptozotocina	16
Alteraciones en el aprendizaje y memoria en modelos con diabetes mellitus	17
Trastornos neurológicos en crías de ratas diabéticas desarrolladas en un medio Intrauterino hiperglucémico	18
1.4 HIPOCAMPO	19
Funciones	20
Aferencias, eferencias y circuito trisináptico	21
Actividad eléctrica	22
Relación con el aprendizaje y memoria	23
Elementos neuronales	26
Espinas dendríticas	27
Conducta motora en campo abierto	30

2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	33
3. OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES	34
4. MATERIAL BIOLÓGICOY MÉTODO	35
5. RESULTADOS	42
6. DISCUSIÓN	60
7. CONCLUSIONES	65
8. REFERENCIAS	67
9. ANEXOS	74

ABREVIATURAS:

GC	Crías del Grupo Control
CGC-CA	Crías del Grupo Control con Campo Abierto
CGCI	Crías del Grupo Control Intacto
CGE-CA	Crías del Grupo Experimental con Campo Abierto
CGE	Crías del Grupo Experimental Diabético
CGEI	Crías del Grupo Experimental Intacto
DM	Diabetes mellitus
DMG	Diabetes mellitus Gestacional
DMPG	Diabetes mellitus Pregestacional
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
STZ	Estreptozotocina
FMD	Federación Mexicana de Diabetes
GC	Grupo Control
GE	Grupo Experimental Diabético
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HG	Hiperglucemia
SNC	Sistema Nervioso Central

RESUMEN

El hipocampo es una estructura clave en el aprendizaje y memoria que se caracteriza por presentar cambios plásticos funcionales y estructurales en respuesta a estímulos constantes y demandas ambientales que suelen manifestarse morfológicamente por espinas dendríticas (ED). Las deficiencias en la ejecución de tareas de aprendizaje y memoria observadas en hijos de madres con diabetes materna han proporcionado conclusiones contradictorias respecto al significado de esta condición diabética, sobre las actividades cognitivas de su progeñie. Con base en estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto teratógeno de la hiperglucemia materna sobre la densidad y tipo de espinas dendríticas en CA3 del hipocampo dorsal, en crías de 30 días de edad sometidas a campo abierto y sin intervención conductual. Se utilizaron ratas gestantes de la cepa Sprague-Dawley con diabetes inducida y controles a las que se les monitoreó durante el embarazo el peso corporal, glucemia, glucosuria, cetonuria y hemoglobina glucosilada. A las crías obtenidas por parto espontáneo también se les monitoreó peso, glucemia, glucosuria y cetonuria desde el nacimiento hasta el día 30. Se obtuvieron los cerebros (n=8 c/gpo.) de crías de ratas control intactas (CGCI) y sometidas a campo abierto (CGC-CA), crías de ratas diabéticas intactas (CGEI) y con campo abierto (CGE-CA), se procesaron con el Kit de Golgi Rápido. Se realizó análisis morfológico y morfométrico del cerebro, hipocampo y soma de neuronas piramidales de la región CA3. En el bregma -3.36 mm se seleccionaron seis neuronas y se cuantificó la cantidad y tipo de ED en la parte basal del soma, en el segmento proximal y primera ramificación de la dendrita apical (25 μ m de longitud en cada segmento). Se encontró que las ratas gestantes experimentales presentaron hiperglucemia (<300 mg/dl), glucosuria (1800 mg/dL) e incremento de hemoglobina glucosilada A1c (7%). Las gestantes controles mantuvieron los rangos normales de estos metabolitos. No se encontraron diferencias de glucemia, glucosuria y cetonuria en las crías obtenidas de ratas diabéticas y controles. El peso corporal y tamaño de los hemisferios cerebrales e hipocampo fue significativamente más pequeño en las crías obtenidas de ratas diabéticas. Las altas concentraciones de glucosa en el que se desarrollaron los embriones y fetos provocó una menor densidad de ED totales, el soma fue la zona con menor número, seguido del segmento proximal y por último la primera ramificación dendrítica en donde se cuantificó el mayor número de espinas. En todos los cerebros obtenidos de crías con estudio conductual, se observó un aumento en la densidad de espinas dendríticas, sin embargo, en el grupo experimental este aumento fue significativamente menor con respecto a los controles y se relaciona con alteraciones en el aprendizaje espacial reportados por González, 2011. La correlación entre la morfogénesis de espinas dendríticas y los cambios conductuales en las crías obtenidas de ratas diabéticas permite inferir que esta condición materna altera la plasticidad neuronal de la región CA3 hipocampal.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DIABETES MELLITUS (DM)

DEFINICIÓN: Es un trastorno metabólico de múltiples etiologías, que afecta a diferentes órganos y tejidos, se caracteriza por un aumento en las concentraciones de glucosa en la sangre “hiperglucemia” (HG) (Triana, 2001). La causan varios trastornos, siendo el principal un déficit absoluto o relativo de la hormona insulina, secretada por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas, que repercute en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Esta enfermedad es un problema de salud pública, debido al creciente número de individuos afectados, con consecuencias médico-sociales y económicas. Es la segunda enfermedad endócrina más común en la infancia y adolescencia después de la tiroiditis.

Los síntomas de la HG que se presentan en la DM son: emisión excesiva de orina (poliuria), aumento anormal de la necesidad de comer (polifagia), incremento de la sed (polidipsia), pérdida de peso, fatiga y visión borrosa (Harrison, 2006; Tierney, 2002; WHO, 2003). Las complicaciones de la DM son: daño en ojos, riñones, nervios y vasos sanguíneos pero cuando los daños son mayores ocasiona enfermedades cardiovasculares, nefropatías, retinopatías y neuropatías, entre otras.

EPIDEMIOLOGÍA: De acuerdo con estudios epidemiológicos realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Federación Internacional de Diabetes (IDF), la prevalencia de esta enfermedad en la población de 20 a 79 años de edad en el año 2010 fue de 6.4%, afectando a 285 millones de adultos. Se estima que para el año 2030 esta enfermedad afectará a 439 millones de personas con una prevalencia del 7.7%, lo que nos indica que entre el año 2010 y el 2030, habrá un aumento del 69% de adultos con diabetes en los países en desarrollo y un 20% en los países desarrollados (Gibir, 2000).

México ocupa el décimo lugar a nivel mundial con casi 4 millones de enfermos. Actualmente, se estima que la población afectada fluctúa entre 6.5 y 10 millones (prevalencia nacional de 10.7% en personas de 20 a 69 años), de los cuales, aproximadamente dos millones de personas aún no saben que padecen esta enfermedad. Se estima que en los próximos años México podría ocupar el 7° lugar en esta enfermedad (FMD, 2007).

De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes, clasifican a la diabetes mellitus en 4 grupos:

- a) Tipo 1
- b) Tipo 2
- c) Gestacional
- d) Otros tipos

La diabetes tipo 1 (DMT1), se caracteriza por una destrucción de las células beta de los islotes pancreáticos y son propensos a la cetoacidosis. La DMT1, incluye los casos atribuibles a un proceso autoinmune, así como aquellos para los que no se conoce una etiología o una patogenia (es decir, idiopática). Principalmente se presenta en jóvenes y con menos frecuencia en adultos.

La diabetes tipo 2 (DMT2), incluye la forma común de diabetes en los adultos y es el resultado de defectos en la secreción de insulina. El organismo produce insulina pero no lo suficiente, o no puede utilizarla teniendo como consecuencia una mala distribución de glucosa en el cuerpo (resistencia a la insulina) (ADA, 2004).

ALTERACIONES EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA EN PACIENTES DIABÉTICOS

Existe una información extensa acerca del aumento en el riesgo de deficiencia cognitiva o demencia en personas con pre-diabetes, diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y tipo 2 (DMT2), comparados con la población en general. En años recientes se han encontrado evidencias en humanos que vinculan a la hiperglucemia con alteraciones anatómicas, bioquímicas, electrofisiológicas y conductuales del sistema nervioso central (SNC) en general y en articular al hipocampo con daño cognitivo consecuente. Se ha reportado que la DMT1 afecta al SNC, los niveles altos de glucosa en cerebro afecta la barrera hematoencefálica y que los cambios osmóticos asociados con los altos niveles de glucosa altera la vía de los neurotransmisores (McCall, 1997). Estudios volumétricos de pacientes con DMT1, mostraron una disminución significativa del volumen de materia gris en el tálamo e hipocampo y disminución de la materia blanca en el parahipocampo y en los lóbulos temporales. Esta patología es probable que se relacione con déficit en varios dominios cognitivos, como la memoria (Musen, 2006). Estudios en niños con DM T1 han reportado

dificultades cognitivas y neuroconductuales, han demostrado déficit de atención, problemas de ejecución de tareas, en la inteligencia y la memoria, estos déficits se traducen en coeficientes intelectuales bajos (Northam, 2009).

1.2 DIABETES DURANTE LA GESTACIÓN

Según datos de la FMD, la alta prevalencia de la DM en nuestro país, la obesidad en mujeres en edad reproductiva, la historia familiar y la diabetes previa al embarazo no diagnosticada, son factores que favorecen que la diabetes, que se manifiesta desde el inicio y/o durante el embarazo, se haya incrementado y convertido en un problema de salud prioritario. La diabetes durante la gestación puede suponer un factor de riesgo, a corto y largo plazo, en cuanto al desarrollo de determinadas complicaciones en la madre y en la descendencia (Acosta, 2006).

La diabetes durante la gestación funcionalmente se divide en dos grupos: (ADA, 2004).

Diabetes mellitus pregestacional (DMPG): es aquella que precede al embarazo, incluye todas las gestantes diabéticas conocidas antes de su embarazo, insulino-dependientes o no. Está asociada a un alto riesgo materno-fetal debido a la inestabilidad metabólica propia de la enfermedad, aunado a los cambios metabólicos y hormonales característicos del embarazo, así como el efecto del tratamiento con insulina durante el embarazo y la lactancia. Entre los riesgos destacan el aumento de morbilidad perinatal, muerte fetal in útero, malformaciones fetales, macrosomía, aborto espontáneo, complicaciones metabólicas neonatales y restricción del crecimiento intrauterino (Pridjian, 2010; Peña, 2006).

Diabetes mellitus gestacional (DMG): se manifiesta únicamente durante el embarazo, inicia a partir de la semana 24 o 28 y determina un mayor riesgo obstétrico cuando no se diagnostica o se trata inadecuadamente. Está asociada a macrosomía, sufrimiento fetal y complicaciones del recién nacido. Los hijos de madres diabéticas durante el embarazo están expuestos a un ambiente con trastornos metabólicos dependientes del tipo de diabetes. La embriopatía diabética se produce en aproximadamente del 6 al 10% de los embarazos diabéticos y está directamente relacionado con los niveles de HbA1c durante la organogénesis. El embarazo es un estado diabetogénico que exacerba la diabetes preexistente. El metabolismo cambia dramáticamente durante el embarazo y ambos

metabolismos de la glucosa basal y posprandial cambian gradualmente a lo largo del embarazo para satisfacer las demandas nutricionales de la madre y el feto. La incidencia de complicaciones está relacionada con el tipo de diabetes y la calidad del control de la morbilidad materna (Pridjian, 2010, Peña, 2006 y Torres, 2004).

EPIDEMIOLOGÍA. La prevalencia de la diabetes materna en el embarazo se ha ido incrementando, afectando entre 1–15% de todos los embarazos. El 90% corresponde a diabetes gestacional con daño materno y fetal. Mientras que mujeres con diabetes pregestacional, tienen una prevalencia de un 10%, además el aumento rápido de la glicemia incrementa de tres a cuatro veces el riesgo de tener hijos con malformaciones congénitas (ADA, 2004).

ALTERACIONES EN HIJOS DE MADRES DIABÉTICAS

Pueden existir algunas malformaciones congénitas menores que con frecuencia aparecen en los embarazos de mujeres diabéticas, cuya interrelación con el control metabólico es difícil de probar. Por otro lado, las malformaciones congénitas mayores, definidas como aquellas que resultan ser letales o necesitan corrección quirúrgica, son 5 veces más comunes en niños de madres diabéticas y su correlación directa con la glucemia es claramente demostrable (Acosta, 2006).

Las malformaciones que ocurren con mayor frecuencia en niños de madres diabéticas son:

1. Malformaciones esqueléticas y del sistema nervioso central:

— anencefalia, microcefalia y otros defectos del tubo neural.

2. Malformaciones gastrointestinales:

— atresia duodenal, atresia anorrectal.

3. Malformaciones renales:

— hidronefrosis, agenesia renal.

4. Malformaciones cardíacas:

- coartación de aorta, comunicación interauricular, comunicación interventricular, cardiomegalia.
- trasposición de grandes vasos.

Dado a que el periodo de organogénesis es corto, es fundamental el control glucémico pre-concepcional para prevenir las malformaciones fetales. Se sabe que el riesgo de malformaciones tanto mayores como menores es elevado con cifras altas de hemoglobina glucosilada en los periodos iniciales de la gestación (Acosta, 2006).

ALTERACIONES EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA EN HIJOS DE MADRES DIABÉTICAS

La presencia de la diabetes durante el embarazo aumenta la tasa de trastornos del desarrollo en los hijos. Diferentes metodologías han sido empleadas para responder sí la diabetes durante la gestación afecta el desarrollo neurocognitivo de los hijos en diferentes etapas.

Estudios de comportamiento realizados en lactantes de 6 meses de edad, donde se evaluó la memoria de reconocimiento auditiva y visual y la memoria de reconocimiento trans-modal, mediante potenciales relacionados a eventos (ERP), mostraron que el grupo control tuvo la capacidad de identificar el rostro materno y el de un extraño; mientras que el grupo de lactantes de madres diabéticas no mostraron ninguna diferencia. Esto sugiere alteraciones en el hemisferio derecho, el cual está relacionado con el reconocimiento facial (Nelson, 2000).

Estudios similares en lactantes evaluaron la memoria auditiva a través del reconocimiento de la voz materna versus una voz extraña. El grupo control mostró una atención sostenida hacia los estímulos auditivos familiares y novedosos. En contraste, los hijos de madres con diabetes pregestacional y gestacional mostraron una respuesta deficiente, ya que tuvieron dificultad para diferenciar entre la voz materna y la voz extraña, aún cuando mostraron atención sostenida hacia ambos estímulos (Nelson, 2003).

Al evaluar a niños de 1 año de edad de madres diabéticas, con la prueba de la escala de Bayley reportaron un desempeño menor en el desarrollo cognitivo, es decir, tuvieron dificultad para decodificar estímulos nuevos y mostraron deterioro en la capacidad de reconocimiento trans-modal (Silverman, 1991). Por el contrario, otros investigadores han

reportado que niños en edad escolar de madres con DMPG y DMG, no presentan diferencias en el nivel de aprendizaje e inteligencia comparado con el grupo control en las diferentes edades evaluadas. No obstante estos estudios reflejaron un desempeño menor en tareas relacionadas con la motricidad fina y gruesa, hiperactividad y problemas de atención (Nelson, 2000).

Cabe señalar que en la evaluación de la inteligencia y otras funciones neuropsicológicas en hijos de madres diabéticas se han utilizado herramientas distintas y se han enfocado a aspectos diversos, lo que dificulta llegar a una conclusión sobre los resultados de los mismos. Razón por la cual es necesario recurrir a modelos experimentales.

1.3 MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS

Es evidente que el estudio experimental sistemático de los efectos de la diabetes mellitus tanto prenatal como postnatal o ambas, no es posible efectuarlo en el ser humano, por lo que ha sido necesario recurrir a modelos experimentales de DM en animales. Dentro de estos modelos destaca el uso de la rata de laboratorio que ofrece grandes ventajas prácticas y a la vez permite establecer conclusiones valiosas, ya que las características de la diabetes desarrollada en rata son similares a las del humano.

Existen diversos métodos que permiten inducir la diabetes mellitus tipo 1, la mayoría de los casos debido principalmente a la destrucción de las células beta del páncreas. Uno de estos métodos es la inducción por sustancias químicas, siendo la estreptozotocina la que se utilizará en este trabajo. (Hugues, 2001; Ramos, 1994).

ESTREPTOZOTOCINA (STZ)

Es un antibiótico de amplio espectro citotóxico aislado de la bacteria del suelo *Streptomyces achromogenes*, destruye selectivamente a las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans (Szkudelski, 2001), químicamente es una nitrosourea de glucosamina y tiene actividad diabetogénica. La STZ es captada por las células productoras de insulina de los islotes pancreáticos a través del transportador de glucosa GLUT-2, algunos estudios encontraron que este fármaco penetra a las células beta ya que tiene gran afinidad a la glucosamina del anómero del receptor, el cual es expresado abundantemente en dichas células (Schneidl, 1994). Es el modelo químico más empleado

para la inducción de diabetes, se utiliza en una dosis única de 50-60 mg/Kg de peso por vía intravenosa o intraperitoneal. La STZ en solución a temperatura ambiente tiene una vida media muy corta, de aproximadamente 5 minutos así mismo, una vez inyectada se elimina del torrente sanguíneo en un lapso máximo de 4-6 horas.

La aplicación de la STZ, da lugar a un síndrome diabético verificado por la presencia de polidipsia, poliuria, hiperglucemia y la pérdida de peso en los animales diabéticos en comparación con animales controles (Lin, 2011).

Muchos de los avances científicos actuales sobre la diabetes mellitus y de los posibles mecanismos patogénicos sobre el sistema nervioso central, provienen de estudios en modelos animales “ratas” tratadas con STZ. Este modelo de diabetes inducida con STZ es ampliamente aceptado y utilizado, ya que se han evaluado los efectos de la hiperglucemia en animales y se han comparado los efectos en humanos con diabetes (Wei, 2003).

ALTERACIONES EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA EN MODELOS EXPERIMENTALES CON DIABETES MELLITUS

Varias áreas del cerebro parecen contribuir al déficit cognitivo asociado a la diabetes mellitus (Heijer, 2003). Sin embargo, las tareas dependientes del hipocampo parecen ser particularmente sensibles a la hiperglucemia (Li, 2005). Las pruebas cognitivas aplicadas en ratones y ratas con diabetes inducida con STZ en edad adulta, han revelado resultados similares a los observados en humanos.

Ratones diabéticos muestran déficit significativo en la retención de la memoria y en tareas de evocación activa dependiente del hipocampo (Flood, 1990). También se observó en ratas adultas después de 2, 4, 6 y 8 semanas de inducción de la diabetes, deficiencia en la realización o en el rendimiento en tareas de memorización y aprendizaje espacial. Estas deficiencias se agudizan conforme aumentó la complejidad de las tareas (Popovic, 2001).

Los defectos en la memoria declarativa (recuerdos de experiencias personales, uso y acumulación del conocimiento), dependiente del hipocampo, parecen ser el resultado de los efectos deletéreos de la hiperglucemia. En ratas diabéticas existe deterioro progresivo de la plasticidad sináptica y del aprendizaje (Kamal, 2000). Las alteraciones en la plasticidad sináptica asociadas con deficiencia en el aprendizaje de tareas espaciales se

previenen con la aplicación de insulina, pero no se revierten una vez que el déficit en la ejecución de la tarea o en la potenciación a largo plazo (LTP), se han instalado (Biessels, 1998). Así mismo, las ratas diabéticas muestran deficiencia en la retención y en la recuperación de la información almacenada (Biessels, 1996).

En un experimento emplearon ratas y ratones con diabetes inducida de 4 a 8 semanas de edad y encontraron que las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y en las capas II y III de la corteza parietal, hubo una disminución significativa en el tamaño y en el número de neuronas piramidales, además una reducción en la longitud de las dendritas neuronales, también en el número de intersecciones y en la cantidad de ramas dendríticas, en el número de espinas dendríticas, tanto en la región basal como apical y principalmente las espinas de tipo hongo y las largas se vieron reducidas (Malone, 2006; Malone, 2008; Kamal, 2000; Sima, 2009). Existe evidencia a partir de modelos animales que demuestran que los cambios en la morfología dendrítica, probablemente estén asociados con alteraciones sinápticas y se correlacionan con alteraciones en la memoria y las habilidades de aprendizaje (Beauquis, 2010, Martínez, 2005).

TRASTORNOS NEUROLÓGICOS EN CRÍAS DE RATAS DIABÉTICAS DESARROLLADAS EN UN MEDIO INTRAUTERINO HIPERGLUCÉMICO

Loeken en 2006, empleando ratones con diabetes pregestacional reportó que los embriones de 7.5, 8.5 y 10.5 días presentan defectos del tubo neural (DTN), señalando que éstos fueron 3 veces más frecuentes en los embriones de hembras diabéticas en comparación con animales sin diabetes. Los trastornos neurológicos que se observaron en los ratones son equivalentes a los que aparecen en los seres humanos y tienen una notable similitud con los DTN que se producen en la cepa *Spotch*, originados por una mutación del gen que codifica el factor de transcripción, *Pax 3*. Este gen se expresa en las primeras etapas del desarrollo embrionario en el tubo neural, en la cresta neural y en el mesodermo. En el modelo señalado se comprobó, mediante hibridación *in situ* y PCR la expresión de *Pax 3* está bloqueada en embriones de ratones hembra diabéticas. La expresión de este gen durante la embriogénesis y la sensibilidad a la hiperglucemia materna coinciden con el momento en el cual el tubo neural comienza a formarse y es susceptible a malformaciones. La estructura y el patrón de expresión del gen *Pax 3* humano son muy parecidos a los de ratón, de manera tal que es razonable pensar que si

su expresión se compromete durante la embriogénesis humana, podrían aparecer los mismos defectos que se observan durante la maduración murina (Loeken, 2006).

En experimentos preliminares realizados en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental de Hospital Infantil de México, utilizando ratas gestantes con diabetes inducida, se encontró desregulación de la cronología del desarrollo, disminución del peso corporal y disminución en el tamaño del cerebro y cerebelo en crías de 21 días de gestación descendientes de madres diabéticas (Salazar, 2010). Así mismo, en estudios a nivel conductual reportaron alteraciones en la capacidad de atención, seguridad y locomoción al someter a prueba de exploración en campo abierto a crías de 30 días descendientes de madres diabéticas (González, 2011). Aunque no se investigó si los hijos de madres diabéticas presentan alteraciones morfológicas en sus componentes neuronales y plasticidad neural del hipocampo, estructura fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria.

1.4 HIPOCAMPO

Una de las regiones que ha sido estudiada con mayor interés, debido a su relación con el aprendizaje y memoria es el hipocampo. Los daños que provoca la diabetes en esta estructura cerebral se pueden detectar a nivel morfológico, electrofisiológico y conductual. Se sabe en general, que la hiperglucemia induce cambios en la citoarquitectura del hipocampo, altera las características eléctricas del ritmo theta y de la potenciación a corto plazo y afecta la integración de los procesos del aprendizaje y la memoria (Beauquis, 2010, Malone, 2008 y Martínez, 2005).

El hipocampo se localiza en la parte dorso-medial de los lóbulos temporales del cerebro de la rata, por debajo del ventrículo lateral y ocupa parte de la pared ventro-posterior y ventro-lateral de la corteza cerebral. Es una estructura pareada y se localiza en ambos hemisferios cerebrales. Debe su nombre a su forma similar de un caballito de mar (*Hippocampus*), la cual adquiere al seguir un trayecto arqueado desde la base de los lóbulos temporales hasta el piso del diencefalo. Forma parte del sistema límbico y su estudio se considera de importancia por ser un sitio de la memoria (Lothman, 1991). La ontogenia del hipocampo es particular, debido a que sus poblaciones celulares presentan heterocronía, es decir, las células son generadas en distintos momentos del desarrollo,

por lo que resulta ser un modelo ideal para demostrar los efectos de la diabetes sobre estas poblaciones celulares (Salas, 1991).

El desarrollo del hipocampo es a partir de los primordios telencefálicos identificables en el embrión de rata el día 16 de la gestación. (E16). En etapa adulta mide aproximadamente 1.2 cm³ (Bayer, 1980b). Éste se encuentra dividido en tres regiones: el giro dentado (GD), el Campo de Ammon y el complejo Subicular (Lothman, 1991). El giro dentado (GD) consta de tres capas: una capa granular, molecular y polimorfa, las cuales están dispuestas en forma de U y de V. La región de Campo de Ammon está formada por una sola capa de neuronas piramidales, las cuales presentan variaciones morfológicas dividiendo al Campo de Ammon en 4 regiones que se conocen como: CA1, CA2, CA3 y CA4 que las cuatro regiones reciben el nombre de formación hipocámpica. En los roedores, la región CA2 es pequeña e indistinta que generalmente es ignorada. La CA4 también es llamada de células polimórficas. El complejo subicular es una cuña de la corteza, la cual se curva anterior y lateralmente, enrollándose alrededor de la extensión posterior del Giro dentado. En el complejo subicular es posible distinguir por la citoarquitectura tres áreas distintas: el Subiculum, Parasubiculum y Presubiculum (Carpenter, 1994).

FUNCIONES

Durante la primera mitad del siglo pasado se pensó que la formación hipocámpica estaba relacionada primariamente con el olfato, razón por la que se le llamó Rinencéfalo o cerebro olfatorio. Hoy se acepta ampliamente que la función del hipocampo está relacionada con la memoria (Winters, 2004). Además se ha demostrado la relación entre neurodegeneración de poblaciones hipocámpicas y enfermedad de Alzheimer, así como algunos tipos de amnesia (Takeda, 2007). Por otra parte, se ha demostrado el papel del hipocampo en la memoria en base a la potenciación a largo plazo (LTP) y la plasticidad sináptica en la mayoría de los componentes del circuito hipocámpico (Adams, 2004).

Son clásicos los experimentos en los que la eliminación del hipocampo de ambos lados para inhibir crisis epilépticas, provoca la pérdida de la memoria a corto plazo. Estas observaciones y otros estudios en animales confirman el papel de esta estructura del SNC en la memoria (Wu, 2000). Hoy sabemos que el hipocampo, especialmente las áreas CA1 y CA3, participan en la denominada “memoria espacial”. O Keefe (1971) y Muller (1996),

demonstraron la existencia de células piramidales hipocámpicas denominadas “Place cells”, las cuales se cree que dan información del lugar específico donde se encuentra el animal. Experimentos posteriores han demostrado que estas células se activan cuando la cabeza del animal está orientada en determinada posición.

El sistema hipocámpal también participa en la generación del ritmo theta que es de 4-12 ciclos por segundo (Hz) y puede ser de dos tipos: ritmo theta I, frecuencia de 7–12 Hz, que se presenta cuando el animal se mueve y que es resistente a la atropina y ritmo theta II, se presenta cuando el animal está inmóvil, con una frecuencia de 4–6 Hz y que es sensible a la atropina. Este ritmo II se presenta también en el animal anestesiado (Xu, 2004).

AFERENCIAS, EFERENCIAS Y CIRCUITO TRISINÁPTICO

Las principales aferencias hacia el hipocampo y el GD surgen desde la corteza entorrinal, la región septal y el hipocampo contralateral. También hay otras aferencias importantes de otras regiones como son el hipotálamo, el tálamo y la amígdala. Sin embargo, la corteza entorrinal proporciona el mayor componente de las aferencias sensoriales hacia el hipocampo a través de las fibras del patrón perforante, llegando así al GD y al Subiculum (Bravo, 1991).

Para el correcto funcionamiento del hipocampo, resulta de gran importancia la actividad de un circuito intrínseco denominado “circuito trisináptico”. La vía trisináptica se origina en la corteza entorrinal, donde a través de la vía perforante, las aferencias entorrinales activan a las células granulares del Giro dentado (primera sinapsis). A su vez, las fibras musgosas de las células granulares del GD son una eferencia importante hacia la región CA3 del hipocampo en donde forman sinapsis excitatorias con las dendritas proximales de las células piramidales (segunda sinapsis). Los axones de éstas contribuyen a las proyecciones de asociación en el mismo campo CA3 pero además de éste salen fibras que son la mayor eferencia hacia las neuronas piramidales de CA1 (tercera sinapsis). El grupo de axones de las neuronas de CA3 reciben el nombre de colaterales de Schaffer. Finalmente las neuronas de la región CA1 proyectan sus axones al Fornix y de nuevo sobre la corteza entorrinal, cerrándose así el circuito (Fig. 1) (Delgado, 1999).

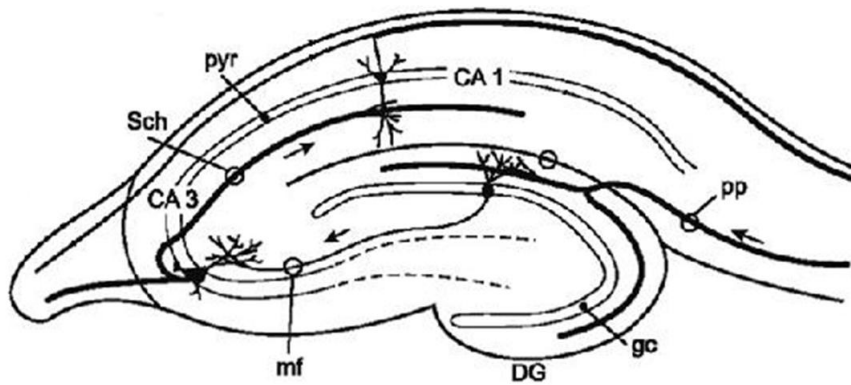


Figura 1. Circuito trisináptico. La entrada al hipocampo es la vía perforante (PP) que llega a la capa granular (gc) del giro dentado (DG), hace sinápsis con las células granulares, éstas envían las fibras musgosas (mf) a la capa piramidal (pyr) de la región CA3, las cuales a su vez se conectan con las neuronas piramidales de la región CA1 a través de las colaterales de Schaffer (Sch) (Modificado de Hassel y Dingleline, 2006).

En el hipocampo se han identificado gran número de neurotransmisores y neuromoduladores. El glutamato es el neurotransmisor excitador más importante de la región, mientras que el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio, y los neuromoduladores como la noradrenalina y la acetilcolina se distribuyen de manera amplia en el hipocampo (Shephred, 1990).

ACTIVIDAD ELÉCTRICA

El hipocampo procesa y almacena por un periodo de semanas o meses la información recién adquirida y después la transfiere a áreas de la corteza cerebral para un almacenamiento más prolongado (Shatz, 1992).

En el análisis electroencefalográfico cuantitativo han reportado que se producen dos clases de ritmo theta que se definen con base en la frecuencia dominante. Se ha observado que durante el comportamiento exploratorio (locomoción), se produce espontáneamente un ritmo theta que tiene un rango de frecuencia de 6-8 Hz, conocido como componente tónico; en contraste, un segundo ritmo o componente fásico, con frecuencia en el rango de 8-12 Hz puede ser producido por estimulación eléctrica del hipotálamo dorsomedial (Suzuki, 1991).

De esta manera, el ritmo theta podría ser considerado como una señal de atención del animal a estímulos biológicamente relevantes dentro del medio ambiente y durante el

sueño (MOR) ingresando información al flujo de ésta a través de los sistemas neuronales hipocampales que juegan un papel en la consolidación de la memoria (Morgane, 1993).

En el hipocampo ocurre también un fenómeno relacionado con el aprendizaje y la memoria conocido como potenciación a largo plazo (LTP) por su nombre en inglés (long-term potentiation). La LTP consiste en un aumento persistente en la magnitud de la respuesta postsináptica provocada por una estimulación de frecuencia alta (400 Hz), en la vía aferente el aumento o potenciación es inducido por un estímulo breve (8 a 10 segundos) y se mantiene por un tiempo prolongado (hasta meses). La LTP se produce en el hipocampo en las tres sinapsis del circuito del hipocampo (Bravo, 1991; Shephred, 1990).

RELACIÓN CON EL APRENDIZAJE Y MEMORIA

Muchos organismos tienen la capacidad de modificar su conducta en respuesta a eventos que ocurren durante su vida. Esta capacidad biológica adaptativa se traduce en la habilidad para aprender y recordar (Ardilla, 1982). Por lo tanto, el aprendizaje es el proceso por medio del cual un organismo adquiere nueva información del ambiente o de situaciones a las cuales se ven sometidos en su interacción con este, es el medio más importante en que los sucesos ambientales modulan la conducta (Kaldel 1992). La información adquirida durante el aprendizaje se registra y se conserva por medio del proceso de memorización, que puede definirse como el proceso por el cual se retienen los conocimientos y se pueden recordar tiempo después (Kaldel, 1992).

De esta manera, el aprendizaje y la memoria se relacionan estrechamente dado que el aprendizaje puede considerarse tan sólo en términos de cambios conductuales originados por algún tipo de estimulación; la información contenida en tal estimulación produce cambios físicos en sistema nervioso y dichos efectos se almacenan por algún tiempo en éste, antes de que pueda derivarse de ellos un cambio conductual; por lo tanto, cualquier medición del aprendizaje depende de la memoria (Thompson, 1984).

Por lo tanto, la memoria es la capacidad del organismo para almacenar, retener y recuperar posteriormente la información. Desde una perspectiva de procesamiento de información hay 3 etapas en la formación y la recuperación de la memoria:

- a) Codificación y registro (procesamiento y combinación de información recibida).

- b) Almacenamiento (creación de un registro permanente de la información codificada).
- c) Recuperación (llamando a volver la información almacenada en respuesta a alguna referencia para su uso en una actividad o proceso).

Con el término de memoria se hace referencia a un conjunto de sistemas (cerebrales/conductuales/cognitivos), disociables, pero interrelacionados funcionalmente.

Una clasificación básica y generalmente aceptada de memoria se basa en la duración de retención memoria e identifica tres tipos: la sensorial, la de corto plazo y la de largo plazo. La memoria sensorial corresponde aproximadamente a los primeros 200-500 milisegundos después de que un elemento es percibido. La capacidad de mirar un elemento y recordar lo que parecía con sólo un segundo de observación o memorización, esto es un ejemplo de este tipo. Parte de la memoria sensorial es transferida a la memoria a corto plazo. Esta memoria nos permite recordar algo desde varios segundos hasta un minuto sin ensayo, su capacidad es muy limitada. La memoria a corto plazo se cree que depende en su mayoría de un código acústico para almacenar información y en menor medida un código visual. El hipocampo es esencial para la consolidación de la información de la memoria a corto plazo y a largo plazo, aunque no parece almacenar la información en sí.

Ya Hebb (1949) mencionó la aplicación de mecanismos cerebrales distintos para cada tipo de memoria; así indicaba que la base fisiológica de la memoria a corto plazo estaría en los circuitos reverberantes neuronales, mientras que en la memorización a largo plazo aparecería un cambio estructural permanente en el sistema nervioso haciendo referencia aunque sin saberlo, a los cambios plásticos cerebrales.

Squire 2004, identifica dos sistemas de memoria disociables, dentro de la memoria asociativa a largo plazo:

1.- La memoria explícita o declarativa es aquella que está disponible para la evocación consciente de hechos, acontecimientos o estímulos específicos. Esta memoria puede disociarse en memoria episódica y memoria semántica. En palabras del propio Tulvin 1972 la memoria recibe y almacena la información sobre episodios y acontecimientos fijados temporalmente, al igual que las relaciones espacio-temporales entre tales acontecimientos.

En el humano el sistema hipocámpico se asocia a la llamada memoria episódica y a la memoria espacial. Los investigadores no están de acuerdo acerca de cuánto tiempo se almacenan recuerdos episódicos en el hipocampo ya que estos recuerdos episódicos se almacenan por un corto tiempo después se consolidan las memorias a la neocorteza. Para la formación de nuevos recuerdos episódicos se necesita del lóbulo temporal medial, que es una estructura que incluye al hipocampo. Sin el lóbulo temporal medial uno no es capaz de recordar nuevos recuerdos pero no se puede recordar los acontecimientos durante el cual pasaron. Se ha demostrado que el hipocampo tiene un papel importante para establecer el aprendizaje asociativo y para la consolidación de la memoria. La memoria sólo necesita una exposición a un episodio para recordarlo, con fuertes componentes de lugar y tiempo que pueden ser experimentados nuevamente al recordar no sólo la experiencia en sí, sino el contexto espacial y temporal.

Existe una amplia evidencia que juega el hipocampo en la memoria declarativa en humanos y la espacial en roedores. En 1978, O'Keefe y Nadel propusieron que el hipocampo podría ser la estructura cerebral a través de la cual se forma el mapa cognitivo que permite al animal navegar en el espacio. Los animales realizarían una representación de las relaciones espaciales mediante las estimaciones de la distancia y las relaciones entre estímulos. Investigaciones posteriores indicaron que esta estructura podría ser importante en la formación del "engrama", observando que la potenciación a largo plazo (PLP) ocurre más rápidamente en el hipocampo. Aunque la PLP del hipocampo se ha asociado a diversos tipos de aprendizaje, se ha relacionado más claramente con el aprendizaje espacial.

El hipocampo contendría un mapa cognitivo formado por células de lugar con el que el animal podría moverse en su entorno. Estas células han sido descritas en ratas y ratones y parecen codificar una representación polimodal del lugar, lo que apoyaría la hipótesis de que el hipocampo está implicado en la formación del mapa cognitivo.

La teoría del mapa cognitivo (O'Keefe y Nadel, 1978) postula que el hipocampo es una estructura clave en la navegación cartográfica. Esta idea concuerda con la evidencia neuroanatómica y neurofisiológica que muestra cómo el hipocampo integra múltiples áreas corticales relevantes para la percepción y la memoria, e interviene en la codificación de las asociaciones entre las características espaciales y temporales de los estímulos ambientales (Kessels, 2001). Existen otras regiones cerebrales como el tálamo y la

corteza prefrontal participan en el aprendizaje espacial. El tálamo como principal estación de relevo y la corteza prefrontal en la planificación y adaptación a las condiciones en situaciones complejas.

ELEMENTOS NEURONALES

Los tipos celulares en la formación hipocámpica son básicamente tres:

Las células piramidales se generan en la rata prenatalmente entre los días 12 al 18 embrionarios (Altman y Bayer, 1990). Los somas tienen forma de pirámides con base de 20 a 40 μm y de 40 a 60 μm de altura; presentan su dendrita apical con numerosas ramificaciones y espinas dendríticas (Shepehred, 1990) (Fig. 2).

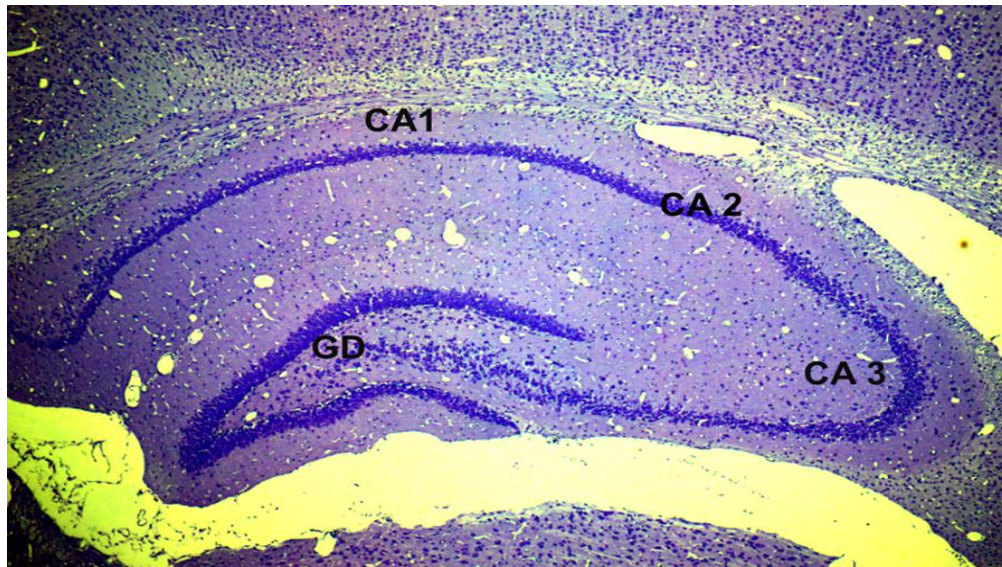


Figura 2. Tinción de Violeta de Cresilo, de un corte histológico de cerebro de rata, en donde se observa el hipocampo y sus regiones principales: CA1, CA2, CA3, CA4 y giro dentado (GD).

Células granulares: son la principal población del Giro Dentado (GD), el soma mide entre 10–15 μm , de cada célula granular surge una o varias dendritas y sus axones forman haces denominadas fibras musgosas. En la rata estas células se originan en la etapa postnatal entre el día P0 al P18.

Las interneuronas: se encuentran distribuidas por toda la formación hipocámpica y se han descrito diferentes tipos y tamaños de neuronas; entre ellas están las células en cesta que miden de 15 a 30 μm , las células GABAérgicas que se generan en la etapa embrionaria

entre los días E15 al E19 y su mayor concentración es en el GD. La región del hilum está formada principalmente por interneuronas inmunopositivas a glutamato descarboxilasa (GAD) (Shepherd, 1990).

Como ya se mencionó, las células piramidales del hipocampo se originan prenatalmente y cerca del 85% de las células granulares en el periodo postnatal (en rata), han reportado que este tipo celular se sigue produciendo durante toda su vida.

Dentro de la formación hipocámpica la región **CA3** es una de las zonas más importantes del hipocampo, primero por sus características morfológicas que son células piramidales grandes con un árbol dendrítico que se dirige hacia el centro del Giro Dentado, éste árbol dendrítico tiene numerosas espinas dendríticas que varían de forma y tamaño lo cual le da la característica al hipocampo de ser una **estructura plástica**. Segundo; se ha sugerido que CA3, es el principal integrador del hipocampo por el patrón de aferencias y eferencias y porque es el intermediario entre la entrada del Giro Dentado (GD) y la salida desde el hipocampo como un todo recibiendo las proyecciones del GD y enviando información intrahipocámpicamente a otras áreas del cerebro. Por lo tanto, las células piramidales CA3 parecen mejor diseñadas para difundir y regular información a través del hipocampo y células granulares. Y tercero; las células piramidales del CA3 junto con las células granulares del GD son neuronas clave en el circuito trisináptico hipocámpal, un circuito que se piensa o se considera que juega un papel crítico en las funciones de memoria (Scharfman, 2007; Eichenbaum, 2001).

ESPINAS DENDRÍTICAS

Son los principales receptores de entrada de excitación en el sistema nervioso central, proporcionan compartimentos bioquímicos que controlan a nivel local los mecanismos de señalización en las sinapsis individuales. En el hipocampo muestran la plasticidad estructural de base para los cambios fisiológicos en la eficacia sináptica que subyacen en el aprendizaje y la memoria. Las espinas dendríticas se observaron por primera vez por el neurólogo español Ramón y Cajal hace más de 100 años con el protocolo de Camilo Golgi “reazione nera” y desde entonces, muchos científicos y neurólogos han tratado de entender su función cerebral.

Las espinas dendríticas son protuberancias citoplásmicas que emergen de las dendritas de las células neuronales, siendo las principales especializaciones morfológicas de las sinapsis. Estudios realizados en roedores han mostrado que las dendritas originan postnatalmente su morfogénesis y la formación de sinapsis ocurre entre el día P15 y P25 postnatal (Rihn, 1990 y Pokorny, 1981) además el neurotransmisor glutamato es esencial para este proceso.

En general las espinas miden entre 0.1 y 2 μm de longitud (Harris, 1989) y, aunque con ligeras variaciones angulares, se disponen perpendicularmente y forman un ángulo de 90 grados con respecto al eje longitudinal de la dendrita progenitora correspondiente. Morfológicamente las espinas se dividen en dos segmentos principales: el cuello y la cabeza (Harris, 1989), ultraestructuralmente se observa en la porción más distal de la cabeza de todas las espinas una electrodensidad típica que corresponde a lo que se conoce como densidad postsináptica (DPS), esta constituye el componente postsináptico de las sinapsis y se encuentra en aposición con la presinápsis.

La cantidad de espinas dendríticas en las neuronas es variable de acuerdo a la densidad de inervación excitadora aferente a ellas (Bannister, 1995). Por otra parte, en aquellas neuronas que poseen espinas se observa que éstas se congregan preferentemente en regiones dendríticas distantes al soma. Siendo excitadores los contactos sinápticos que se establecen con espinas, lo anterior podría estar relacionado con el hecho de que las sinapsis inhibitorias ocurren predominantemente en las inmediaciones dendríticas cercanas al soma.

Las neuronas espinosas presentan diferencias en la densidad (número de espinas por unidad de longitud dendrítica), en la distribución (presencia típica en regiones específicas del árbol dendrítico), así como en la densidad proporcional en que se presentan las diferentes formas de espinas (Bannister, 1995). Diversos estudios electrofisiológicos y morfológicos sugirieron que la forma de las espinas podría influir en la traducción de los mensajeros excitadores. De tales estudios y para facilitar la interpretación de su actividad funcional se determinó que las espinas serían clasificadas en función de las características de su cuello y de su cabeza, de acuerdo con esto se les clasificó en: delgadas, cortas, en hongo y ramificadas (Peng Shi, 2009; Sorra, 2000).

Las espinas delgadas presentan un cuello largo, estrecho y cabeza pequeña, las espinas cortas no muestran distinción entre cuello y cabeza, las espinas en hongo tienen el cuello

corto y el diámetro del cuello es muy pequeño en relación al tamaño de la cabeza que es grande. Existen otras formas geométricas de espinas que de manera excepcional han sido observadas en estructuras cerebrales específicas (Fig. 3).

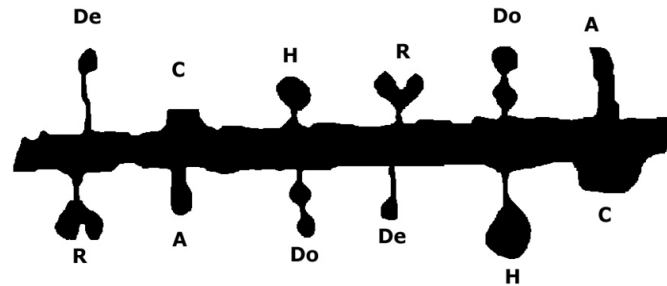


Figura 3. Diagrama de un segmento dendrítico en el que se muestran los diversos tipos de espinas dendríticas más comúnmente observadas en el sistema nervioso central. De, delgada; C, corta; H, hongo; R, ramificada; Do, doble; A, ancha.

La densidad proporcional de cada tipo de espina varía de acuerdo a la estirpe neuronal en cuestión. Sin embargo, existe una tendencia general que indica que las espinas más abundantes en una neurona son las delgadas, tanto en neuronas piramidales del hipocampo (Harris, 1992), en la corteza cerebral y cerebelo. Le siguen aquellas en forma de hongo, cuya densidad proporcional oscila entre 25 y 35%, en tanto que las cortas están presentes entre 20 y 30%. La proporción de estos tres tipos de espinas dista del resto. Aunado al hecho de que las espinas delgadas, cortas y en hongo son las más abundantes, la relativamente grande variación de sus proporciones parece crítica para la integración de la información sináptica que intermedian. (Pérez-Vega, 2000). Aunque pueden presentar modificaciones estructurales con un dinamismo del orden de minutos (Muller, 2000). Dichos cambios dependen de eventos sinápticos, que constituyen el sustrato morfo-funcional que sustenta la capacidad de plasticidad sináptica subyacente a fenómenos tan complejos como el aprendizaje y la memoria (Pérez-Vega, 2000; Lee, 2005 y Muller, 2000).

Numerosos estudios han sugerido que las espinas delgadas o largas están relacionadas con la adquisición de información (aprendizaje), en tanto que aquellas en forma de hongo están involucradas en el almacenamiento de la misma (memoria), como se ha sugerido a partir de estudios relacionados con el desempeño cognoscitivo diferencial en diferentes fases del ciclo estral de ratas (González-Burgos, 2005). La cabeza de las espinas

constituye el sitio de contacto de sinapsis excitadoras mediadas por glutamato, mientras que el cuello estrecho como las delgadas y en hongo les confiere una característica de ser las más eficientes en la transmisión de los impulsos sinápticos.

En particular, se ha sugerido que un suficiente número de espinas con cuello estrecho quizás sean requeridas para el mantenimiento de la Potenciación a Largo Plazo (PLP), el cual, ha sido considerado como un mecanismo celular de por lo menos algunas formas de aprendizaje y memoria. Por otro lado, se ha señalado que la PLP generada en el hipocampo a partir de un proceso de aprendizaje, da lugar a cambios morfológicos en las espinas dendríticas, que podrían constituir la base estructural de la memoria (Bourne, 2008; Sala 2002; Harris, 1992).

Para realizar los estudios de plasticidad cerebral en tareas espaciales dependientes del hipocampo, se han utilizado diversas pruebas conductuales en animales, entre la que destaca la conducta motora en campo abierto.

CONDUCTA MOTORA EN CAMPO ABIERTO: Es una evaluación comprensiva mediante la cual múltiples conductas del repertorio natural de las ratas son observadas simultáneamente en una caja o arena novedosa para el animal. Esta conducta exploratoria corresponde a una tendencia natural que presenta la mayoría de los individuos cuando se enfrentan a un ambiente extraño, y cuyo objetivo es adquirir información útil desde el medio ambiente. Esta técnica permite estudiar la orientación espacial ya que proporciona al animal caminar libremente en cualquier dirección durante la exploración o búsqueda. Cuando un animal es colocado por primera vez en un campo abierto, la conducta más evidente es una caminata rápida de reconocimiento de todo el espacio geométrico en el cual está confinado. La caminata o locomoción espontánea forma parte de la exploración espacial, que consiste en el desplazamiento horizontal del animal de una localidad a otra. La exploración está motivada por el miedo, la información obtenida durante la exploración sirve para reducir el mismo. La exploración es sólo una respuesta a la estimulación de imprevistos y la función es para recopilar información del medio ambiente (Whishaw, 2006).

Otra manera de explorar el ambiente es mediante la exploración vertical, en el cual el animal se yergue y se sostiene durante varios segundos en posición vertical apoyándose en el trípede formado por las dos patas posteriores y la cola. Este es un proceso más

complejo, susceptible de ser modificado independientemente de la caminata. Se ha demostrado que la exploración vertical está asociada con la aparición de las ondas teta en el hipocampo.

Durante la caminata y la exploración el hipocampo juega un papel significativo en la orientación de los animales ya que provee una indicación continua de su ubicación espacio-temporal.

Esta prueba evalúa atención y seguridad ante la exposición de un ambiente nuevo, parámetros importantes para la habituación a corto plazo.

Para medir adecuadamente el rendimiento del animal en relación con el problema de que tiene que resolver, es registrar el caminar y posteriormente calcular todos los parámetros con los que puede ser el motor y los comportamientos de orientación caracterizados.

Parámetros a evaluar:

- 1. Caminata o locomoción espontánea:** forma parte de la exploración espacial, consistente en el desplazamiento horizontal del animal de una localidad a otra. Además de la distancia total recorrida se evalúa el número de movimientos horizontales, distancia promedio por movimiento y tiempo por movimiento horizontal. Durante la caminata y la exploración el hipocampo juega un papel significativo en la orientación de los animales ya que provee una indicación continua de su ubicación espacio-temporal (Góngora, 2008). Al respecto se sabe que la locomoción espontánea está asociada con la aparición de ondas teta con frecuencias de 6 a 10 Hz en el hipocampo, que se correlacionan positivamente con la velocidad de la caminata. Así mismo se ha demostrado que el ritmo teta parece funcionar como un reloj que sirve de referencia para ubicar en el tiempo el disparo de las neuronas del subículo que se activan en relación a la posición del animal en el espacio (Schwartz, 1996). De hecho, las lesiones del hipocampo producen defectos en el aprendizaje espacial. Cabe mencionar que el ritmo teta del hipocampo puede depender no sólo de la velocidad de la locomoción, sino también del estado motivacional de la rata, asociado con la marcha.
- 2. Exploración vertical (*rearings* en inglés):** en la cual el animal se yergue y se sostiene durante varios segundos en posición vertical apoyándose en el trípode

formado por las dos patas posteriores y la cola (Góngora, 2008). Si la conducta se evalúa en un espacio con paredes, es común que el animal realice la mayor parte de los episodios de exploración vertical apoyando las patas anteriores en las paredes, lo cual le ayuda a mantener la posición vertical durante más tiempo. El análisis fino de esta conducta incluye el número de episodios de exploración vertical, duración de cada episodio, tiempo total invertido en esta conducta e histograma de distribución de frecuencias de acuerdo a la duración de cada episodio exploratorio. Aunque comparte algunos sustratos funcionales con la locomoción, la exploración vertical es un proceso cognoscitivo más complejo, susceptible de ser modificado independientemente de la caminata. Se demostró que este tipo de exploración también está asociada con la aparición de ondas teta en el hipocampo; además, se ha descrito que su frecuencia es un reflejo del nivel general de vigilia (Whishaw, 2006).

- 3. Tigmotaxis** (del Griego *thigma* = contacto y *taxis* = respuesta innata de un organismo de moverse hacia a un estímulo), en la cual las ratas pasan un mayor tiempo en aquellos espacios que están rodeados por el mayor número posible de paredes. Los bigotes o vibrisas juegan un papel determinante en esta conducta. La función sensorial de las vibrisas en el rastreo tigmotáctico se pone de manifiesto en ratas a las cuales se les han cortado los bigotes de un solo lado, ya que en estas condiciones prefieren caminar pegadas a las paredes con el cuerpo orientado hacia el lado donde tienen intactos sus bigotes. La tigmotaxis se ha usado como un índice de ansiedad en roedores, ya que se incrementa cuando los animales son tratados con fármacos que inducen ansiedad, mientras que disminuye cuando reciben fármacos ansiolíticos.

La importancia de analizar la conducta exploratoria en ambientes nuevos sirve para optimizar la seguridad, abre nuevas vías para explicar diferencias en la actividad locomotora de los animales objeto a la lesión cerebral o un ensayo farmacológico.

2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Dado que en nuestro país y a nivel mundial, el índice de diabetes durante la gestación ha ido en aumento, es importante conocer más sobre los factores etiológicos maternos que afectan la embriogénesis del sistema nervioso y su efecto cognitivo en la vida posnatal.

Debido a la imposibilidad práctica y ética de investigar este proceso en mujeres diabéticas gestantes es necesario recurrir a modelos animales para producir esta enfermedad y evaluar si la hiperglucemia durante la gestación altera en su progenie, la morfogénesis de espinas dendríticas en neuronas de la región CA3 del hipocampo, estructura cerebral que además de haber sido ampliamente reportada en la literatura como vulnerable a hiperglucemia, es altamente plástica y está relacionada con procesos de aprendizaje espacial.

En un trabajo conductual previo realizado en el laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental, se encontró que las crías de 30 días obtenidas de ratas diabéticas mostraron baja capacidad de atención, disminución en la locomoción y poca seguridad al explorar un ambiente nuevo en campo abierto (González, 2011). Esto nos llevó a plantear la necesidad de estudiar si estas alteraciones en el aprendizaje espacial se correlacionaban con alteraciones en la plasticidad neuronal hipocampal del área CA3.

La información obtenida en este trabajo, además de demostrar si esta patología materna durante el embarazo induce alteraciones en la densidad de espinas dendríticas y déficit en el aprendizaje y memoria en los hijos, servirá para investigar los mecanismos morfológicos, bioquímicos y moleculares que determinan las alteraciones del hipocampo.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La hiperglucemia materna modifica en su progenie la densidad y tipo de espinas dendríticas en las neuronas piramidales del hipocampo dorsal?

¿La tarea conductual en campo abierto altera la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo en crías de ratas diabéticas?

3. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto teratogénico de la hiperglucemia materna sobre la densidad y tipo de espinas dendríticas en CA3 del hipocampo dorsal, en crías de 30 días de edad sometidas a campo abierto y sin intervención conductual.

Objetivos Particulares

Cuantificar y comparar los valores de peso corporal, glucemia, glucosuria, cetonuria y hemoglobina glucosilada de las ratas gestantes del grupo experimental y control; así como de sus crías desde el nacimiento y hasta los 30 días de edad.

Obtener y analizar morfométricamente el cerebro, hipocampo y soma de neuronas piramidales de CA3 de crías intactas y sometidas a la prueba conductual de exploración en campo abierto.

Cuantificar en crías intactas y sometidas a la prueba conductual de exploración en campo abierto, la densidad y los diferentes tipos de espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA3 del hipocampo dorsal

4. MATERIAL BIOLÓGICO Y MÉTODO

ANIMALES

Se utilizaron 12 ratas hembras de la Cepa Sprague Dawley de 250 a 300 g de peso corporal en etapa reproductiva, obtenidas del bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Estas fueron colocadas en cajas de policarbonato y se mantuvieron bajo condiciones de luz oscuridad (12:12 hrs), temperatura (22-24°C), humedad (40-50%) y con libre acceso al alimento y agua.

REPRODUCCIÓN

Se les tomaron frotis vaginales a todas las hembras para identificar la etapa del ciclo estral y se tiñeron con azul de toluidina al 0.5% (anexo 1.1) se observaron bajo el microscopio. Posteriormente, dos hembras que presentaron frotis en etapa de estro se colocaron con un macho sano y de fertilidad comprobada toda la noche. Al siguiente día, por la mañana (8:00 a.m.) se confirmó el apareamiento por la presencia del tapón vaginal mucoso y para confirmar en el frotis vaginal espermatozoides. Ese día se consideró como día cero de la gestación.

INDUCCIÓN DE LA DIABETES

Las ratas preñadas se colocaron en cajas individuales, en condiciones de luz-oscuridad de 12:12 horas, humedad 40-50% y temperatura 22-24°C. Se les proporcionó alimento en pellet para rata al libre acceso y agua. A cada caja se le identificó con un tarjetón (anexo 2.1).

Grupo experimental (GE): al quinto día de la gestación, antes de que el blastocisto se implantara, las ratas se les indujo la diabetes mediante la inyección de estreptozotocina 50 mg/Kg de peso intraperitoneal (anexo 1.4 y 1.5), para crear una condición similar a la diabetes tipo I (glucemia \geq 200 mg/dl) (n=6)

Grupo control (GC): no se le realizó ningún tipo de manipulación. (n=6)

Dos días después de la inducción de la diabetes se tomaron muestras de sangre a cada hembra cuantificándola con un glucómetro CONTOUR de BAYER y tiras reactivas para determinación de glucosa.

Se llevó un monitoreo durante toda la gestación del estado metabólico de las ratas diabéticas y controles el cual consistió: registro del peso corporal, 2 veces/semana,

glucemia con tiras reactivas para glucosa en sangre marca CONTOUR de BAYER, Glucosuria y Cetonuria con tiras reactivas para determinar glucosa y cetonas en orina Ames Keto-Diastix 1 vez/semana. Todas las lecturas se registraron en una bitácora (anexo 2.2).

OBTENCIÓN DE CRÍAS DE RATAS DIABÉTICAS Y CONTROLES

Al término de la gestación por parto espontáneo las ratas tuvieron a sus crías. En ambos grupos (control y experimental) las camadas fueron ajustadas a 8 animales. En una bitácora se registró el número total de crías, número de crías vivas, muertas, peso corporal y tiempo de gestación (anexo 2.3). Las crías se pesaron cada tercer día y se les tomaron los mismos parámetros que a las ratas durante la gestación. A las crías de madres diabéticas se les asignó una nodriza, con el fin de descartar que el factor lactancia sea una variable que influya en los resultados obtenidos ya que nuestro objetivo fue evaluar el efecto teratogénico de la hiperglucemia durante el embarazo.

Al día 21 del destete se colocaron 4 crías por caja y se mantuvieron en las mismas condiciones de bioterio se les proporcionó alimento y agua a libre acceso. No se consideró el sexo de las crías ya que a esta edad el factor hormonal todavía no está presente.

El día 30 de vida extrauterina tanto las crías de los grupos diabéticos como controles se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (n=8 para c/gpo):

CRIAS DE RATAS CONTROL INTACTO (CGCI)

CRIAS DE RATAS DIABÉTICAS INTACTO (CGEI)

CRIAS DE RATAS CONTROL SOMETIDAS A CAMPO ABIERTO (CGC-CA).

CRIAS DE RATAS DIABÉTICAS SOMETIDAS A CAMPO ABIERTO (CGE-CA)

A las crías de los grupos intacto no se les realizó ninguna intervención conductual, permanecieron en el bioterio hasta el día en que comenzó la prueba conductual.

A los otros dos grupos de crías intervenidas conductualmente se les realizó la prueba de exploración en campo abierto. El análisis de los resultados de esta prueba conductual fueron reportados previamente en la tesis "Efecto teratogénico de la hiperglucemia en ratas gestantes sobre el aprendizaje y memoria a corto y largo plazo" (González, 2011).

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LOS CEREBROS

Una vez concluida la prueba conductual las crías de todos los grupos fueron pesadas y medidas. Inmediatamente se decapitaron, la cabeza se colocó sobre una gasa y con unas tijeras de disección se retiró la piel y músculo. Con unas alicatas se cortó el cráneo, se removió el cerebro, se enjuago con buffer de fosfatos (anexo 1.3) y se fotografió rápidamente. Con el programa de Axio Vision A C versión 4.4 fueron medidos los ejes mayor y menor de los hemisferios cerebrales (Fig. 4).

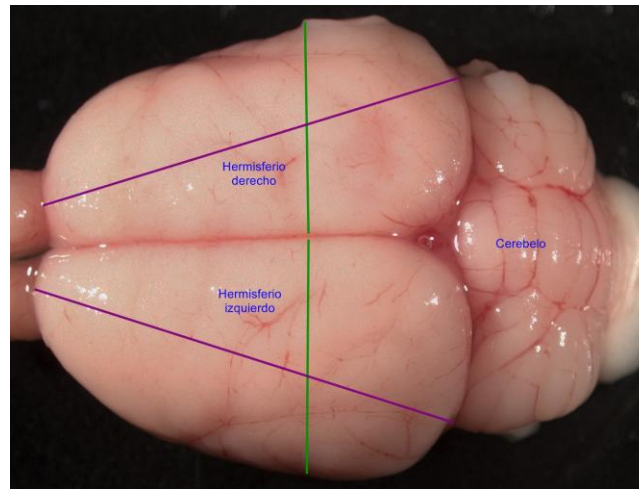


Figura 4. Medición de los ejes de los hemisferios cerebrales: La línea verde para ejes menores y la línea morada para los ejes mayores.

Para el análisis histológico y cuantificación de espinas dendríticas, se utilizó la técnica de Impregnación con el kit de Golgi rápido (FD Rapid GolgiStain™ Kit., elaborado por FD NeuroTechnologies).

De cada uno de los grupos se seleccionaron aleatoriamente 3 cerebros y se colocaron en una solución de impregnación preparada 24 horas antes del sacrificio y se almacenó en condiciones de oscuridad (anexo 1.6). Seis horas después se cambió la solución de impregnación por una nueva donde se colocaron los cerebros por dos semanas a temperatura ambiente bien sellados evitando la luz. Posteriormente el tejido se pasó a una solución C (anexo 1.7), se almacenó a 4°C durante una semana. Se reemplazó la solución después de las primeras 24 horas de inmersión. Pasado este tiempo se realizaron cortes por congelación en un criostato (SLEE Technikmainz), ajustando la temperatura a -22°C cuatro horas antes de cortar. Se hicieron cortes frontales seriados de 100 µm de grosor se colocaron en portaobjetos previamente cubiertos con un adhesivo de

Poly L lisina al 5% (anexo 1.2) colocando 6 cortes en cada laminilla, a cada corte se le puso una gota de solución "C" se retiró el exceso con papel filtro dejándolos secar a temperatura ambiente cubriéndolos del polvo y luz.

Proceso de revelado: Una vez secos los cortes estos se enjuagaron con agua bidestilada y se revelaron con un solución previamente preparada (D + E + Agua bidestilada) (anexo 1.8) dejando 10 min, en seguida se enjuago con agua bidestilada y se continuó con la deshidratación con una serie de alcoholes graduales 50%, 75%, 95%, alcohol absoluto y aclarados con xilol se montaron con una resina sintética Entellan cubriéndolas con un cubreobjetos.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL HIPOCAMPO DORSAL

Las laminillas obtenidas se observaron al microscopio estereoscópico Lumar V12 marca Zeiss, para identificar la región de estudio con el Atlas de Paxinos y Watson 2009. Se seleccionaron seis cortes continuos de cada cerebro donde se identificó el hipocampo dorsal (Bregma -3.36 mm) y se fotografiaron. En cada corte se midió el perímetro y los ejes mayor y menor con el programa de Axio Vision A C versión 4.4 (Fig. 5).

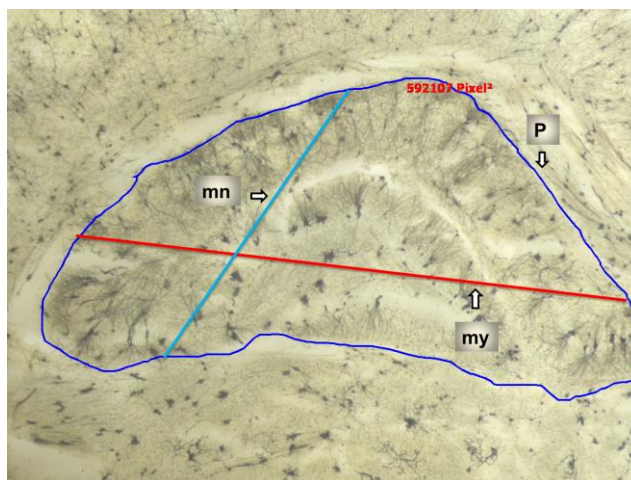


Figura 5. Morfometría del hipocampo dorsal. Corte frontal donde se muestra las mediciones realizadas: perímetro (P), eje mayor (my) y eje menor (mn).

DENSIDAD TOTAL Y TIPO DE ESPINAS DENDRÍTICAS

Con la ayuda de un microscopio Óptico Olympus BH2-RFCA y utilizando el objetivo SPlan 40X PL 0.70 se seleccionaron seis neuronas de la región CA3 del hipocampo dorsal, se capturaron y enseguida se midieron los ejes mayor y menor. La imagen capturada permitió tener un plano óptico de toda la neurona y sirvió de referencia espacial para colocar una barra de 25 μm de longitud en las siguientes áreas de la neurona piramidal (Fig. 6).

1. De la parte basal del soma hacia la parte inicial del segmento proximal.
2. El segmento proximal de la dendrita apical
3. La primera ramificación de la dendrita apical.

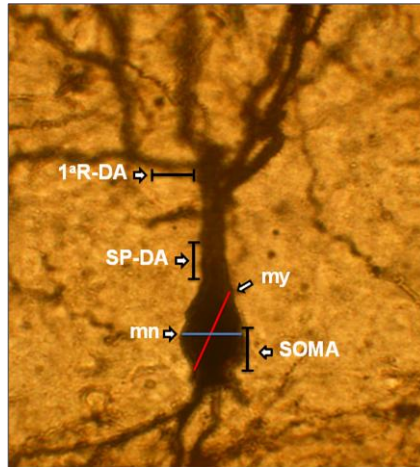


Figura 6. Neurona piramidal en donde se señalan las tres regiones de estudio con una barra de 25 μm de longitud, ahí se llevó a cabo la identificación y cuantificación de espinas dendríticas, además se marca el eje mayor (my) y menor (mn) del soma. SP-DA= segmento proximal de la dendrita apical, 1° R-DA= primera ramificación de la dendrita apical.

Para reportar la densidad de espinas dendríticas de cada segmento se cuantificó el número total de estas/25 μm . Se empleó el objetivo de inmersión 100X, con enfoque a diferentes planos ópticos y de acuerdo a los criterios de clasificación determinados por Sorra y Harris 2000, las espinas fueron clasificadas morfológicamente como largas, hongo y cortas. Todas las que no entraron en la clasificación anterior se clasificaron como “otras” (Fig. 7).

La densidad total se definió como el número total de todos los tipos de espinas dendríticas de los tres segmentos estudiados.

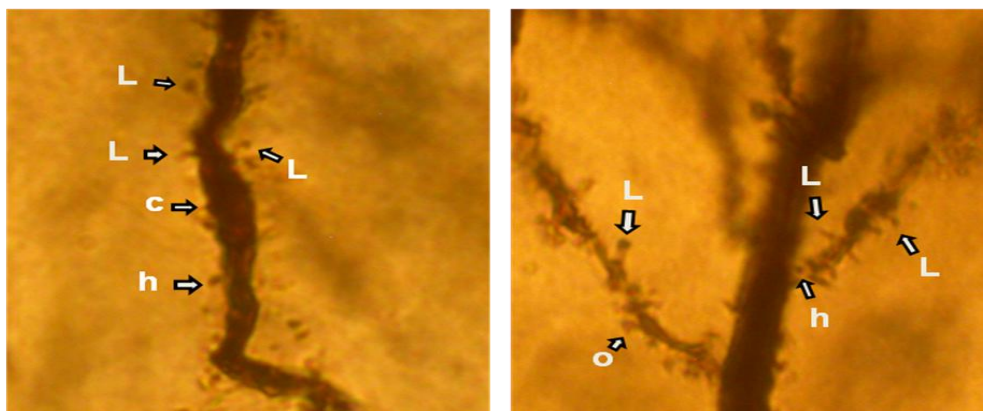


Figura 7. Tipos de espinas dendríticas consideradas para la cuantificación en cada uno de los segmentos. Espina larga (L), hongo (h), corta (c) y otras (o).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de t-Student's para evaluar los datos de: peso corporal, glucemia, cetonuria, glucosuria, peso cerebral, eje mayor, eje menor.

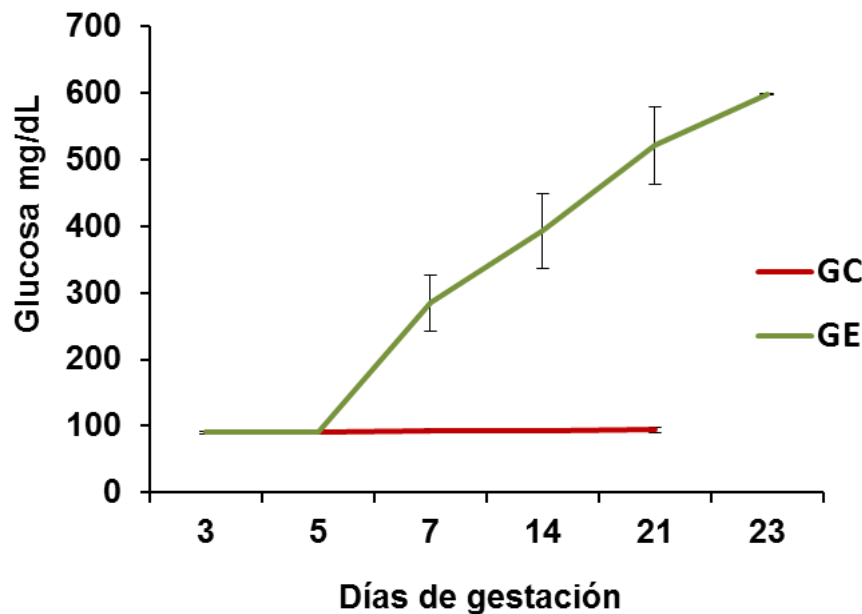
Para el análisis de la densidad de espinas dendríticas y tipos de estas, se utilizó ANOVA de una vía, empleando el programa SPSS versión 16.0, el cual consistió en la comparación de la densidad de espinas dendríticas y tipos en las tres regiones establecidas de las neuronas piramidales y en los cuatro grupos de estudio de crías de 30 días de edad.

5. RESULTADOS

RATAS GESTANTES:

SEGUIMIENTO DE LOS PARÁMETROS METABÓLICOS Y PESO

Glucemia: A los dos grupos de estudio de ratas gestantes se les midieron los niveles de glucosa en el día 3 de la gestación, antes de la inducción de la diabetes y no hubo diferencias en los niveles sanguíneos de glucosa, registrándose valores entre 86 a 94 mg/dl; pero una vez administrada la STZ en dosis única al grupo experimental (ratas diabéticas), los niveles de glucemia se incrementaron hasta alcanzar valores promedio de 590 mg/dl al final de la gestación. Dos días después de la inducción se confirmó la condición diabética de las ratas experimentales las altas concentraciones de hiperglucemia se mantuvieron durante toda la fase experimental, hasta el sacrificio de las mismas. En comparación con los animales control las concentraciones de glucemia se mantuvieron dentro de los valores normales. Al realizar la prueba estadística se encontró diferencias significativas con una $p < 0.05$ (Gráfica 1).

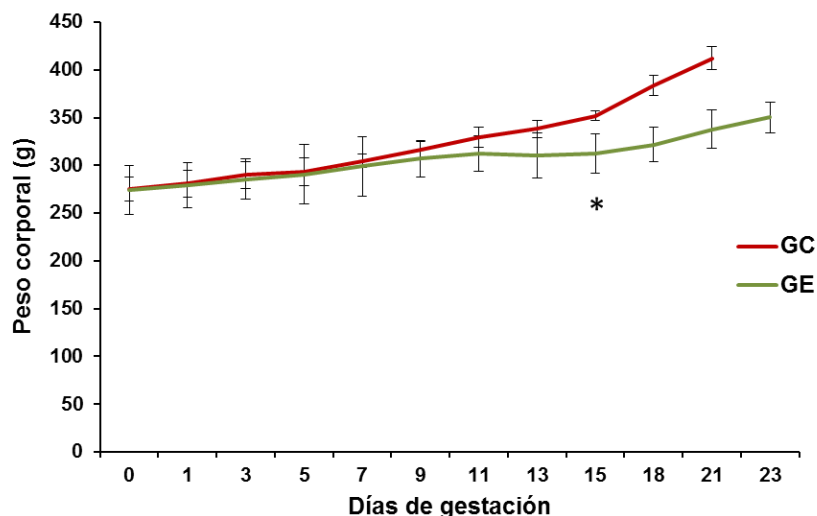


Gráfica 1. Niveles de glucemia en ratas gestantes con diabetes inducida con STZ y controles (n=6). Las concentraciones de glucosa en el grupo experimental se fueron incrementando posteriores a la inducción y se mantuvieron durante el periodo gestacional. La línea roja indica el promedio (\pm) desviación estándar del grupo control (GC), y la línea verde corresponde al grupo experimental diabético (GE). * $p < 0.05$

Glucosuria y cetonuria: En concordancia con las concentraciones de glucemia, altas concentraciones de glucosa en orina estuvieron presentes en las ratas diabéticas, registrándose concentraciones de 1800 mg/dl al final de la gestación. Por lo contrario, el grupo control no presentó glucosuria. Al mismo tiempo, se hizo determinación de cetonuria en ambos grupos y la prueba salió negativa para los dos grupos.

Hemoglobina glucosilada A1c; Al término de la gestación se cuantificó la concentración de hemoglobina glucosilada fracción A1c (HbA1c) a los dos grupos de estudio, observando que los valores para el grupo diabético fue del 7% de HbA1c, en comparación con el grupo control los valores fueron del 3.9%.

Peso Corporal: Los promedios y (\pm) desviación estándar obtenidos durante los días en que se monitoreo el peso en las ratas gestantes controles/diabéticas fueron los siguientes: Día 0= $275.43 \pm 12.75/274.33 \pm 25.32$, D1 = $280.96 \pm 14/279.2 \pm 23.37$, D3 = $289.78 \pm 14.5/285.6 \pm 21.3$, D5 = $293.5 \pm 14.5/290.6 \pm 31.08$, D7 = $304.7 \pm 7/298.8 \pm 31.5$, D9 = $316.7 \pm 8.5/307 \pm 19.4$, D11 = $329.4 \pm 10.5/312 \pm 18.7$, D13 = $338 \pm 9/310 \pm 23.5$, D15 = $352 \pm 4.95/312 \pm 20.6$, D18 = $383.5 \pm 10.23/321.7 \pm 18$, D 21 = $412.2 \pm 12/337.6 \pm 20$, D23 = 350.3 ± 16 . Estos resultados denotan que el grupo diabético tuvo menor ganancia de peso en el transcurso de la gestación y este comportamiento fue estadísticamente significativo a partir del día 15 y continuó hasta el día del nacimiento de las crías con una $p < 0.05$ (Gráfica 2).



Gráfica 2. Promedio del peso corporal de los dos grupos de ratas durante la gestación, el grupo diabético (GE) tuvo menor ganancia de peso corporal. * $p < 0.05$

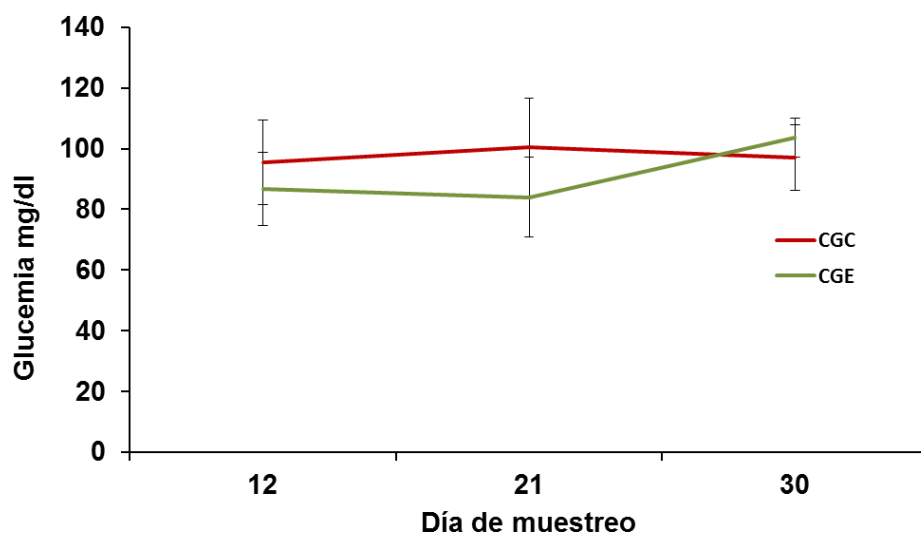
Tiempo de gestación: se llevó un registro de inicio y término del periodo de gestación de las ratas, de las cuales se observó que las hembras del grupo control su periodo de gestación fue de 21 días, mientras que las del grupo experimental presentaron un retraso de 2 días y sus crías nacieron a los 23 días.

Características de las camadas obtenidas: El número de crías por camada tanto del grupo control como experimental fue de 10 a 14 crías. Todas nacieron vivas y no se observaron malformaciones externas evidentes.

CRÍAS DE RATAS OBTENIDAS DE RATAS CONTROL Y DIABÉTICAS

SEGUIMIENTO DE LOS PARÁMETROS METABÓLICOS Y PESO

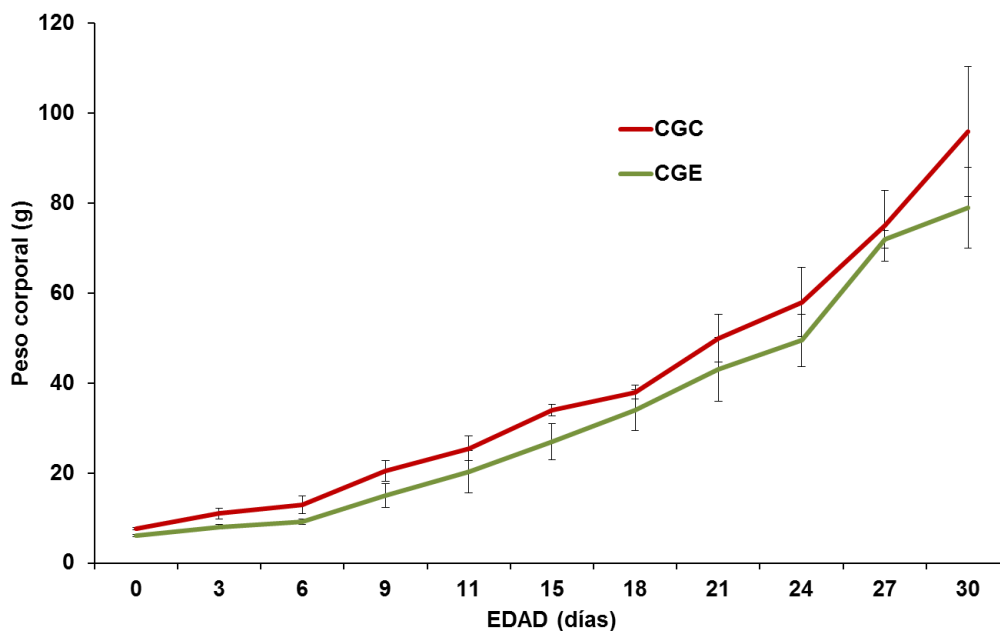
Glucemia: Los promedios (\pm) desviación estándar de los niveles de glucosa en sangre de crías monitoreadas en los días 12, 21 y 30 días de edad para el grupo control fueron: D12= 95.54 ± 14 , D21= 100.45 ± 16.09 , D30= 97.04 ± 10.8 , y los del grupo GE fueron: D12= 86.62 ± 12 , D21= 84.95 ± 13.20 y D30= 103.75 ± 64 . Las concentraciones de glucemia registrados en los diferentes tiempos de edad de los dos grupos de estudio, no presentaron diferencias significativas (Gráfica 3).



Gráfica 3. Niveles de glucemia en crías de ratas diabéticas (línea verde) (CGE) y controles (línea roja) (CGC). No se encontraron diferencias significativas de glucemia en sangre en las crías en los distintos tiempos de muestreo para los dos grupos de estudio (n=16 para c/gpo).

Glucosuria y cetonuria: Al mismo tiempo se tomaron muestras de orina para determinar estos dos parámetros en las crías y los resultados fueron negativos para los dos grupos.

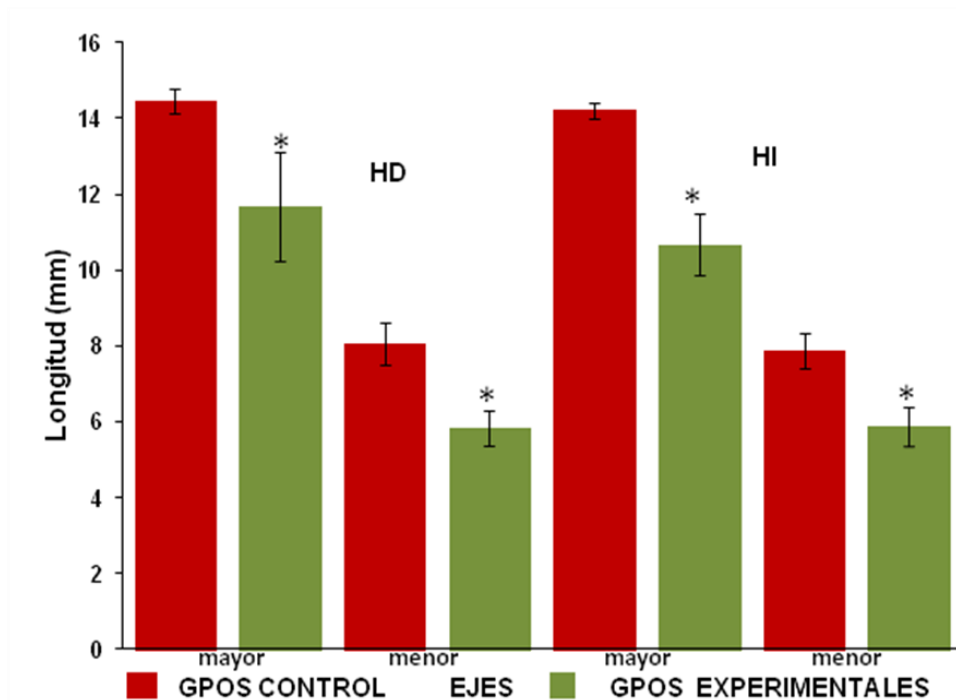
Peso corporal: De acuerdo a los datos registrados, se observó que el incremento del peso corporal de las crías del grupo experimental fue menor comparado con el grupo control, encontrándose diferencias significativas (Gráfica 4). Los promedios,(±) desviación estándar obtenidos a partir del nacimiento y hasta los 30 días de edad de crías de madres control/diabéticas fueron los siguientes: D0 = 7.65 ± 0.19 /6.075 ± 0.233, D3 = 11 ± 1.17/8.025 ± 0.48, D6 = 11 ± 1.17/9.23 ± 0.60, D9 = 20.5 ± 2.3 /15 ± 2.64, D11 = 25.5 ± 2.72 /20.3 ± 4.65, D15 = 34 ± 1.22 / 27 ± 4.07, D18 = 38 ± 1.54 /34 ± 4.58, D21 = 50 ± 5.38 /43 ± 7.10, D24= 58 ± 7.7 /49.5 ± 5.79, D27=75 ± 7.83/72.4 ± 2.02, D30=96 ± 14.50/79 ± 8.96.



Gráfica 4. Promedio (±) desviación estándar del peso corporal de las crías desde el nacimiento hasta los 30 días de edad. Crías del grupo control (CGC, línea en color rojo) y crías del grupo experimental diabético (CGE, línea en color verde). (n=16 para c/gpo, p≥0.05).

Morfometría de los hemisferios cerebrales:

En cuanto a la longitud de los ejes mayor y menor de los hemisferios derecho e izquierdo de crías de 30 días de edad de los grupos diabéticos fueron significativamente más pequeños que los de las crías de ratas del grupo control $*p < 0.05$ (Gráfica 5).



Gráfica 5. Promedio y desviación estándar de las longitudes de los ejes de los hemisferios cerebrales de crías de 30 días de edad de los grupos: Control y Experimental HD: hemisferio derecho, HI: hemisferio izquierdo. (n= 16 c/gpo).

Morfología y morfometría del hipocampo dorsal:

Respecto a la morfología del hipocampo de crías de ratas control (Fig. 8A), se muestra una estructura delimitada por sus diferentes áreas CA1, CA3 y GD, además se observan numerosas neuronas y ramificaciones dendríticas distribuidas en el área hipocampal, al comparar los hipocamos con los del grupo experimental (Fig. 8B) se observaron menos células piramidales y ramificaciones en el área hipocampal.

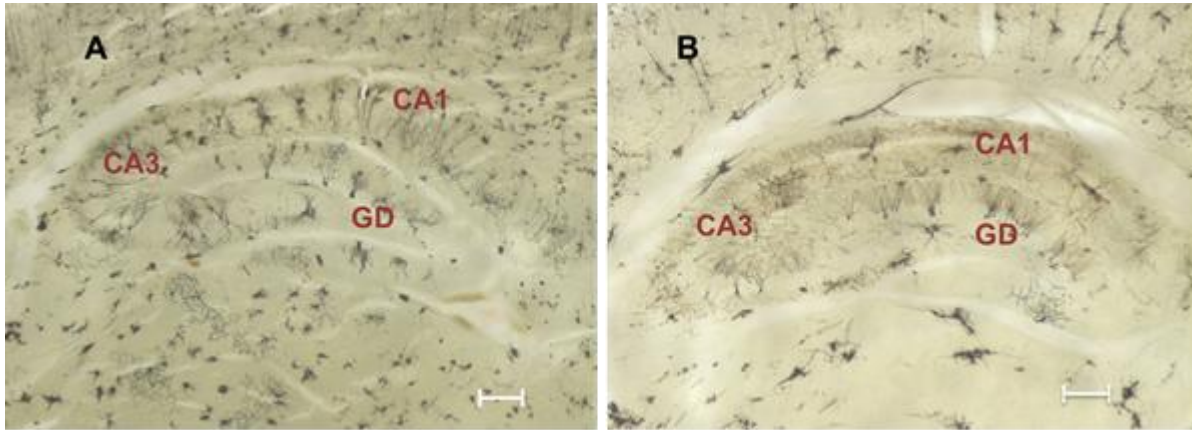
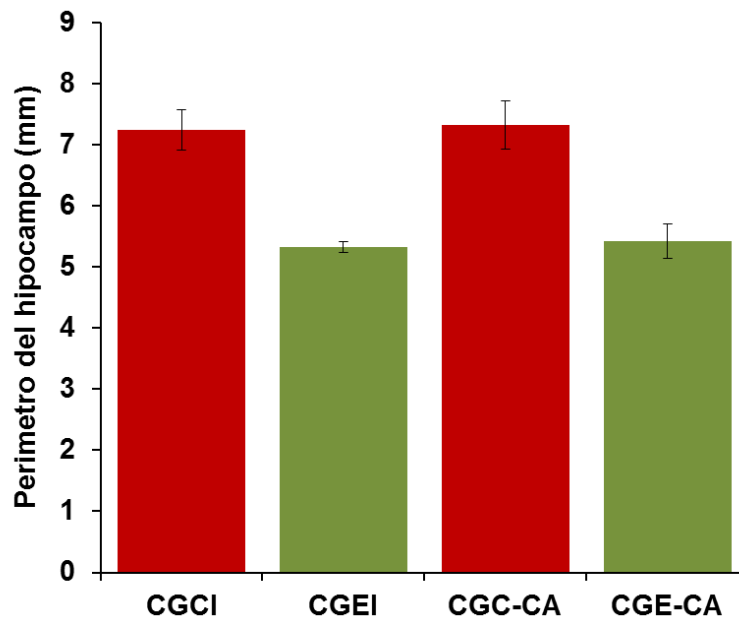


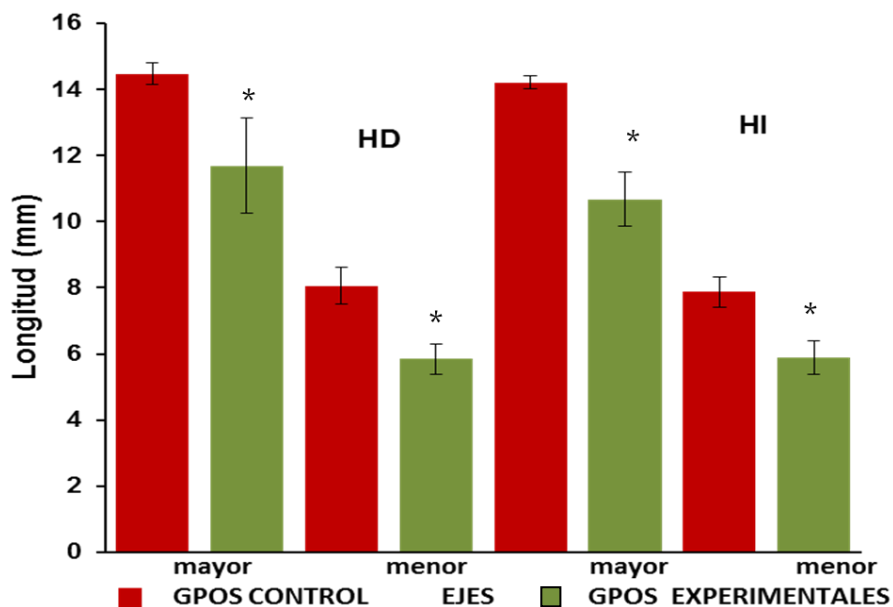
Figura 8. Imagen del hipocampo de 30 días de edad en el Bregma -3.60 mm. A= Hipocampo de cría de rata control. Se observa el giro dentado (GD), las regiones CA1 y CA3. y B= Hipocampo de cría de rata diabética se observa menor número de células piramidales en la área hipocampal. Técnica de Golgi rápido. Escala de la barra 25 μ m.

Los valores registrados del perímetro del hipocampo dorsal de las crías de los grupos control/experimental intactos (CGCI/CGEI) fueron: 7.251 ± 0.33 / 5.321 ± 0.095 . Con la aplicación de la prueba conductual en campo abierto a las crías de los grupos (CGC-CA/CGE-CA) los valores fueron de: 7.33 ± 0.39 / 5.42 ± 0.28 , siendo significativamente más pequeño el hipocampo de crías descendientes de madres diabéticas (Gráfica 6).



Gráfica 6 Perímetro del hipocampo dorsal de crías de 30 días de edad. Donde se muestran las diferencias del perímetro de los hipocampos de los grupos experimentales (CGEI y CGE-CA). (n=3 para c/gpo)

En cuanto a la longitud de los ejes del hipocampo dorsal (Gráfica 7), el tamaño del eje mayor del grupo control y experimental intactos (CGCI/CGEI), fue de: 4.31 mm \pm 0.1602/3.87 mm \pm 0.191 respectivamente y para los ejes menores fueron de: 3.36 mm \pm 0.081/2.82 mm \pm 0.05. El eje mayor hipocampal en las crías de los grupos a las que se les aplico la prueba en campo abierto (CGC-CA/CGE-CA) midió: 4.503 mm \pm 0.19/3.92 mm \pm 0.22 respectivamente y para el eje menor los valores fueron de: 3.45 mm \pm 0.095/2.96 mm \pm 0.12. Por lo que podemos decir que la longitud de los ejes de crías descendientes de madres diabéticas fueron más pequeños con diferencia significativa de $p < 0.05$ comparado con las crías de madres control.



Gráfica 7. Longitud de los ejes mayor y menor del hipocampo dorsal. En las crías de ratas diabéticas (CGEI y CGE-CA) el tamaño de la longitud de los ejes fue significativamente más pequeño que el de las crías obtenidas de los grupos control (CGCI y CGC-CA) $P < 0.05$ ($n=3$ para c/gpo).

Características morfológicas y morfométricas de las neuronas piramidales de CA3:

Las neuronas piramidales de CA3 del hipocampo de crías evaluadas a los 30 días de edad de los grupos control (Figs. 9A y C) presentaron su morfología piramidal característica, el tamaño del soma definido y normal, la dendrita apical con numerosas ramificaciones dendríticas y espinas a lo largo el eje. En cambio, las neuronas del hipocampo de crías obtenidas de los grupos diabéticos (Figs. 9B y D) se vio afectado el tamaño del soma, se observaron menos ramificaciones en la arborización dendrítica y en

algunas ramas a lo largo de su eje se observaron espacios sin espinas (comparar figs. 9A y C con figs. 9B y D). Es importante mencionar que el grupo de crías obtenidas de madres diabéticas con estudio en campo abierto (CGE-CA) aumento el tamaño de los somas y se apreció un incremento en el número de ramificaciones dendríticas (Fig. 9D) con respecto al grupo experimental intacto (comparar figs. 9B con 9D).

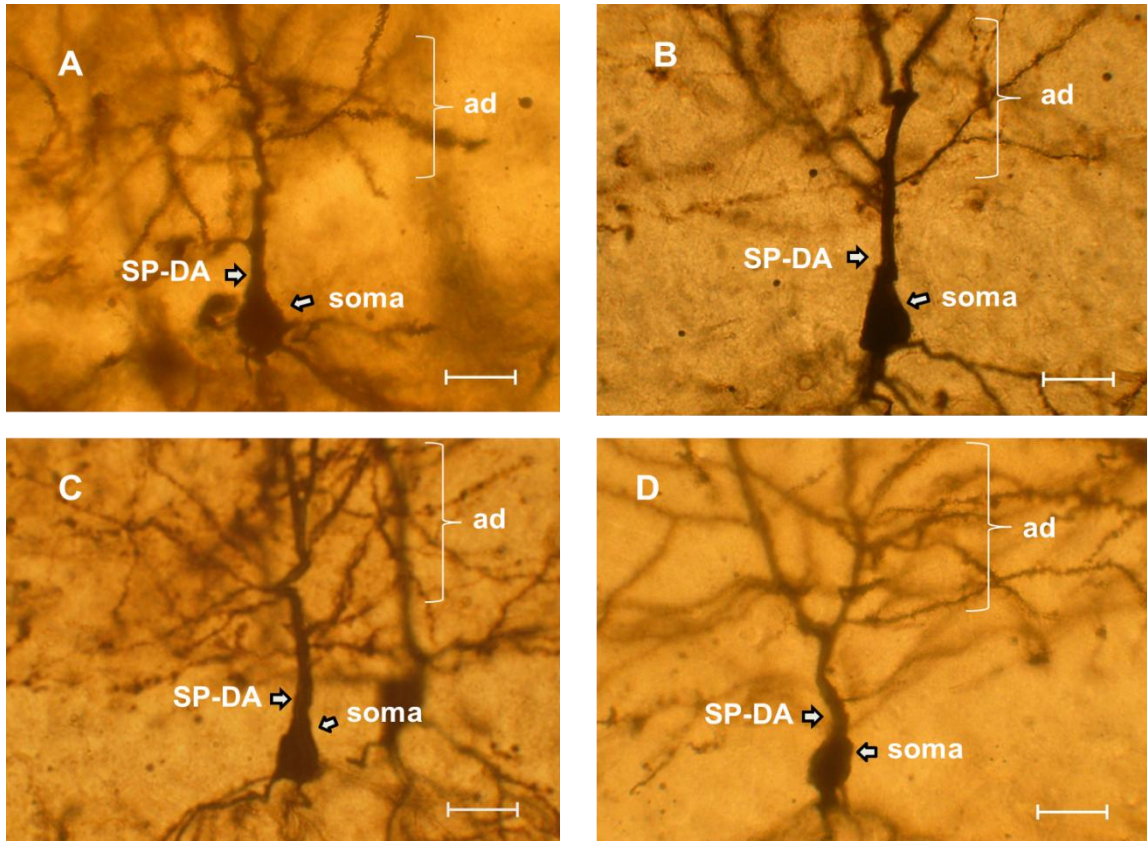
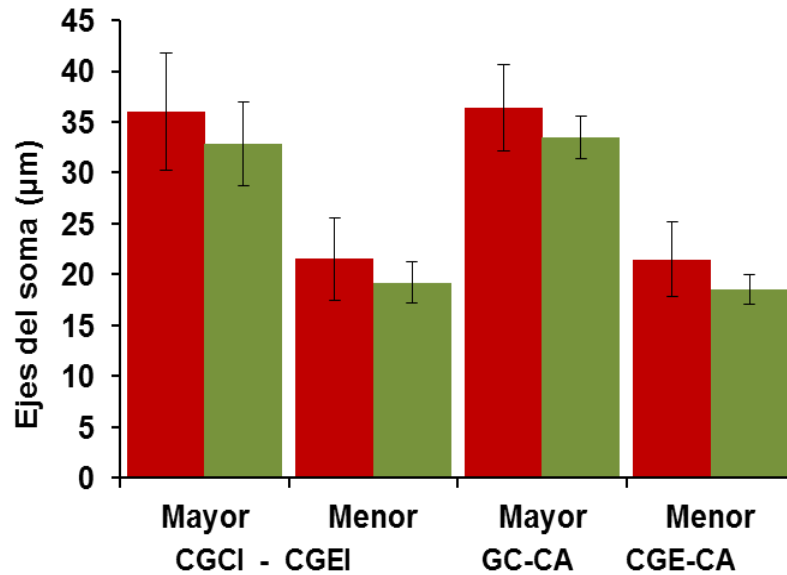


Figura 9. Neuronas piramidales de CA3 del hipocampo dorsal de crías de 30 días de edad de los grupos: A= control intacto y C= control con campo abierto. Neuronas piramidales de crías de ratas diabéticas: B= intacto y D= con campo abierto. SP-DA= segmento proximal de la dendrita apical; ad= arborización dendrítica. Escala de la barra 25 μ m. Técnica de Golgi rápido. Observe menor plasticidad en las crías de ratas diabéticas (B y D) comparada con los grupos control (A y C). (n=36 para c/gpo)

Morfometría: El promedio \pm desviación estándar del eje mayor de los somas en los grupos control y experimental intactos (CGCI/CGEI) fue de $36 \pm 5.73/32.86 \pm 4.03$ y para eje menor de: $21.55 \pm 4.11/19.19 \pm 2.03$. En los grupos con estudio conductual (CGC-CA/CGE-CA) lo promedios para el eje mayor fueron de: $36. \pm 4.20/33 \pm 3.66$ y para el eje menor $21.5 \pm 2.13/18.58 \pm 1.45$ (Gráfica 8). Aunque el tamaño del eje mayor y menor en

las crías de ratas diabéticas fue menor que en las controles esta diferencia no fue estadísticamente significativa.



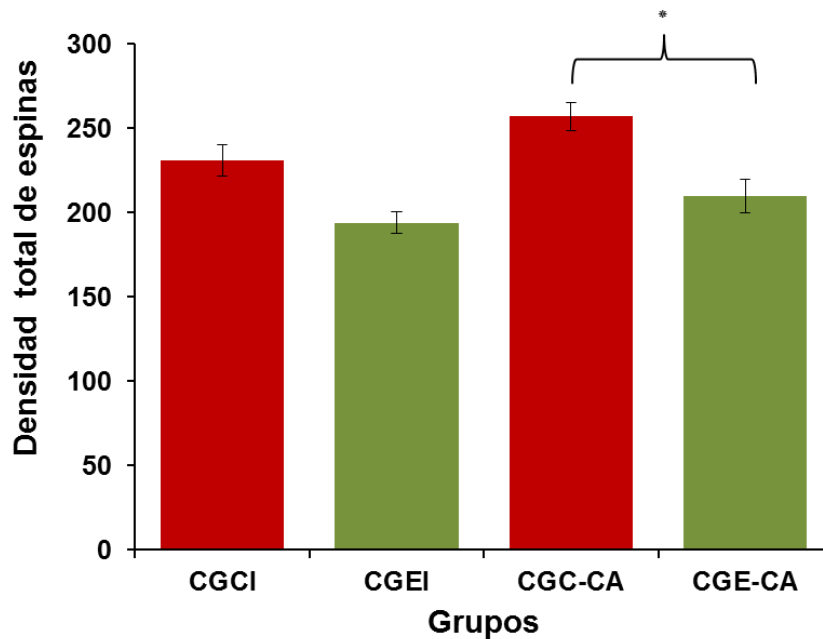
Gráfica 8. Promedio y desviación estándar de los ejes mayor y menor de somas de crías de 30 días de edad de los cuatro grupos de estudio. (n=36 para c/gpo). Aunque el soma neuronal fue más pequeño en las crías obtenidas de ratas diabéticas, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Densidad total de espinas dendríticas:

El análisis de resultados realizado con la ANOVA de una vía sobre la densidad total de espinas dendríticas de las tres regiones analizadas reveló diferencias significativas en los grupos de estudio. En la gráfica 9 se aprecia que la hiperglicemia materna durante el periodo de gestación afectó el desarrollo de las espinas dendríticas, reflejándose menor plasticidad neuronal en el grupo experimental intacto (CGEI= 194 espinas \pm 8.61) comparado con el grupo control (CGCI=231 \pm 9.13). Cuando se realizó la cuantificación para los grupos con estudio en campo abierto, se cuantificó un incremento de espinas dendríticas como respuesta a esta nueva experiencia conductual y los valores obtenidos fueron (CGE-CA/CGC-CA): 210 \pm 10.03/ 257 \pm 6.54.

Al comparar la densidad de espinas dendríticas en crías intactas obtenidas de ratas diabéticas con las el grupo experimental al que se le aplicó la prueba conductual de

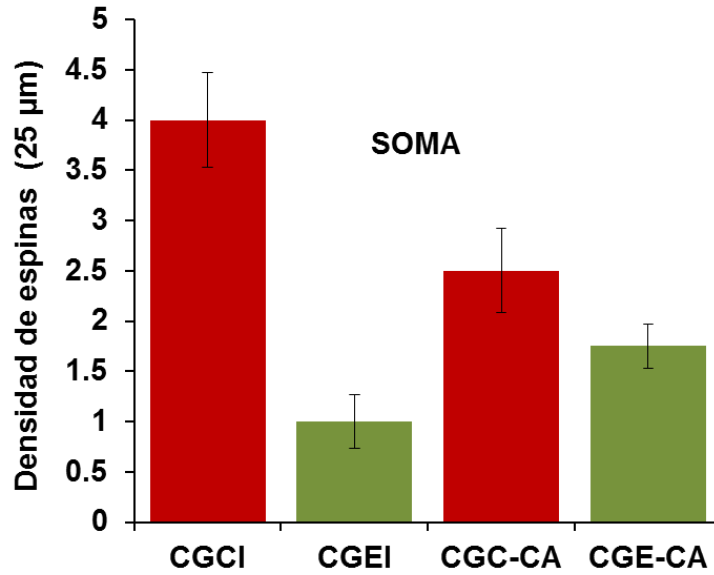
campo abierto se apreció un incremento estadísticamente significativo de espinas con una $p < 0.01$. Esto nos muestra que la prueba conductual estimulo la formación de espinas dendríticas en las crías de ratas diabéticas, pero no alcanzó el numero de espinas que presentaron las del grupo control sometidas a la misma prueba.



Gráfica 9. Densidad total de espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA3 del hipocampo dorsal cuantificadas en las 3 regiones estudiadas. (n=36 para c/gpo. $p \leq 0.01$)

Cuantificación de espinas dendríticas por región:

Soma: Se observaron escasas espinas dendríticas en el soma de las neuronas piramidales hipocampales de la región CA3 en los 4 grupos de estudio (Gráfica 10, fig.10). El promedio y desviación estándar de espinas cuantificadas en las 25 micras de longitud en neuronas de crías del grupo control intacto (CGCI) fue de 4 ± 0.47 y para el grupo con estudio de campo abierto (CGC-CA) el promedio fue de 2.5 ± 0.42 , en este grupo se observó menos espinas aun expuestas al estudio conductual. Por el contrario las crías descendientes de madres diabéticas (CGEI y CGE-CA) mostraron un aumento significativo de espinas al aplicarles la prueba tuvieron una media de 1 ± 0.27 / 1.75 ± 0.42 . Así mismo se aprecia en la gráfica que las crías de madres diabéticas con y sin aplicación de prueba en campo abierto presentaron menos espinas que las controles.



Gráfica 10. Densidad de espinas dendríticas en somas de neuronas piramidales de crías de 30 días de edad en las diferentes condiciones de estudio. Se puede apreciar significativamente mayor número de espinas dendríticas en las crías obtenidas de ratas control comparadas con las diabéticas. (n=36 neuronas para c/gpo)

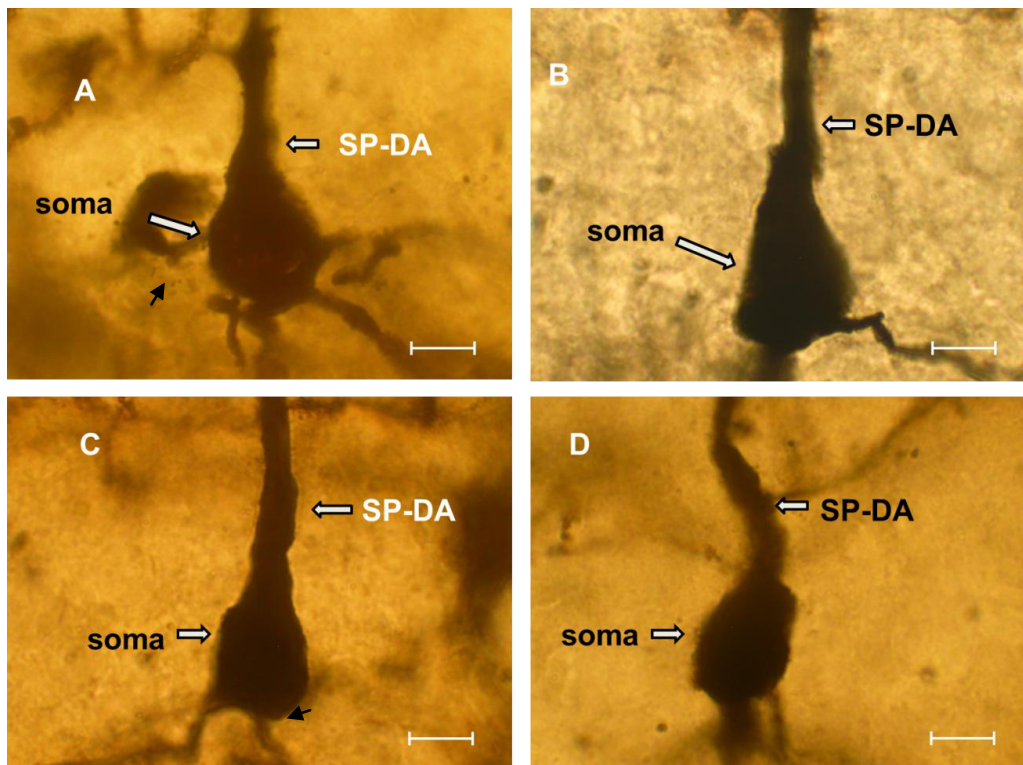
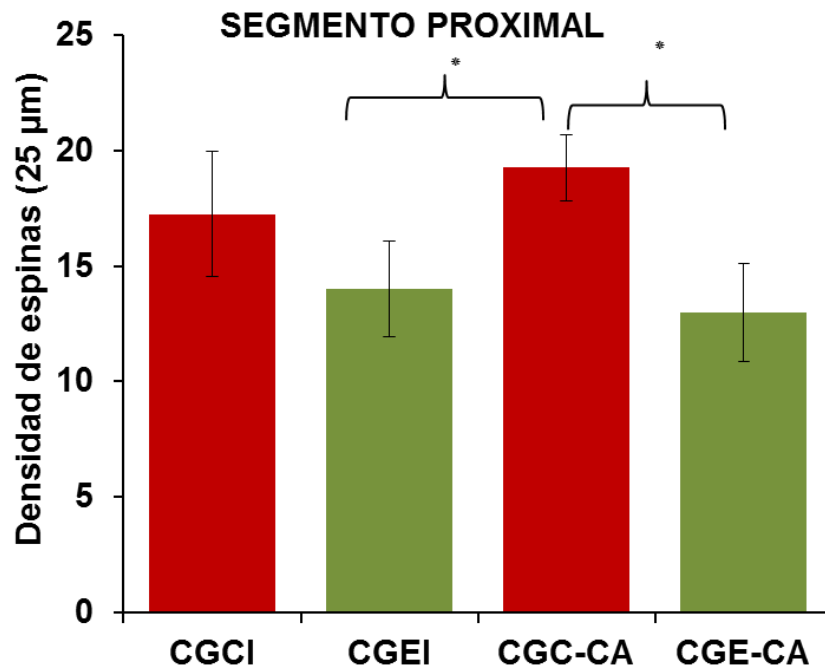


Figura 10. Somas de neuronas piramidales de crías de 30 días de edad. En las fotomicrografías se aprecian escasas espinas dendríticas (flechas negras) en crías intactas y sometidas a campo abierto. Segmento proximal de la dendrita apical (SP-DA). Escala de la barra 10 μm. Técnica de Golgi rápido. (A) CGCI, (B) CGEI, (C) CGC-CA y (D) CGE-CA (n=36 neuronas para c/gpo)

Segmento proximal de la dendrita apical: La cantidad de espinas fue mayor en comparación al soma. La densidad de espinas dendríticas en esta región se muestra en la gráfica 11 y fig. 11, en donde el número de espinas en los grupos control (CGCI y CGC-CA) aumento, principalmente en el grupo con estudio en campo abierto: $17.25 \pm 2.7/19.25 \pm 1.4$. En los grupos experimentales los valores fueron menores con valores de $14 \pm 2.05/13 \pm 2.1$. Se encontraron diferencias significativas en los grupos con estudio conductual (CGC-CA vs CGE-CA) con una $p < 0.01$, es decir la hiperglucemia durante la gestación disminuyo la plasticidad neuronal en hijos de madres diabéticas sometidas a la prueba conductual comparadas con los controles. Este mismo comportamiento se observó en los grupos CGC-CA vs CGEI con una $p < 0.01$



Gráfica 11. Promedio y desviación estándar de espinas dendríticas en el segmento proximal de neuronas piramidales de CA3 de crías de 30 días de edad $p < 0.01$ ($n = 36$ neuronas para c/gpo)

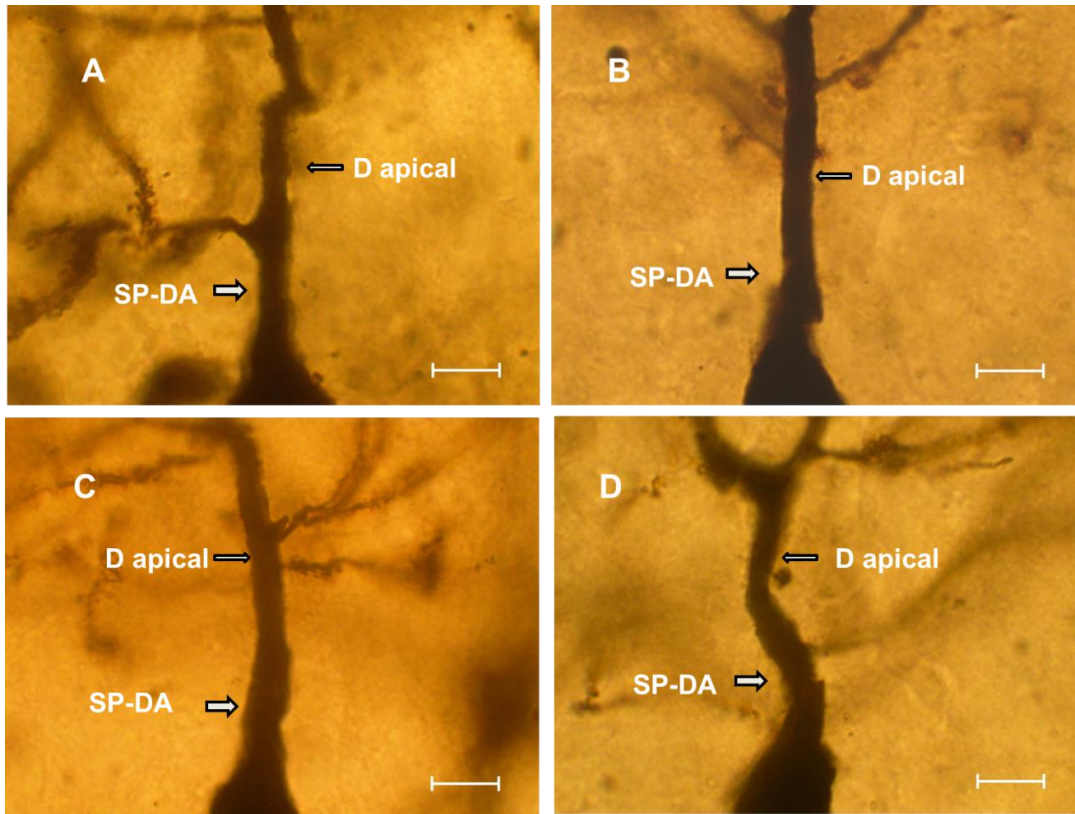
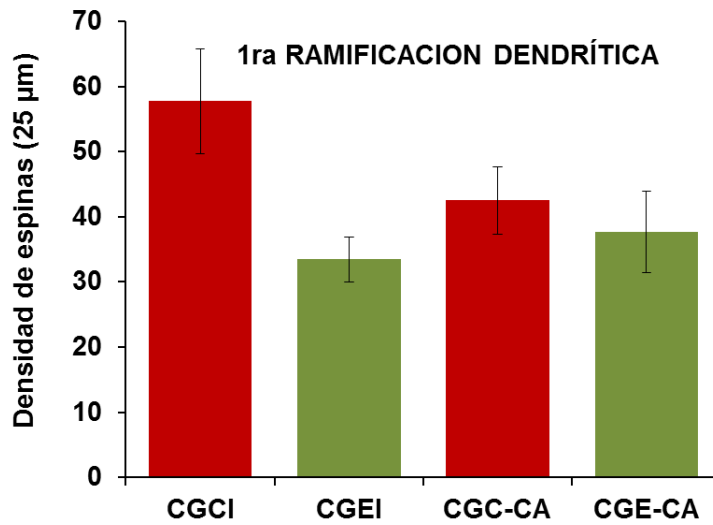


Figura 11. Segmento proximal de la dendrita apical (SP-DA) de neuronas piramidales del hipocampo dorsal de crías de 30 días de edad de los cuatro grupos de estudio: (A) CGC; (B) CGEI; (C) CGC-CA y (D) CGE-CA. Los grupos de crías experimentales presentaron menor densidad de espinas dendríticas comparadas con las controles. Escala de la barra 10 μm . Técnica de Golgi rápido. D- apical, Dendrita apical. (n=36 neuronas para c/gpo)

1^{ra} Ramificación de la dendrita apical: En cuanto al estudio morfométrico de esta región se cuantificó la mayor cantidad de espinas dendríticas comparado con las regiones antes descritas (Gráfica 12). Para el grupo control intacto los valores de la media fueron 57 ± 8.05 y para el de campo abierto la media fue: 42.5 ± 5.15 , al comparar los valores con los experimentales el grupo CGEI presentó un decremento de espinas con promedio de 33.5 ± 3.45 y el grupo CGE-CA un promedio de 37.75 ± 6.25 . Puede observarse que las crías de madres diabéticas intactas presentaron una marcada disminución de espinas dendríticas comparadas con los controles, así también las crías que fueron expuestas a un ambiente exploratorio presentaron un aumento en el número de espinas comparado con las crías intactas pero no hubo significancia. En la fig. 12 se pueden observar los diferentes tipos de espinas distribuidos a lo largo de la ramificación dendrítica. En el grupo

experimental intacto (B) se ven espacios en la dendrita (flechas negras) y las espinas no están bien definidas en comparación con los otros grupos de estudio 12A, C y D.



Grafica 12. Densidad de espinas dendríticas en la primera ramificación donde se observa que los grupos CGCI y CGC-CA presentaron mayor densidad de espinas comparado con los grupos experimentales CGEI y CGE-CA. (n=36 neuronas para c/gpo)

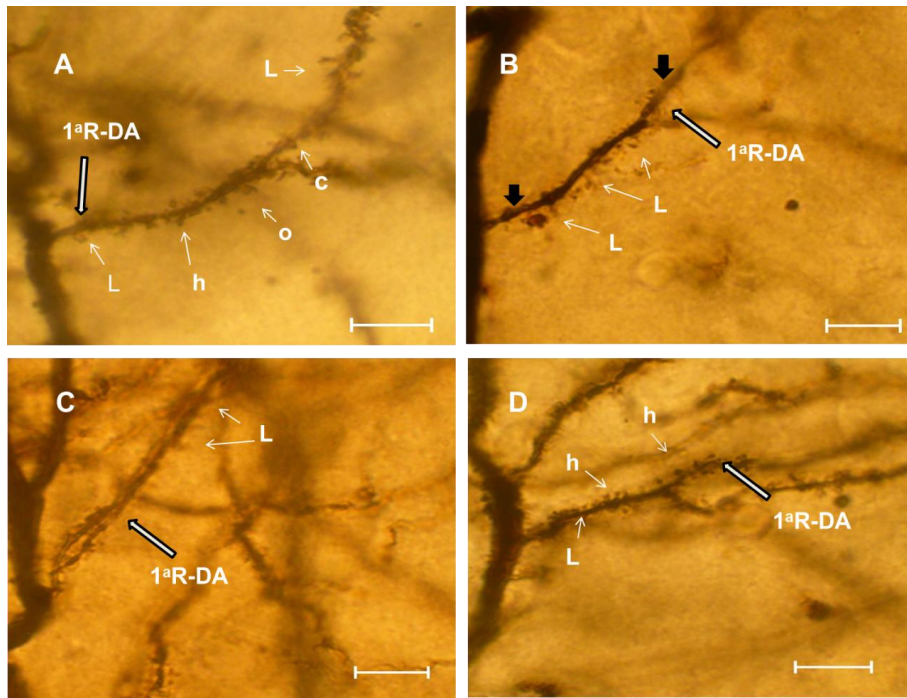
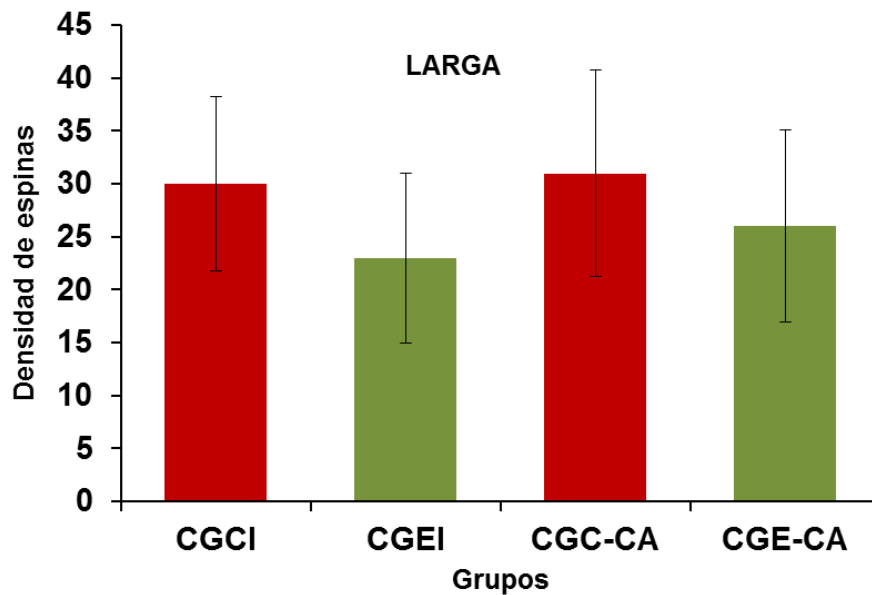


Figura 12. Densidad de espinas dendríticas de la primera ramificación de la dendrita apical (1ªR-DA) en neuronas piramidales de CA3 de hipocampo dorsal de crías de 30 días de edad de los grupos: (A) CGCI; (B) CGEI; (C) CGC-CA y (D) CGE-CA. Se observa en los grupos experimentales menor plasticidad que en los grupos control. L, espina larga; h; espina de hongo; espina corta c; espina de copa. Escala de la barra 10 μm. Técnica de Golgi rápido. (n=36 neuronas para c/gpo)

Tipo de Espinas Dendríticas

La densidad de todos los tipos de espinas fue modificada por el ambiente hiperglucémico en el que se desarrollaron las crías obtenidas de ratas diabéticas durante la gestación. En cambio las crías de los grupos control que estuvieron inmersos en un ambiente euglucémico durante su desarrollo no se alteró su patrón de espinogénesis.

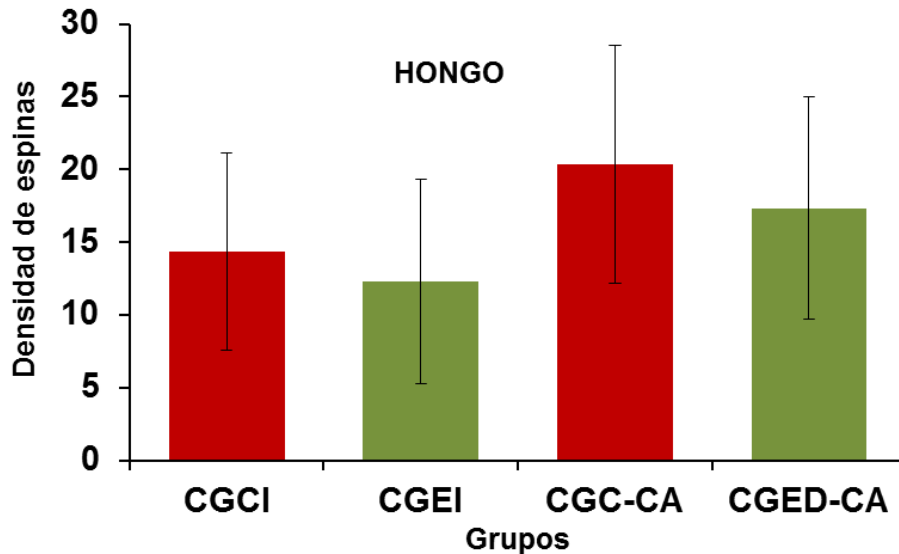
En cuanto al tipo de espinas identificadas en las diferentes regiones de las cuatro condiciones de estudio las espinas largas fueron las que se cuantificaron más. En la gráfica 13 se muestra éste aumento de espinas, las crías que tuvieron una experiencia a un ambiente nuevo (prueba exploratoria en campo abierto), presentaron un ligero incremento en la espinogénesis (CGC-CA y CGE-CA) con valores de media y error estándar de $31 \pm 23.55/26 \pm 9.098$ respectivamente y un valor de $p= 0.3401$. Mientras que los grupos intactos (CGCI y CGEI) sus valores de media y error estándar fueron: $30 \pm 8.249/23 \pm 8.036$ y un valor de $p= 0.2271$. A pesar de que este tipo de espina fue el más abundante en los cuatro grupos, no se encontraron diferencias significativas.



Gráfica 13. Número de espinas dendríticas largas cuantificadas en las tres regiones en neuronas piramidales de CA3 de hipocampo de crías de 30 días de edad de ratas control y experimental. (n=36 neuronas para c/gpo)

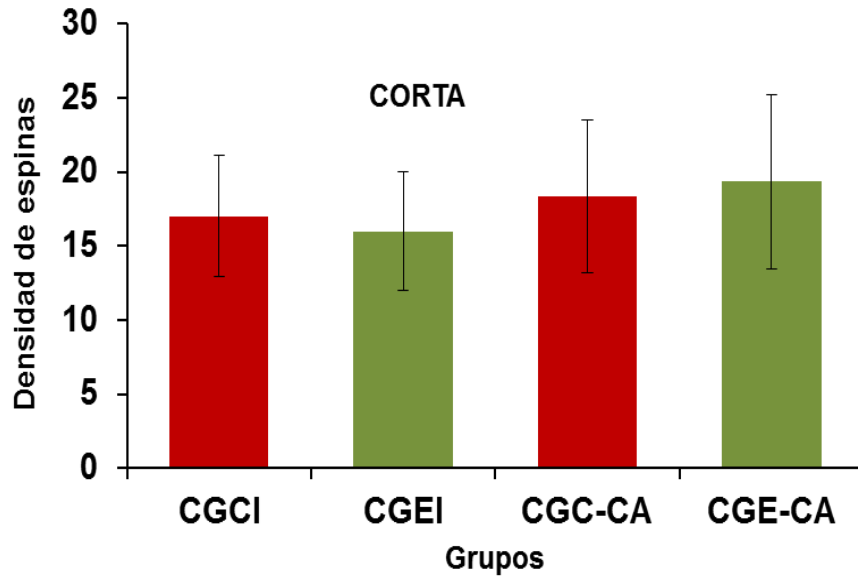
Las espinas de hongo fueron las segundas más abundantes (Gráfica 14) donde también se observó un incremento de este tipo en los grupos con estudio conductual (CGC-

CA/CGE-CA) con una media y error estándar de $20.33 \pm 8.17/17.33 \pm 7.66$ y con un valor de $p= 0.4175$, en cuanto a los grupos de crías intactas (CGCI/CGEI) los valores de media y error estándar fueron: $14 \pm 6.79/12.33 \pm 7.02$ con un valor de $p= 0.5888$.



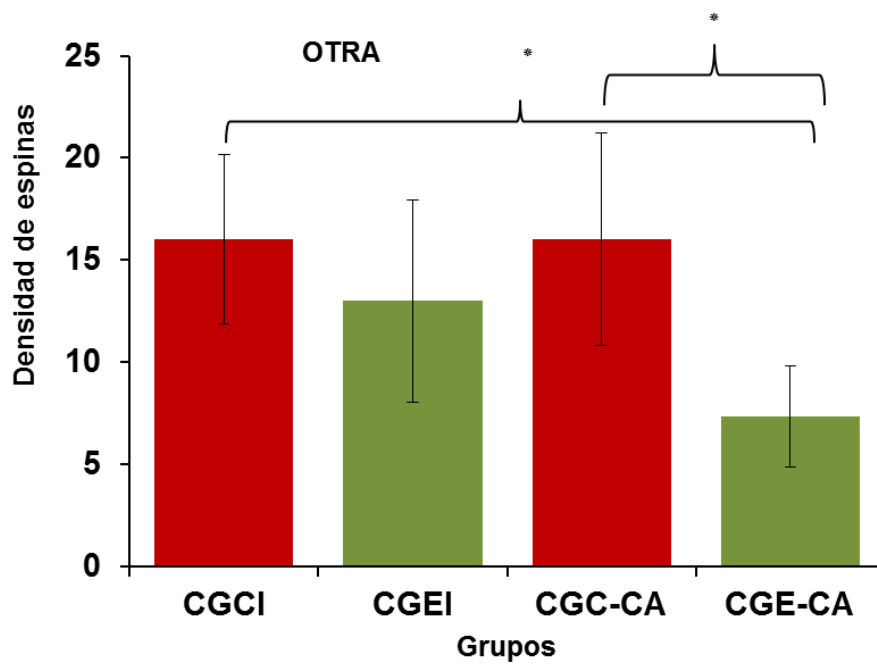
Gráfica 14. Densidad de espinas dendríticas tipo hongo cuantificadas en las tres regiones seleccionadas en neuronas piramidales de CA3 de hipocampo dorsal de los diferentes grupos de estudio. (n=36 neuronas para c/gpo)

En cuanto a las espinas cortas (Gráfica 15), se observó un mayor incremento en el grupo experimental con estudio conductual (CGE-CA) con una media y error estándar de: 19.33 ± 5.84 , seguido del grupo control con estudio conductual (CGC-CA) con una media de: 18.33 ± 5.16 y valor de $p= 0.7901$ para ambos grupos. Los valores de las espinas de los grupos de crías intactas (CGCI/CGEI) la media y el error estándar fueron menores: $17 \pm 4.099/16 \pm 3.96$ y el valor de $p= 0.7901$. En este tipo de espina no se encontraron diferencias significativas.



Gráfica 15. Densidad de espinas dendríticas tipo corta cuantificadas en las tres regiones seleccionadas en neuronas piramidales de CA3 de hipocampo dorsal de los diferentes grupos de estudio. (n=36 neuronas para c/gpo)

Y el último tipo de espinas cuantificado fueron las “otras” (Gráfica 16), en la gráfica se muestra que las espinas “otras” del grupo experimental con estudio conductual (CGE-CA) presentó significativamente menor número de espinas comparado con los grupos control y experimental intacto (CGCI, CGC-CA y CGEI). Los valores de media y error estándar para los grupos intactos (CGCI/CGEI) fueron: $16 \pm 4.14/13 \pm 4.94$. Entre los grupos con estudio de campo abierto (CGC-CA/CGE-CA) los valores de media y error estándar fueron: $16 \pm 5.51/7.33 \pm 2.49$ y el análisis estadístico reflejó diferencia estadísticamente significativa con $p < 0.002$ y también entre los grupos (CGCI vs CGE-CA) con diferencia significativa de $p < 0.002$



Gráfica 16. Densidad de espinas dendríticas tipo otra cuantificadas en las tres regiones seleccionadas en neuronas piramidales de CA3 de hipocampo dorsal de los diferentes grupos de estudio $p < 0.02$ (n=36 neuronas para c/gpo)

6. DISCUSIÓN

Existe controversia acerca del efecto que tiene la diabetes materna durante la gestación sobre el desarrollo hipocampal y en las habilidades cognitivas propias de esta región. En este trabajo se evaluó el efecto teratogénico que ocasiona un ambiente intrauterino hiperglucémico sobre la densidad y morfología de espinas dendríticas de neuronas piramidales del hipocampo dorsal en crías de 30 días, obtenidas de ratas diabética y su correlación con la baja capacidad de atención, disminución en la locomoción y poca seguridad que presentan al explorar un ambiente nuevo en campo abierto.

Los hallazgos del presente estudio revelan que la hiperglucemia materna durante el periodo gestacional, afectó de forma diferente el tipo y número de espinas dendríticas, su distribución en las tres regiones evaluadas y el tamaño del soma de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo dorsal. Estos resultados se correlacionaron con trastornos en el aprendizaje espacial observado en las crías de madres diabéticas previamente descrito por González en 2011, quien reportó disminución en la locomoción, poca seguridad al explorar un ambiente nuevo, menor capacidad de atención y aumento de ansiedad.

Se utilizó a la rata como modelo experimental y a la STZ como agente químico para la inducción de diabetes, este fue un modelo adecuado ya que se mantuvo un estado hiperglucémico durante todo el periodo de gestación que fue comprobado mediante el monitoreo metabólico realizado a las ratas, donde los valores registrados de la glucemia fueron mayores a los 200 mg/dl (ver gráfica 1); al mismo tiempo se llevó el monitoreo del peso corporal en donde se observó que antes de la inducción de la diabetes los animales iban aumentando de peso, pero posterior a la inducción hubo poca ganancia de peso en comparación con las ratas controles (Gráfica 2). Estos datos de los altos niveles de glucosa en sangre inducidos por la STZ y la pérdida de peso son similares a los reportados en la literatura en donde emplean el mismo procedimiento de inducción (Martínez, 2005; Szkudelski, 2001; Hugues, 2001, Palomino, 1998; Salazar, 2010).

Un aspecto importante a considerar es que el estado hiperglucémico desarrollado por las ratas tratadas con STZ se estableció antes de que se implantara el embrión, lo anterior permite confirmar que los hallazgos encontrados en las crías fueron debido al ambiente

hiperglucémico intrauterino en el que se desarrollaron y no al efecto directo de la STZ, esto concuerda con lo reportado por Polanco y colaboradores en el 2005.

En cuanto a los parámetros metabólicos de las crías obtenidas de los grupos control y diabético, los niveles de glucosa fueron registrados dentro de los parámetros normales (80-120 mg/dl), además, no se detectó glucosuria y cetonuria en ninguna de las crías de los cuatro grupos de estudio (ver gráfica 3). Estos resultados permiten inferir que la glucemia de las crías no fue un factor que pudiera haber afectado su desarrollo en etapas posteriores. Por otro lado, los descendientes de madres diabéticas (CGE), presentaron una disminución significativa del peso corporal comparado con las crías control (CGC), a pesar de haber cursado por un periodo de gestación que se prolongó dos días, lo que concuerda con lo reportado por otros autores que señalan que la hiperglucemia materna induce una desregulación cronológica del desarrollo (Salazar, 2010; Polanco, 2001), situación que se sigue reflejando en la etapa postnatal.

La diabetes materna inducida durante el periodo gestacional resultó ser un factor nocivo durante el desarrollo del SNC. Las alteraciones observadas en el patrón de maduración dendrítico como en el de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de CA3 del hipocampo dorsal en crías de 30 días de edad se correlacionaron con el menor tamaño del cerebro e hipocampo y con las alteraciones en la memoria espacial reportados por González, 2011.

En cuanto al análisis morfométrico del hipocampo de crías de madres diabéticas, tanto el perímetro como sus ejes mayor y menor fueron significativamente más pequeños que los controles, datos que también confirman la desregulación cronológica previamente señalada. Estos cambios morfométricos, reflejan los efectos de la hiperglucemia durante el desarrollo embrionario y fetal de esta estructura, fundamental para los procesos de aprendizaje y memoria. Esta evidencia es importante ya que no existen reportes morfométricos del hipocampo en crías 30 días de edad, así como tampoco del tamaño de las neuronas piramidales de CA3.

Aunque no se tiene una referencia bibliográfica que apoye o contradiga los resultados obtenidos en la morfología y morfometría de las neuronas piramidales así como la densidad total de espinas dendríticas en ratas expuestas a un ambiente hiperglicémico durante el desarrollo hipocampal, existen mecanismos propuestos en ratas en las que se

indujo la diabetes en etapas juveniles y adultas que señalan que las altas concentraciones de glucosa afectan la plasticidad neuronal. En estos casos, se ha propuesto que esta condición metabólica altera los niveles de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) que regula la síntesis del óxido nítrico repercutiendo en estas alteraciones morfológicas neuronales en diferentes regiones del cerebro entre ellas el hipocampo, la corteza prefrontal y la corteza occipital teniendo como consecuencia alteraciones en el aprendizaje y la memoria (Martínez, 2005; Malone, 2006).

Otro de los mecanismos propuestos para explicar alteraciones en la plasticidad neuronal en ratas juveniles hiperglucémicas es el incremento en los niveles intracelulares de sorbitol e inositol en la corteza cerebral y el hipocampo, lo que trae como consecuencia que disminuyan los niveles de taurina, aminoácido importante en el crecimiento neuronal. Al presentarse estos cambios morfológicos en las neuronas se alteran las sinapsis excitadoras que se encuentran en las espinas dendríticas y disminuye la superficie de contacto neuronal, aunado al decremento de espinas, esto se traduce en una reducción del potencial de interacción neuronal deficiente.

La atrofia y la pérdida de las espinas dendríticas han sido previamente asociadas con la disfunción cognitiva en los roedores y en los seres humanos y esto refleja una ruptura o interrupción de los circuitos cerebrales. Por lo que, en este estudio podemos inferir que la hiperglucemia durante la gestación induce una menor formación de espinas dendríticas, lo cual podría ser la base fundamental neuroanatómica de la disminución en la plasticidad neuronal en las crías de madres diabéticas y por consiguiente de las alteraciones neuroconductuales reportadas por González en el 2011.

Por otra parte, las crías sometidas a campo abierto independientemente del tipo de tratamiento presentaron un aumento en la densidad de espinas dendríticas (comparar figuras 9A con 9C y figuras 9B con 9D), estos resultados son concordantes con lo reportado con Widman-Rosellini 1990 y Larson 2002 quienes describen que la exploración en situaciones de novedad en campo abierto incrementa la actividad exploratoria y por ende la plasticidad neuronal. Así mismo los resultados son concordantes con lo señalado por Drapeau en 2003, sobre la relación directa que existe del nivel de neurogénesis y el aprendizaje de tareas dependientes del hipocampo. Observe en la gráfica 9, que aunque aumentó la densidad de espinas en las crías obtenidas de ratas diabéticas (CGE-CA),

este fue significativamente menor que en las crías obtenidas de ratas control, es decir la plasticidad sináptica fue menor aún con el estímulo de la prueba conductual.

En cuanto a la distribución y cantidad de espinas dendríticas evaluadas en las neuronas piramidales de crías de 30 días de edad, se observó que la distribución de éstas varió de acuerdo a la región del cuerpo neuronal. En el presente trabajo se contó que el soma fue la zona con menor número de espinas dendríticas, seguido del segmento proximal de la dendrita apical y por último la primera ramificación dendrítica en donde se cuantificó el mayor número de espinas. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, en donde se señala que la distribución de las espinas dendríticas aumenta conforme se aleja del cuerpo neuronal siendo más abundantes en la región distal del árbol dendrítico (Miller, 1981a). Esta distribución de espinas dendríticas le dio al hipocampo la característica de plasticidad neuronal.

En cuanto al tipo de espinas que se encontró con más frecuencia fueron las espinas largas, después las de hongo junto con las cortas y por último las espinas “otras”, datos que son congruentes con lo reportado previamente por otros autores. De acuerdo con Harris y colaboradores 1998, la densidad proporcional de cada tipo de espina varía en las diferentes estirpes neuronales en cuestión. Sin embargo, existe una tendencia general que indica que las espinas más abundantes en una neurona son las largas, tanto en neuronas del hipocampo, la corteza cerebral así como en las células de Purkinje del cerebelo. Le siguen aquellas en forma de hongo en una proporción que oscila entre 25 a un 35% en tanto que las cortas están presentes entre 20 y 30%. Aunado al hecho de que las espinas largas, en hongo y cortas son las más abundantes, la relativamente grande variación de sus proporciones parece crítica para la integración de la información sináptica que intermedian (Harris, 1992). Las espinas clasificadas en el grupo de “otras” fue el tipo de espina que se encontraron en menor número en las crías de ratas diabéticas aun cuando se les aplicó la prueba conductual y de acuerdo con Bourne y colaboradores en 2008, mencionan que este tipo de espina es una fase de transición de maduración hacia el tipo larga u hongo dependiendo del estímulo recibido. De acuerdo con nuestros resultados los diferentes tipos de espinas cuantificadas reflejan que la hiperglucemia materna durante la gestación provocó una menor sinaptogénesis en las crías repercutiendo en la etapa postnatal en una menor plasticidad neuronal que se vio reflejada en los cambios conductuales de los animales.

Nuestros resultados son concordantes con lo reportado por Malone en 2008, quien señala que las espinas largas están estrechamente relacionadas con el aprendizaje y las espinas tipo hongo con funciones específicas de memoria por lo que su menor frecuencia podría estar relacionada con el deterioro de la memoria en las crías de ratas hiperglucémicas. Lee en el 2005, señaló que las formas y el número de espinas dendríticas van cambiando drásticamente en las diferentes condiciones fisiológicas o patológicas, como el desarrollo, la concentración de calcio o el enriquecimiento del medio ambiente además los reajustes estructurales de las espinas dendríticas son inducidos después de potenciales a largo plazo (LTP).

Los resultados de los estudios morfométricos realizados al cerebro, hipocampo y neuronas piramidales de la región CA3 demostraron que las altas concentraciones de glucosa en el que se desarrollaron los embriones y fetos impacto negativamente en la histogénesis de esta estructura, daño que se vio reflejado en la etapa postnatal en una menor plasticidad hipocampal y esta menor densidad de espinas dendríticas se correlaciono con la falta de atención, seguridad de las crías de ratas diabéticas, así como alteración en la locomoción y memoria a corto y largo plazo previamente señalados.

Nuestros hallazgos amplían el poco conocimiento que se tiene en este campo y permiten hacer inferencia en niños de año y medio de edad (equivalente a las ratas de 30 días), tiempo en que los procesos de histogénesis y microneurogénesis son los predominantes y que son esenciales en los procesos de memoria y aprendizaje. Información que debe llegar al ámbito de profesionales clínicos para diseñar las estrategia necesarias para prevenir estas deficiencias conductuales y mejorar en ellos problemas en el ámbito académico que pudieran presentarse.

7. CONCLUSIONES

- 1.- El modelo utilizado en este trabajo mostro ser adecuado debido a que se logró inducir y mantener la hiperglucemia desde antes que se implantara el embrión hasta la fase terminal de la gestación.
- 2.- La hiperglucemia materna durante la gestación alteró los procesos de neurogénesis, embrionaria, fetal y postnatal, alterando la plasticidad de las neuronas piramidales de CA3 del hipocampo que se correlacionó con la capacidad de aprendizaje.
- 3.- Los cambios morfométricos observados en la densidad de espinas dendríticas de las crías de los grupos control y experimental con sólo exponerse una vez a la prueba de exploración en campo aumentó la plasticidad del área CA3 del hipocampo Sin embargo, en el grupo experimental esta plasticidad fue significativamente menor.
- 4.- La menor densidad de espinas dendríticas en el grupo experimental que se le aplicó el estudio de campo abierto se correlaciono con los cambios conductuales observados en las crías tales como, disminución de la capacidad de atención y seguridad al explorar un ambiente nuevo que repercutió en su capacidad de aprendizaje.

PERSPECTIVAS

1. Aumentar el tamaño de muestra es este diseño experimental y emplear estos hallazgos cito-estructurales y morfométricos con estudios de tipo fisiológico y bioquímico con el fin de entender mejor los cambios encontrados en el presente estudio.
2. Establecer la metodología del enriquecimiento ambiental como herramienta terapéutica para que el animal responda a una estimulación ambiental posterior tanto en términos de plasticidad neuronal como de conducta. Lo anterior ejercería un efecto trófico de incremento del tamaño, peso cerebral, número de dendritas y espinas, grado de ramificación dendrítica. (Kolb, 1998; Will et al. 2004), retraso en la aparición de trastornos motores (Lazic, 2006), o bien la estimulación podría generar un mecanismo alternativo no dependiente del hipocampo para mejorar la ejecución motora del sujeto (Hannigan et al 2007). Esta estrategia de intervención está encaminada a prevenir la aparición de trastornos neuro-conductuales asociados a los altos niveles de hiperglucemia intrauterina al que estuvieron expuestos y lograr las habilidades cognitivas y sociales de todos los niños que nacieron de una madre que cursó con diabetes materna. Ya existen evidencias clínicas que los niños estimulados resuelven mejor pruebas que evalúan rendimiento cognitivo y presentan menos problemas de conducta. (Kaler y Freeman, 1994; Joseph, 1999)

METAS LOGRADAS.

Los resultados iniciales se presentaron en el XXXIV Congreso Nacional de Histología llevado a cabo en la Facultad de Medicina U.N.A.M., obteniendo el 3er Lugar en la modalidad de cartel con el trabajo "La hiperglucemia materna disminuye en la progenie la densidad de excresencias espinosas en neuronas hipocampales".

Los resultados finales se someterán al XXXV Congreso Nacional de Histología que se llevará a cabo en la Facultad de Ciencias U.N.A.M.

8. REFERENCIAS

- 1.- Acosta Delgado D. y Palma Milla S. Algoritmo diagnóstico y terapéutico de la diabetes mellitus tipo1 en mujeres embarazadas. *Endocrinol Nutr* 2006; 53 (Supl 2): 68-76.
- 2.- Adams SV, Winterer J, Müller W. Muscarinic signaling is required for spike-pairing induction of long-term potentiation at rat Schaffer collateral-CA1 synapses. *Hippocampus* 2004; 4:413-6.
- 3.- Altman J. and Bayer SA. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal source of dentate granule cells. *J Comp Neurol* 1990; 301: 325-342.
- 4.- American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 2004; 27 (Supl 1): S5-S10.
- 5.- Ardilla A, Moreno- Benavides C. Aspectos biológicos de la memoria y el aprendizaje. México Ed. Trillas 1982.
- 6.- Bannister NJ, Larkman AU. Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurons from the rat hippocampus: II Spine distribution. *J Comp Neurol* 1995; 360: 161-71.
- 7.- Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol* 1980b; 190:115-134.
- 8.- Beauquis J, Roig P, De Nicola AF, Saravia F. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *Environment and Diabetes* 2010; 5: Issue 11.
- 9.- Biessels GJ, Kamal A, Ramakers GM y col. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes* 1996; 45: 1259-1266.
- 10.- Biessels GJ; Kamal A, Urban IJ y col. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Research* 1998; 125-135.
- 11.- Bourne JN, and Harris KM. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 2008; 31: 47-67.
- 12.- Bravo MJ. Modificación de la inhibición recurrente por la estimulación eléctrica iterativa o por la administración de fármacos convulsionantes. Tesis, UNAM, México, 1991.
- 13.- Carpenter MB. Neuroanatomía Fundamentos. 4th ed. Editorial Médica Panamericana: Madrid España, 1994: 344-367.
- 14.- Delgado J.M. Sistema límbico en: Fisiología Humana. 2th ed. Mc Graw Hill Interamericana: Madrid España, 1999: 902-930.

- 15.- Drapeau E, Mayo W. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2003; 100: 14385–14390.
- 16.- Eichenbaum H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behavioral Brain Research* 2001; 127: 199-207.
- 17.- Federación Mexicana de Diabetes (FMD) A.C. Diabetes en Números: Los números de la diabetes en México 2007.
- 18.- Flood J, Moradian A and Marley J. Characteristic of learning and memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 1990; 39: 1391-1938.
- 19.- Gabir MB, Momin M. Hanson RL. Dabelea D. The 1997 american diabetes association and 1999 world health organization criteria for hyperglycemia in the diagnosis and prediction of diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23:1108-1112.
- 20.- Góngora Alfaro J. Métodos generales para el estudio de la conducta motora espontánea: Locomoción, exploración y Tigmotaxis en Campo Abierto. *Revista de Neurociencias* 2008; 59: 1-17.
- 21.- González-Burgos I, Alejandro-Gómez M, Cervantes M. Spine type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. *Neurosci Lett* 2005; 379:52-4.
- 22.- González E. Hiperglucemia y embriogénesis. SIMPOSIO Prediabetes y diabetes aspectos básicos, clínicos y endocrinológicos. XIV Congreso de SAEM. 2005; 42 Supl 24:
- 23.- González Mora Mariana Del Carmen. Efecto teratogénico de la hiperglucemia en ratas gestantes sobre el aprendizaje y la memoria a corto y largo plazo de sus crías. Tesis, Universidad Del Edo de Durango. México, 2011
- 24.- Hannigan JH, O'Leary-Moore SK, Berman RF. Postnatal environmental or experiential amelioration of neurobehavioral effects of perinatal alcohol exposure in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; 31: 202-211.
- 25.- Harris KM, Jensen FE, Tsao B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 1992; 12: 2685-705.
- 26.- Harris KM, Jensen FE, Tsao BH. Ultrastructure, development, and plasticity of dendritic spine synapses in area CA1 of the rat hippocampus; extending our vision with serial electron microscopy and three-dimensional analyses. En: Chan-Palay V, Kolher Ch, (editores). *The hippocampus-new vistas*, USA: Alan R. Liss, 1989.

- 27.- Harris KM, Stevens JK. Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 1998; 9: 2982-97.
- 28- Harrison. *Principios de Medicina Interna*. 16th ed. McGraw-Hill, 2006: Capítulo 338.
- 29.- Heijer T, Vermeer SF, Dijk EJ. Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI. *Diabetologia* 2003; 46:1604-1610.
- 30.- Hugues Hernandorena B, Rodríguez González JC, Rodríguez García JC. Animales de laboratorio en la endocrinología biomodelos de la diabetes mellitus tipo 1. *Rev Cubana Endocrinol* 2001; 12: 168-77.
- 31.- Joseph R. Environmental influences on neural plasticity, the limbic system, emotional development and attachment: a review. *Child Psychiatry Hum Dev* 1999;29: 189-208.
- 32.- Kaldel ER, Hawkins RD. The biological basic of learning and individuality. *Sci Am* 1992; 267: 78-86.
- 33.- Kaler SR, Freeman BJ. Analysis of environmental deprivation: cognitive and social development in Romanian orphans. *J Child Psychiatry* 1994;35: 769-781.
- 34.- Kamal A, Biessels GJ, Dois SE and Ginpen WH. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats; interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia* 2000;43: 500-506.
- 35.- Kessels RPC, De Haan EHF, Kappelle LJ Y Postma A. Varieties of Human Spatial Memory a Meta-analysis on the Effects of Hippocampal Lesions. *Brain Research Reviews* 2001;35:295-303.
- 36.- Kolb B, Forgie M, Gibb R, Gorny G, Rowntree S. Age experience and the changing brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 22:143-159.
- 37.- Larson F, Winblad B, Mohammed AH. Physiological stress and environmental adaptation in enriched vs impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73: 193-207.
- 38.- Lazic SE, Grote HE, Blakemore C., Hannan AL, van Dellen A, Phillips W, Barker RA. Neurogenesis in the R6 /1 transgenic mouse model of Huntington`s disease: effects of environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 2006; 23:1829-1838.
- 39.- Lee KJ, Kim H, Rhyu IJ. The roles of dendritic spine shapes in Purkinje cells. *The Cerebellum* 2005; 4:97-104.
- 40.- Li Z, Zhang W and Sima A A. The role of impaired insulin/IGF action in primary diabetic encephalopathy *Brain Res* 2005; 1037: 12-24.

- 41.- Lin Y, Feng W, Rui-Hua Y. Diabetes impairs learning performance and affects the mitochondrial function of hippocampal pyramidal neurons. *Brain Research* 2011; 1411:57-64.
- 42.- Loeken MR. Advances in understanding the molecular causes of diabetes-induced birth defects. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13: 2-10.
- 43.- Lothman E.W, Bertram EH, Stringer JL. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog Neurobiol* 1991; 37:1- 82.
- 44.- Malone JI, Hanna S, Saporta S. Hyperglycemic brain injury in the rat. *Brain Research* 2006; 1076: 9-15.
- 45.- Malone JI, Hanna S, Saporta S y col. Hyperglycemia not hypoglycemia alters neuronal dendrites and impairs spatial memory. *Pediatric Diabetes* 2008; 9:531-539.
- 46.- Martínez Téllez R. Gómez Villalobos MJ. Gonzalo Flores. Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Research* 2005; 1048: 108-115.
- 47.- McCall A, Fiegler D: How does diabetes mellitus produce brain dysfunction? *Diabetes Spectrum* 1997;10: 25-31.
- 48.- Miller M y Peter A. Maturation of rat visual cortex I A quantitative study of Golgi-impregnated pyramidal neurons. *J Neurocytol* 1981a; 10: 859-878.
- 49.- Morgane PJ, La France RA, Bronzino J y col. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 91-128
- 50.- Muller D, Toni N, Buchs PA. Spine changes associated with long-term potentiation. *Hippocampus* 2000; 10: 596-604.
- 51.- Muller RU, Stead M, Pach J. The hippocampus as a cognitive graph. *J Gen Physiol* 1996; 107: 663-94.
- 52.- Musen G, Lyoo IK, Sparks CR y col. Effects of type 1 diabetes on gray matter density as measured by voxel-based morphometry. *Diabetes* 2006; 55: 326-333.
- 53.- Nelson CA, Wewerka SS, Borscheid AJ, deRegnier RA and Georgieff MK. Electrophysiologic evidence of impaired cross-modal recognition memory in 8-month-old infants of diabetic mothers. *The Journal of Pediatric* 2003; 142: 575-82.
- 54.- Nelson CA, Wewerka S, Thomas KM y col. Neurocognitive sequelae of infants of diabetic mothers. *Behavioral Neuroscience* 2000; 114: 950-956.
- 55.-, Northam EA, Rankins D, Lin A y col. Central nervous system function in youth with type 1 diabetes 12 years after disease onset. *Diabetes Care* 2009; 32:445-450.

- 56.- O'keefe J, Nadel L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Oxford U.P. 1978.
- 57.- Palomino-Garibay MA, Revilla-Monsalve MA, Cárdenas-Sánchez A. Efecto de la diabetes inducida sobre la reproducción y el desarrollo. Ginecol Obstet Méx 1998; 66: 403-6.
- 58.- Paxinos G and Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic coordinates. Ed. ELSEVIER. Compact Sixth edition 2009.
- 59.- Peng S, Zhou X, Li Q y col. Online three-dimensional dendritic spines morphological classification based on semi-supervised learning. Proc IEEE Int Symp Biomed Imaging 2009; 28: 1019-1022.
- 60.- Peña Valdés A. Guías de diagnóstico y tratamiento en neonatología En: Capítulo 15, 2006: 1-5.
- 61.- Permutt MA, Wasson J & Cox N. Genetic epidemiology of diabetes. J. Clin Invest 2005; 115: 1431-1439.
- 62.-Pérez-Vega MI, Feria-Velasco A, González-Burgos I. Prefrontocortical serotonin depletion results in plastic changes of prefrontocortical neurons underlying a greater efficiency of short-term memory. Brain Res Bull 2000; 53:291-300.
- 63.- Pokorny J, Yamamoto T. Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborization in pyramidal neurons. Brain Res Bull 1981; 7: 113-20.
- 64.- Polanco A. Efecto de la diabetes inducida sobre la gestación y el desarrollo de las crías de ratas. Tesis, UNAM, México, 2001.
- 65.- Polanco Ponce AC., Revilla Monsalve MC, Palomino Gariba MA, Islas Andrade SA. Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas. Ginecol Obstet Méx 2005; 73: 544-522.
- 66.- Popovic M, Biessels GJ, Isaacson RL, Gispen WH. Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial /Object discrimination task. Behavioral Brain Research 2001; 122: 201-7.
- 67.- Pridjian Gabriella MD. Pregestational Diabetes. Obstet Gynecol Clin N Am 2010; 37: 143-158.
- 68.- Ramos Rodríguez HG, Domingo Méndez J. Diabetes mellitus experimental. Ciencia Veterinaria 1994; 6: 347-377.
- 69.- Rihn LL, Clairbone BJ. Dendritic growth and regression in rat dentate granule cells during late postnatal development. Brain Res Dev Brain Res 1990; 54:115-24.

- 70.- Sala Carlo. Molecular regulation of dendritic spine shape and function. *Neurosignals* 2002; 11:213-223.
- 71.- Salas Manuel y Viesca Treviño Lourdes. Aspectos Comparativos y Mecanismos de Regulación de la Ontogenia Neural. U.N.A.M. 1991 México D.F. pp 346.
- 72.- Salazar García M. Evaluación del efecto teratogénico de la diabetes inducida en ratas sobre el desarrollo facial y de las extremidades. Tesis, IPN, México, 2010.
- 73.- Scharfman HE. The CA3 "Backproyection" to the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 2007; 163: 627-637.
- 74.- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH. Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity specific enhancement in GLUT2 – Expressing cells. *Diabetes* 1994; 43: 1326-1333.
- 75.- Schwarting RKW, Fornaguera J, Huston JP. Automated video image analysis of behavioral asymmetries in motor activity and movement disorders. Humana Press, Totowa, NJ, USA 1996;141-174.
- 76.- Shatz J.C. Desarrollo cerebral. *Investigación y Ciencia*1992;194:16-25.
- 77.- Shephred G.M. The synaptic organization of the brain. Shephred (Ed), Oxford University Press, 1990,561
- 78.- Silverman BL, Rizzo T, Green CC. Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. *DIABETES* 1991; 40: 121-125.
- 79.- Sima AAF, Zhang W, Muzik O y col. Secuencial abnormalities in type 1 diabetic of the effects of peptide C. *The Review of Diabetic Studies* 2009; 6: 211-222.
- 80.- Sorra KE, and Harris KM. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *HIPPOCAMPUS* 2000; 10:501-511.
- 81.- Squire LR. Memory systems of the brain a brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory* 2004;82: 171-177.
- 82.- Suzuki T, Nishimura Y y Tonoue T. Three-dimensional trajectories of the hippocampal rhythmic slow activity in the behaving rat. *Behav Brain Res* 1991; 44:35-41.
- 83.- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50: 536-546.
- 84.- Takeda T, Uchihara T, Mochizuki Y, Mizutani T, Iwata M. Memory deficits in amyotrophic lateral sclerosis patients with dementia and degeneration of the perforant pathway A clinic pathological study. *J Neurol Sci* 2007; 15; 260 (1-2): 225-30.

- 85.- Tierney, LM, McPhee SJ, Papadakis MA. Current medical diagnosis and treatment. 4th ed. New York: Mc Graw-Hill International. 2002.
- 86.- Torres González C, Hernández Barrios E, Moreno Torres J y col. Diabetes gestacional versus diabetes pregestacional. Resultados perinatales. Medisur 2004; 2(3): 22-26.
- 87.- Thompson RF. Fundamentos de psicología fisiológica. 3th Ed. Trillas México 1984.
- 88.- Triana Mantilla ME. La hiperglucemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía. Rev Cubana Angiol y Cir. Vac. 2001; 2(2):131-41.
- 89.- Wei M, Ong L, Smith MT y col. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. Heart Lung Circ 2003; 12: 44-50.
- 90.- Whishaw IQ, Gharbawie AO, Clark BJ, Lehmann CH. The exploratory behavior of rats in an open environment optimizes security. Behavioral Brain Research 2006; 171: 230-239.
- 91.- Widman DR, Rosellini RA. Restricted daily exposure to environmental enrichment increase the diversity of exploration. Physiol Behav 1990; 47: 57-62.
- 92.- Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment physical exercise or formal training (1990-2002) Prog Neurobiol 2004;72:167-182.
- 93.- Winters BD Dunnett SB. Selective lesioning of the cholinergic septo-hippocampal pathway does not disrupt spatial short-term memory: a comparison with the effects of frimbria-fornix lesions. Behav Neurosci 2004; 118: 546-62.
- 94.- World Health Organization, (2003). Screening for type 2 Diabetes. Report of a World Health Organization and International Diabetes Federation meeting (No. de publicación WHO/NMH/MNC/03.1). Geneva Switzerland: Publication of the World Health Organization.
- 95.- Wu M, Shanabrough M, Leranth C., Alreja M. Cholinergic excitation of septohippocampal GABA but not cholinergic neurons: implications for learning and memory. J Neurosci 2000; 15; 20 (10): 3900-3906.
- 96.- Xu C, Datta S, Wu, M, Alreja M (Hippocampal theta rhythm is reduced by suppression of the H-current in septohippocampal GABAergic neurons. Eur J Neurosci 2004; 19; (8):2299-309

9. ANEXO 1

Preparación de soluciones:

1.1 Azul de toluidina 0.5%

Azul de toluidina.....0.5 g
Tetraborato de sodio.....0.4 g
Agua destilada.....100 ml

Disolver el tetraborato de sodio en agua caliente 50°C y agregar el colorante azul de toluidina. Dejar enfriar y filtrar.

1.2 Solución de Poly L lisina 5%

Poly L lisina0.5%
Agua bidestilada..... 100 ml

1.3 Solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1x)

Cloruro de sodio.....4.5 g
Fosfato de sodio dibásico25.54 g
Fosfato de sodio monobásico.....5.52 g
Agua destilada c.b.p.....1000 ml
Ajustar pH 7.2

1.4 Solución buffer de acetato de sodio 0.1M pH 4.3

Agua desionizada10 ml
Acetato de sodio0.1361 g
Ajustar el pH a 4.3 para mantener estable la actividad de la STZ enfriar

1.5 Solución de Estreptozotocina

Buffer de acetato de sodio.....5 ml
Estreptozotocina.....0.25 g

Mantener en congelación (alícuotas)

1.6 Solución de impregnación A + B

La solución A y B contienen cloruro de mercurio, dicromato de potasio y cromato de potasio. La solución de impregnación se preparó en una mezcla de partes iguales 1:1 de A y B. Mantener bien cerrada y protegida de la luz.

1.7 Solución C (Nitrato de plata 0.75%)

1.8 Solución Reveladora (Formaldehído)

Solución D----- 1 parte

Solución E----- 1 parte Mezclar 1:1:2

Agua destilada----- 2 partes

Mantener cerrado y protegida de la luz

ANEXO 2

2.1 Tarjetón de registro individual utilizado para las ratas.

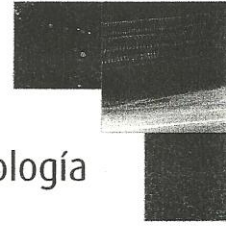
TARJETON DE IDENTIFICACIÓN		
LAB:		
RESPONSABLE:		
RATA No.		FECHA:
CEPA:	SEXO:	EDAD:
INICIO DE TRATAMIENTO:		
DIA 1:		
DIA 2:		
DIA 3:		
DIA 4:		

2.2 Bitácora de registro del control metabólico y peso corporal de ratas gestantes durante fase experimental.

1.9 Registro de peso corporal y control metabólico de ratas gestantes.							
GRUPO:			RATA No.				
Inicio de gestación	Día	Fecha	Peso corporal 2/semana	Glucemia 1/semana	Glucosuria 1/semana	Cetonuria 1/ semana	HbA1c/Final gestación
	1						
	2						
	3						
Inicio de tratamiento	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
	9						
	10						
	∫						
	23						

2.3 Bitácora de registro postnatal del control metabólico y peso corporal de crías descendientes de madres diabéticas y control.

Registro de datos de crías					
GRUPO:			RATA No.		Total de crías:
No. de crías vivas:			No. De crías muertas:		
FECHA:	DIA	PESO CORPORAL	Glucemia	Glucosuria	Cetonuria
	0				
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				
	7				
	8				
	9				
	10				
	etc.				



XXXIV Congreso Nacional de Histología
México, D.F. Octubre 26-28, 2011

La Sociedad Mexicana de Histología, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA

a: Marcela Salazar García, M. González Mora,
R.M Romero Velázquez, Maricela Sánchez Contreras,
C. Revilla Monsalve y Concepción Sánchez Gómez

Por su participación en el trabajo de cartel:
*"La hiperglucemia materna disminuye en la progenie la densidad
de excresencias espinosas en neuronas hipocampales."*

Facultad de Medicina, UNAM
México, D.F.



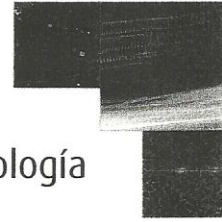
Facultad de Medicina



Dr. Guillermo Laguna Hernández
Presidente SMH



XXXIV Congreso Nacional de Histología
México, D.F. Octubre 26-28, 2011



La Sociedad Mexicana de Histología, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA

Como **3^{er.}** Lugar



Facultad de Medicina



Al trabajo de cartel: *"La hiperglucemia materna disminuye en la progenie la densidad de excresencias espinosas en neuronas hipocampales."*

Autores: *Marcela Salazar García, González Mora M., Romero Velázquez R.M., Maricela Sánchez Contreras, Revilla Monsalve C., Concepción Sánchez Gómez.*

Facultad de Medicina, UNAM
México, D.F.

Dr. Guillermo Laguna Hernández
Presidente SMH