

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



EFECTO DELETÉREO DE LA DIABETES MATERNA INDUCIDA SOBRE LA MEMORIA ESPACIAL DE CRÍAS PRE-PÚBERES SOMETIDAS A LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

Tesis

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Erick Carreño Vázquez

Asesor de Tesis

Dra. Marcela Salazar García



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



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.

#### JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:Profesor: Ignacio Camacho ArroyoVOCAL:Profesor: Krutzkaya Juárez ReyesSECRETARIO:Profesor: Marcela Salazar García.1er. SUPLENTE:Profesor: Ignacio González Sánchez2° SUPLENTE:Profesor: Miguel Ángel Peña Ortiz

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y TERATOGÉNESIS EXPERIMENTAL DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ, Y FORMA PARTE DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN HIM **2016 037** 

ASESOR DEL TEMA:

Dra. En C. Marcela Salazar García \_\_\_\_\_

SUSTENTANTE (S):

Erick Carreño Vázquez

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS.	
ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS.	
RESUMEN.	
Abstract.	
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Diabetes mellitus.	1
1.1.1. Epidemiología.	1
1.1.2. Clasificación.	2
1.1.3. Alteraciones en el desarrollo del Sistema Nervioso Central.	4
1.1.4. Posibles mecanismos implicados en las alteraciones neurocognitivas.	4
1.2. Formación hipocampal.	6
1.3. Sinapsis.	11
1.4. Memoria y aprendizaje.	12
1.4.1. Alteraciones en el aprendizaje y memoria en hijos de madre diabética.	13
1.5. Modelos animales de diabetes inducida.	15
1.6. Prueba conductual LAM.	17
<ol> <li>Alteraciones en el aprendizaje y memoria en crías de ratas diabéticas.</li> </ol>	18
2. Justificación.	21
3. Hipótesis.	22
4. Objetivo.	

4.1.	Objetivos particulares.	22	
<b>5. Procedimiento Experimental.</b> 23			
5.1.	Esquema experimental.	23	
5.2.	Obtención de ratas gestantes.	25	
5.3.	Asignación de grupos.	25	
5.4.	Obtención de crías.	26	
5.5.	Laberinto acuático de Morris (LAM).	26	
5.6.	Análisis morfométrico del cerebro.	28	
5.7.	Plan de análisis estadístico	29	
6. Resultados. 30			
6.1.	Monitoreo materno.	30	
6.2.	Monitoreo de crías.	32	
6.3.	Prueba conductual LAM.	34	
6.4.	Morfometría de cerebro e hipocampo en crías prepúberes.	36	
6.4.1.	Plasticidad neuronal hipocampal en crías prepúberes.	39	
6.4.2.	Resultados del conteo de Espinas Dendríticas.	41	
7. Discusión. 4			
<b>8. Conclusiones.</b> 56			
<b>9. Anexos.</b> 57			
9.1.	Soluciones	57	
9.2.	Formatos	59	
10.Referencias			

П

# Lista de abreviaturas y siglas.

1ra R-DA. Primera ramificación de la dendrita apical.

ADA. Asociación Americana de Diabetes.

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

ALO. Aloxano

AMPA. Ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazoleprooionico.

CA. Cuerno de Amón.

CI. Coeficiente intelectual.

CRC. Cría de rata control.

CRD. Cría de rata diabética.

GD. Giro dentado.

DM. Diabetes mellitus.

DMG. Diabetes mellitus gestacional.

DMPG. Diabetes mellitus pregestacional.

ED. Espinas dendríticas.

FID. Federación Internacional de Diabetes.

g. Gramos.

HbA1c. Hemoglobina glucosilada fracción 1Ac

HMD. Hijo de madre diabética.

IGF-1. Factor de crecimiento similar a la insulina.

IGF-1R. Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina.

LAM. Laberinto Acuático de Morris.

mg/dL. Miligramos sobre decilitro.

NAD. Nicotinamida adenina dinucleótido.

NADP. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NMDA.N-metil-D-aspartato.

RC. Rata control.

RD. Rata diabética

USD. Dólar Americano.

SD. Sprague-Dawley.

SNC. Sistema nervioso central.

SP-DA. Segmento proximal de la dendrita apical

STZ. Estreptozotocina.

# Índice de figuras, tablas y gráficas

Figura 1	Fotomicrografías de hipocampo de humano.	
Figura 2	Hipocampo humano y rata.	8
Figura 3	Neuronas piramidales de CA3.	
Figura 4	Espinas dendríticas.	10
Figura 5	Esquema representativo de sinapsis glutamatérgica.	12
Figura 6	Estructura química de Estreptozotocina y Aloxano.	16
Figura 7	Esquema de las partes que conforman el laberinto acuático de Morris.	18
Figura 8	Esquema real del LAM utilizado en el estudio conductual.	27
Figura 9	Fotomicrografía de cerebro de cría prepúber control	28
Figura 10	Fotografía de neurona piramidal de CA3 de hipocampo de rata.	29
Figura 11	Fotografía de corte coronal de cerebro de rata P42.	41
Figura 12	Fotografías de neuronas piramidales de CA3.	43
Figura 13	Fotografías de la primera ramificación de la dendrita apical.	44
Figura 14	Fotografías del SP-DA de neuronas piramidales de CA3.	45
Tabla 1	Malformaciones congénitas asociadas a la diabetes materna.	4
Gráfica 1.	Comparativo de peso entre las ratas gestantes.	30
Gráfica 2	Monitoreo de glucemia materna	31

Gráfica 3	Concentraciones de HbA1c materna.	
Gráfica 4	Comparativo de peso entre las crías de CRD y CRC.	
Gráfica 5	Glucemia de crías de ambos grupos desde el nacimiento hasta el día P42.	
Gráfica 6	Latencia promedio de escape para encontrar la plataforma en cada punto de salida.	
Gráfica 7	Latencia en los 5 días de la fase de aprendizaje.	
Gráfica 8	Comparativo estancia en los cuatro cuadrantes	
Gráfica 9	Peso del cerebro de las crías en el día de sacrificio.	37
Gráfica 10	Comparativo de las medidas del cerebro de las crías al día de sacrificio.	38
Gráfica 11	Comparativo de las medidas de los ejes del hipocampo en cortes coronales de cerebro.	39
Gráfica 12	Conteo promedio de espinas en la primera ramificación de la dendrita apical de las neuronas piramidales de CA3.	43
Gráfica 13	Conteo promedio de espinas den la región proximal (RP) de la dendrita apical de las neuronas piramidales de CA3.	45
Gráfica 14	Densidad total promedio de las espinas de las neuronas piramidales de CA3.	46
Gráfica 15	Conteo promedio de las espinas largas de las neuronas piramidales de CA3.	47
Gráfica 16	Conteo promedio de las espinas Hongo de las neuronas piramidales de CA3.	47
Gráfica 17	Conteo promedio de las espinas Cortas de las neuronas piramidales de CA3.	48
Gráfica 18	Conteo promedio de otras espinas de las neuronas piramidales de CA3.	48

VI

#### Resumen.

Antecedentes: En el humano, las deficiencias en la ejecución de tareas de memoria observadas en hijos de madres con diabetes pregestacional y gestacional han proporcionado conclusiones contradictorias; sin embargo, en estos niños se ha observado un desempeño menor en aspectos relacionados con el aprendizaje como falta de atención e hiperactividad. Estudios in vivo con modelos animales son la opción ideal para evaluar si la diabetes durante la gestación afecta el desarrollo neurocognitivo de la progenie, mientras que las pruebas conductuales aplicadas en estos modelos sirven para evaluar el comportamiento que refleja el estado de salud cerebral. Una prueba de elección es el laberinto acuático de Morris (LAM) la cual refleja la complejidad de la navegación espacial y muestra cómo los animales se orientan eficientemente en el espacio. El hipocampo es una estructura clave para el aprendizaje asociativo y memoria de tipo episódico. Presenta cambios plásticos funcionales y estructurales manifestados como espinas dendríticas (ED) en respuesta a estímulos constantes, demandas ambientales, al aprendizaje y memoria de tareas específicas. El tipo de espinas, con base en su forma se clasifican en cortas, largas y hongo, las últimas 2 se han relacionado con una mayor efectividad sináptica. Justificación. La importancia a nivel mundial de la diabetes mellitus durante el embarazo, aunado a la escasa información de las deficiencias cognitivas de sus hijos, brinda relevancia a la investigación planteada en la presente tesis. Objetivo: Analizar el efecto deletéreo de la diabetes materna inducida sobre la memoria espacial y plasticidad neuronal hipocampal de crías prepúberes sometidas a LAM. Hipótesis. Al inducir con estreptozotocina un estado intrauterino hiperglucémico en las ratas gestantes se generarán efectos nocivos para el desarrollo de las crías, provocando que presenten un déficit de memoria espacial evidenciado por la prueba LAM y confirmado por la disminución de ED. Metodología: Aleatoriamente se utilizaron 48 crías de 30 días de nacidas (P30) obtenidas de ratas con diabetes inducida con estreptozotocina (CRD) y ratas sin diabetes (CRC). Se les monitoreó peso y glucemia a ambos grupos. Las crías CRC y CRD se sometieron al LAM para evaluar el aprendizaje y memoria espacial donde fueron sometidas a cinco sesiones con 8 ensayos cada una. La latencia de llegada a la plataforma de escape se usó como una medida de adquisición de la información. En el día 41 (crías pre-púberes) se les aplicó la prueba de memoria para evaluar la consolidación de la información (recuperación de la información). Posteriormente se obtuvieron los cerebros, registrando su tamaño y peso y se procesaron con el Kit de Golgi Cox rápido. Se seleccionaron seis cortes continuos de cada cerebro identificando el hipocampo dorsal y se fotografiaron. En cada corte se midieron los ejes del hipocampo. Se localizó el campo CA3 y se seleccionarán 6 neuronas piramidales, se contabilizaron la cantidad y forma de espinas en 25 micras de la sección proximal de la dendrita apical y de su 1ra ramificación. Análisis estadístico: Los cambios en peso y glucemia en ratas gestantes y crías sometidas a las pruebas conductuales fueron evaluadas mediante la prueba paramétrica de t de Student. Para el aprendizaje en la prueba de LAM se empleó ANOVA de medidas repetidas y ANOVA factorial para comparar el desempeño entre los grupos, utilizando siempre el análisis post hoc de Scheffe.Se analizaron con el programa estadístico SPSS versión 16. Resultados. Las CRD tuvieron menor peso cerebral, tardaron más tiempo en aprender la tarea espacial, presentaron un déficit en la memoria espacial y menor cantidad de espinas dendríticas comparado con las CRC. **Conclusiones.** La hiperglucemia durante la gestación alteró en crías prepúberes la estructura cerebral y la plasticidad neuronal del hipocampo, afectando las habilidades cognitivas de la descendencia.

#### Abstratc.

Background: In humans, deficiencies in the performance of memory tasks observed in children of mothers with pre-gestational diabetes and gestational have provided conflicting conclusions; however, in these children it has been observed underperform in aspects related to learning as inattention and hyperactivity. In vivo studies with animal models they are ideal for evaluating whether diabetes during pregnancy affects neurocognitive development of progeny option, while the behavioral tests used in these serve to evaluate the behavior that reflects the state of brain health. A test of choice is the Morris water maze (LAM) which reflects the complexity of spatial navigation, showing how animals are oriented efficiently in space The hippocampus is a key structure in associative learning and for memory consolidation episodic type. This presents plastic changes: functional and structural (dendritic spines) in response to constant stimuli, environmental demands, learning and memory of specific tasks. The type of spines, based on their shape are classified as short, long and fungus, the latter 2 have been linked to greater synaptic effectiveness. Justification. The global importance of the DM during pregnancy, coupled with the limited information of the cognitive deficits of their children, gives relevance to the research proposed in this thesis. **Objective**: Analyze the deleterious effect of induced maternal diabetes on spatial memory and hippocampal neuronal plasticity of prepubertal pups submitted to LAM. Hypothesis. By inducing streptozotocin hyperglycemic intrauterine state in pregnant rats adverse effects on development of the offspring will be generated, causing presenting a spatial memory deficits evidenced by the Morris water maze test and confirmed by the reduction of dendritic spines. Methodology: We randomly used 48 offspring of 30 days old (P30) obtained from rats with streptozotocin-induced diabetes (CRD) and rats without diabetes (CRC). Weight and glycemia were monitored in both groups. CRC and CRD pups were submitted to LAM to evaluate learning and spatial memory where they were submitted to five sessions with 8 trials each. The arrival latency to the escape platform was used as a measure of information acquisition. On day 41 (prepubescent pups) the memory test was applied to assess the consolidation of the information (information retrieval). Later the brains were obtained, recording their size and weight and processed with the fast Golgi Cox Kit. Six continuous sections of each brain were identified identifying the dorsal hippocampus and were photographed. In each section the hippocampal axes were measured. The CA3 field was located and 6 pyramidal neurons were selected, counting the amount and shape of spines in 25 microns of the proximal section of the apical dendrite and its 1st branch. Statistical analysis: Changes in weight and glycemia in pregnant rats and offspring subjected to behavioral tests were evaluated using the Student t parametric test. For the LAM test, repeated measures ANOVA and factorial ANOVA were used to compare performance between groups, using Scheffe's post hoc analysis. They were analyzed using the statistical program SPSS version 16. **Results.** CRDs had lower brain weights, took longer to learn the space task, had a long-term memory deficit and fewer dendritic spines compared to CRCs. Conclusions. Hyperglycemia during pregnancy altered the brain structure and hippocampal neuronal plasticity in prepubertal offspring, affecting the cognitive abilities of offspring.

#### 1. Introducción

#### 1.1. Diabetes Mellitus.

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA)<sup>1</sup>, la Diabetes Mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, debida a defectos en la secreción y/o acción de la insulina. Presenta grados variables de predisposición hereditaria, con participación de factores ambientales. La hiperglucemia crónica está asociada con daño a largo plazo, disfunción y falla en diferentes órganos, especialmente en ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Los síntomas clásicos de diabetes son: poliuria (muchas ganas de orinar), polidipsia (excesiva sed), polifagia (excesiva hambre), además de pérdida de peso y visión borrosa<sup>2</sup>.

#### 1.1.1. Epidemiología.

La DM es la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo, se calcula que afecta a 387 millones de personas principalmente concentrada en los países con menores ingresos. La Federación internacional de diabetes (FID) predice que en 2035 aumentará a 592 millones de afectados, convirtiéndose en la 7<sup>a</sup> causa de muerte en el mundo<sup>3</sup>.

La prevalencia de DM en todo el mundo ha aumentado de forma constante durante los últimos 30 años, pasando de 8,3% en los hombres y 7,5% en mujeres en 1980 a 9,8% en hombres y el 9,2% en las mujeres para el año 2008 y en 2014 la prevalencia total fue de 8.3 %.

México está a la vanguardia de la epidemia de DM, pues cuenta con una de las más altas tasas de obesidad y sobrepeso en el mundo (71,2%). La prevalencia de diabetes en México alcanzó el 14,4% en 2006 con casi la mitad de los casos no diagnosticados (7,07%). La prevalencia de la diabetes diagnosticada se ha aumentado de 7,34% en 2006 al 9,17% en 2012.<sup>4</sup> El control de la diabetes en México es deficiente, sólo el 5,3% de los pacientes tienen un control adecuado, 38%poseen control deficiente y el 56% es muy deficiente. Los costos medios anuales por paciente con DM en México se han estimado en el rango de \$ 700-3200 USD. Los costos directos de la DM en México a \$ 717,764,787 USD para pacientes externos y \$ 223,581,099 USD para la atención hospitalaria, más \$177.220.390 USD de los costos indirectos, sin tener en cuenta los costos relacionados con complicaciones<sup>4</sup>.

## 1.1.2. Clasificación.

Según la Asociación Americana de Diabetes la DM se clasifica en 4 tipos:

# 1.1.2.1. Diabetes Mellitus tipo 1 (DM T1):

A este tipo de diabetes se le conoce por ser autoinmune, ya que existe destrucción de células beta del páncreas, evidenciado por presencia de anticuerpos contra las células que conforman los islotes pancreáticos, provocando deficiencia absoluta de insulina. En este tipo de diabetes los pacientes presentan abruptamente la sintomatología asociada a la enfermedad.

# 1.1.2.2. Diabetes Mellitus tipo 2(DM T2):

La diabetes tipo 2 presenta resistencia a la insulina y/o deficiencia relativa en su producción. La edad de diagnóstico generalmente es mayor a los 30 años, no obstante se ha presentado en edad adolescente. Este tipo de diabetes se caracteriza por aumento de la glucosa en sangre y alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas<sup>1</sup>.

# 1.1.2.3. Otros tipos específicos de DM.

Además de los tipos de DM anteriormente mencionado existen otros tipos de DM que presentan etiología propia y son menormente comunes alrededor del mundo. Algunos ejemplos son:

- Defectos genéticos de las células β que se caracterizan por la aparición de hiperglucemia en edades tempranas (antes de los 25 años) y por la alteración de la secreción y acción de la insulina (MODY).
- Defectos genéticos en la acción de la insulina, es un caso raro de diabetes en la que existen mutaciones en el receptor de insulina provocando insulinemia y una modesta hiperglucemia.
- Enfermedades del páncreas exócrino. Cualquier proceso que cause algún tipo de daño al páncreas puede provocar diabetes, estas pueden ser pancreatitis, pancreatectomía y carcinoma pancreático.
- Pancreopatías. Enfermedades como acromegalia, Síndrome de Cushing, Glucagonoma, Feocromocitoma, cursan con un exceso de hormona del crecimiento, cortisól, glucagon, epinefrina respectivamente. Dichas hormonas antagonizan la acción de la insulina y pueden causar diabetes.
- Infecciones. Algunas infecciones virales son asociadas con la destrucción de las células β, algunos ejemplos son Rubeola congénita, citomegalovirus, coxakivirus B y adenovirus<sup>1</sup>.

#### 1.1.2.4. Diabetes Gestacional.

Las mujeres que cursan con DM durante su embarazo enfrentan cambios metabólicos asociados a su condición fisiológica y según la calidad de vida de cada país esta afección materna se presenta del 1 al 14% de todos los embarazos.

La diabetes materna es el resultado de cualquiera de estas 2 modalidades:

## 1.1.2.4.1. DM Pregestacional (DMPG).

Es la diabetes preexistente en una mujer antes de resultar embarazada. De los casos de DMPG, el 60% tienen DM T2 existente antes del embarazo, mientras que el 40% tiene un diagnóstico de DM T1.

Durante todo el periodo gestacional los niveles de glucemia son elevados, lo que ocasiona alteraciones en los procesos de implantación y organogénesis. Los principales sistemas afectados son el cardiovascular, renal, musculo-esquelético y sistema nervioso central.<sup>1, 5</sup> Por lo anterior la DMPG es considerada como la de mayor riesgo para presentar malformaciones congénitas y abortos espontáneos (4 a 10 veces más que en un embarazo no diabético). Ver tabla 1.

## 1.1.2.4.2. DM gestacional (DMG).

Se manifiesta entre la mitad del embarazo y el inicio del último trimestre. La mujer gestante desarrolla resistencia a la insulina y posterior hiperglucemia. Representa el 90% de los casos de diabetes materna. A diferencia de la DMPG, la hiperglucemia no interfiere en etapas tempranas de desarrollo, pero compromete el desarrollo fetal, una de estas afecciones es la macrosomía.<sup>1,6</sup>

En las dos modalidades de presentación existe una correlación entre la concentración de glucosa en sangre en mujeres embarazadas con la hiperglucemia que cursa el embrión o feto durante su estancia intrauterina.<sup>5,7</sup>

Sistema nervioso central (SNC)	Sistema Cardiovascular (SCV)	Estructuras Cráneo-faciales
Anencefalia	Corazón hipoplásico	Microsomía hemifacial
Acrania	Atresia tricúspide y mitral	Microtia
Mielomeningocele	Doble entrada del ventrículo izquierdo	Micrognátia
Microcefalia	Doble salida del ventrículo der	Microftálmia
Holoprocencefalia	Transposición de grandes arterias	Displasia nasal frontal
Espina bífida	Tretalogía de Fallot	
Arrinencefalia		

Tabla 1. Malformaciones congénitas asociadas a diabetes materna<sup>5</sup>.

#### 1.1.3. Alteraciones en el desarrollo del Sistema Nervioso Central

Además de los defectos morfológicos gruesos como son las malformaciones congénitas, existen evidencias que sugieren que la DM durante la gestación provoca alteraciones funcionales en diferentes estructuras entre las que destacan el SNC. Algunas de ellas sugieren que la diabetes materna provoca alteraciones en el desarrollo cognitivo de los Hijos de Madre Diabética<sup>8</sup> y que comienzan a manifestarse durante la primera infancia. También se han reportado reducción del tamaño del hipocampo y anormalidades funcionales y estructurales, ya que es fundamental en los procesos aprendizaje y la consolidación de la información adquirida<sup>9</sup>.

# 1.1.4. Posibles mecanismos implicados en las alteraciones neurocognitivas

Muchos de los efectos sobre el desarrollo de los embarazos diabéticos en el embrión o feto se pueden atribuir al control de la glucemia materna, pues la elevada concentración de glucosa que atraviesa la barrera placentaria, causa defectos estructurales y funcionales en el desarrollo del SNC.

Hasta el momento, los mecanismos exactos por los que la DM en el embarazo alteran el desarrollo embrio-fetal no se entienden por completo y no existe un mecanismo teratogénico distinto que se haya identificado para explicar claramente una razón para esta gama de alteraciones observadas en diferentes estructuras, que componen el SNC<sup>5,7,10</sup>. Entre estos mecanismos se han propuesto los siguientes:

# 1.1.4.1. Policitemia fetal:

Es probablemente provocada por la hiperglucemia y la hiperinsulinemia crónicas en el útero. Una de las explicaciones para esta patología es que en el útero con hiperglucemia crónica, genera un estado hipermetabólico en el desarrollo del feto, lo que desemboca en hipoxia tisular relativa, derivando en policitemia por exceso de producción de eritropoyetina<sup>10</sup>.

# 1.1.4.2. Eritropoyetina fetal:

Las elevadas concentraciones de esta proteína en el plasma sugieren el incremento en la prevalencia de hipoxia durante el desarrollo. La hipoxia afecta el desarrollo del SNC, incluyendo alteraciones en la mielinización, cambios en la conectividad cortical, excitotoxicidad, y muerte neuronal. En este estado de hipoxia, hay un exceso de eritropoyetina y hemoglobina. Por lo tanto, el feto en desarrollo necesita hierro, y para esto, se moviliza el hierro de los tejidos vitales incluyendo el cerebro. Se ha encontrado que los HMD poseen un 40% menos de hierro en el cerebro comparados con hijos de madres normales. El hierro es un componente clave para la síntesis de enzimas involucradas en reacciones de óxido-reducción, replicación neuronal, síntesis catabolismo de y neurotransmisores y producción de mielina<sup>10</sup>.

# 1.1.4.3. Estrés oxidativo:

Juega un papel clave en el desarrollo embrionario, porque se ve implicado en la patogénesis de diversos problemas en el neurodesarrollo observados en los HMD. Los radicales libres pueden inactivar funciones biológicas de proteínas y lípidos, lo que puede desencadenar en muerte celular. Se mostró que el DM se asocia con un aumento de la concentración de estrés oxidante, esto se debe tanto a defectos en las defensas de los antioxidantes como a la sobreproducción de radicales libres<sup>10</sup>.

# 1.1.4.4. Insulina y el factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1):

Ejercen un profundo efecto en el desarrollo y función del SNC, incluyendo la proliferación, diferenciación, supervivencia, sinaptogénesis, longevidad y neurorregeneración celular de neuronas/glía. Estas funciones biológicas son

mediadas por sus receptores: el receptor de insulina (IR) y el receptor de IGF-1 (IGF-1R). Diversos estudios con hibridación in situ en animales y humanos, han encontrado que estos dos receptores se expresan en el hipocampo, corteza cerebral, bulbo olfatorio, cerebelo e hipotálamo y que los defectos en estos receptores y sus vías de señalización alteran el desarrollo del SNC que pueden estar implicados en el déficit cognitivo de los HMD.<sup>10</sup>

No obstante a esta información, existen pocas evidencias en la etapa posnatal que analicen cómo afecta la hiperglucemia materna en los procesos de memoria y aprendizaje; así como su implicación en la neuroplasticidad, proceso básico del desarrollo neuronal.

Por esta razón esta tesis está enfocada a conocer si la diabetes durante la gestación altera el desarrollo del cerebro e hipocampo de crías prepúberes de 42 dias posnatales y por ende sea un factor a considerar en las alteraciones observadas en los HMD. Por lo anterior consideramos necesario describir la anatomía y embriología del hipocampo.

#### **1.2.** Formación Hipocampal.

Es una estructura perteneciente al sistema límbico que se encuentra en el telencéfalo del SNC, nombrado así por su parecido con la forma del caballito de mar. Es una de las zonas del SNC más estudiadas por su amplia relación en procesos cognitivos tales como la memoria y el aprendizaje.

#### 1.2.1. Estructura y localización.

El hipocampo se encuentra en el lóbulo temporal medial de manera bilateral en el cerebro y se compone de tres estructuras separadas: el giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho que está conformado por el cuerno de Amón (CA) y el complejo subicular (Fig. 1).



Fig 1. Fotomicrografías del hipocampo humano con tinción de Nissl, localización en el SNC en un corte coronal de cerebro y áreas en que se divide la formación hipocampal<sup>11</sup>.

El GD consta de tres capas: la capa molecular superficial, la capa piramidal, y la capa polimorfa.

La región de CA consta de una capa de neuronas piramidales que presentan diferencias morfológicas para diferenciar distintas regiones de CA, estas regiones se conocen como CA1, CA2, CA3 y CA4. En los roedores, la región de CA2 es minúscula y difícilmente distinguible, por esta razón esta zona es depreciable para su estudio. El complejo subicular está compuesto por tres estructuras, Subiculum, Parasubículum y Presubículum.

La corteza entorrinal sirve como conexión entre el hipocampo y otras partes de la corteza cerebral. Se divide en: la capa molecular, la capa de células superficiales, la capa amplia, la zona de grandes células piramidales, capa de pequeñas neuronas piramidales relativamente densas y la capa con neuronas de morfología variable<sup>12</sup>.

#### 1.2.2. Desarrollo Hipocampal.

Diferentes partes del hipocampo humano son distinguibles en la décima semana de gestación. Al igual que en las otras zonas celulares, las primeras neuronas aparecen en los días 36-38 embrionarios y en la semana 32 las células han migrado al lugar de desarrollo en la etapa adulta además hay evidencia de mielinización en la semana 39.

El GD del hipocampo humano se somete a un curso más largo del desarrollo. Dentro del GD, el aumento en el número máximo de las sinapsis se retrasa hasta alcanzar 9-12 meses y madura hasta los 4-5 años de edad. La mielinización comienza en el quinto mes después del parto y continúa hasta los 11 años o más<sup>13</sup>.

Por otra parte, el hipocampo de rata comienza a formarse en Estadío 15 y continúa la formación hasta la etapa posnatal. Las neuronas hipocampales migran al neuroepitelio hipocampal que consiste en tres partes: el neuroepitelio amónico, que da origen a las células piramidales del estrato oriens y el radio, el neuroepitelio dentado que origina las células granulares y neuronas larga de la capa molecular y el glioepitelio que da lugar a la glía y células de la fimbria.<sup>14</sup>

#### 1.2.3. Función del Hipocampo.

El Hipocampo es crucial para la adquisición (aprendizaje), la consolidación y la recuperación de la memoria declarativa y también es importante para la formación de la memoria y aprendizaje espacial.

Este mapa cognitivo de memoria espacial se construye entre el hipocampo derecho e izquierdo, incorporando detalles con respecto a la velocidad y dirección del movimiento, además de información espacial relacionadas con el objeto<sup>15</sup>.

La información de la corteza cerebral se transmite a las células granulares de el GD del hipocampo por proyección axonal a través de la vía perforante desde la corteza entorrinal (Fig. 2). Los axones forman la célula dentada granular (llamadas fibras musgosas) y luego transmite la información a las células piramidales de CA3, cuyos axones llamadas vías colaterales de Schaffer proyectan a las células piramidales de CA1, que luego envían la información a las capas más profundas de la corteza entorrinal para completar el circuito neuronal a través de las estructuras hipocampales.<sup>12, 16</sup>



Fig. 2. Hipocampo humano y rata. Localización y ruta de flujo de información<sup>12</sup>.

#### 1.2.4. Células piramidales de CA3.

Debido a su elevado número de aferencias y eferencias y por ser la conexión entre el GD y CA1, las células piramidales de CA3 presentan especial importancia a la investigación sobre los déficits de memoria y aprendizaje (Fig. 3). Son las células piramidales más grandes del hipocampo, encontradas en la zona CA3 del hipocampo y son su principal constituyente celular. Están compuestas de un soma o cuerpo neuronal, dos dendríticas, apical y basal y estas dendritas a su vez presentan espinas dendríticas (Fig. 3).



Fig. 3. Neuronas piramidales de CA3. [1] Zona CA3 resaltada y diferenciada de las otras zonas del hipocampo<sup>17</sup>. [2] Acercamiento 40x de neurona piramidal de CA3 con el nombre de sus partes, soma, segmento proximal de la dendrita apical (SP-DA), primera ramificación de la dendrita apical (1ra R-DA) y dendritas.

Se ha encontrado que existen tres tipos de células piramidales basados en su morfología: Las neuronas piramidales normales, con un eje apical individual, además de ser el tipo de neurona piramidal más abundante, las neuronas piramidales en canasta, que son neuronas piramidales que no tienen espinas dendríticas, pero reciben a las fibras musgosas, y por último, las neuronas piramidales con múltiples ejes apicales.<sup>18,19</sup>

#### 1.2.5. Espinas dendríticas.

Las espinas dendríticas (ED) son los elementos postsinápticos de la sinapsis. Se puede decir que son los sitios de contacto excitador del SNC. Son pequeñas protuberancias que emanan desde las paredes dendríticas, especializadas que son donde se encuentran las sinapsis excitadoras (Fig. 4A). La mayoría (96%) de las ED encapsulan grandes estructuras electrón-densas conocidos como las densidades post-sinápticas que marcan el contacto sináptico.



Fig. 4. Esquema de la estructura y tipos de espinas dendríticas. (A) Variabilidad en cuanto a la forma de las espinas dendríticas, (B) formas distintas de las espinas dendríticas, (C) estructura de una espina dendrítica<sup>23</sup>.

La plasticidad estructural forma parte de esta protuberancia, y en la última década se ha vuelto cada vez más claro que la plasticidad de las espinas subyace en la memoria a largo plazo.

Los cambios morfológicos en las espinas se correlacionan con la fuerza sináptica y por lo tanto con la "fuerza de memoria" de una red neuronal. En general, el tamaño de la espina se correlaciona con la fuerza sináptica; espinas que inicialmente son pequeñas experimentan una expansión persistente tras la estimulación y en el aumento de la fuerza sináptica (ver figura 4C) mediante la incorporación de más receptores glutamatérgicos, en particular del tipo AMPA y NMDA (Ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazoleprooionico y N-metil-D-aspartato)<sup>15,20,21,22, 23</sup>

#### 1.2.5.1. Clasificación de Espinas.

La morfología de las ED se pueden clasificar en tres clases: la espina corta (achaparrada), que carece de un cuello aparente; la espina delgada, que contiene una pequeña cabeza bulbosa y un cuello delgado, largo; y la espina hongo, que se a semeja a una seta con una cabeza bulbosa amplia (Fig. 4B).

El tipo de espinas está asociado con la madurez de las mismas y con la capacidad de memoria, siendo las de mayor madurez las espinas en forma de hongo, puesto

que presentan una mayor superficie de contacto sináptico y teniendo en cuenta que son la forma de espinas que permanecen en la memoria a largo plazo.<sup>15, 24</sup>

Por otro lado, a las espinas cortas se les atribuye la plasticidad dendrítica, puesto que dependiendo el estímulo que se presente esta espina, puede modificar su estructura a una espina larga y/o forma de hongo, para mantener la información adquirida o reabsorberse.<sup>24</sup>

Existe predominancia del tipo de receptor glutamatérgico dependiendo del tipo de espina dendrítica, mientras las espinas cortas, que son las de mayor plasticidad pues se pueden expandir y estabilizarse o perderse, presentan mayor cantidad de receptores NMDA, las espinas largas y hongo, que son espinas relativamente estables, presentan dominancia de receptores AMPA.<sup>24</sup>

## 1.3. Sinapsis.

La sinapsis es la mayor estructura dinámica en la red neuronal. Existen dos tipos de sinapsis, la sinapsis eléctrica y la sinapsis química. La sinapsis química puede clasificarse en dos categorías basadas en las características ultra estructurales de la parte pre y postsinaptica, las cuales son: longitud de la membrana opuesta, densidades de membrana y hendidura sináptica. Entonces, existe la sinapsis tipo I, encontrada en las ED y arboles dendríticos y la sinapsis tipo II, encontrada primeramente en arboles dendríticos y somas neuronales (Fig. 5).



Fig. 5. Esquema representativo de sinapsis glutamatérgica con todos sus componentes (1), tipos y características de cada una  $(2)^{24}$ .

La sinapsis tipo I corresponde a la sinapsis asimétrica con vesículas esféricas y un engrosamiento en la densidad postsinaptica, y sinapsis simétrica o sinapsis tipo II, con vesículas aplanadas o alargadas en su aspecto predominante, y no hay engrosamiento de la densidad postsináptica.

La sinapsis más abundante en el sistema nervioso central es la sinapsis asimétrica que es glutamatérgica y es excitadora, con la terminal sináptica finalizando en espina dendrítica. Una gran porción de la sinapsis en las regiones críticas del cerebro que involucran el aprendizaje y memoria, consiste en espinas sinápticas o dendríticas, volviéndolas de vital importancia al momento de la evaluación del la memoria a largo plazo.<sup>24,25</sup>

#### 1.4. Memoria y aprendizaje.

El aprendizaje puede considerarse como una modificación estructural y funcional del SNC que origina un cambio en la conducta relativamente permanente. La información aprendida es retenida o almacenada en los circuitos neuronales y constituye la memoria.<sup>26</sup>. Estas son complejas funciones cerebrales que dependen de estructuras específicas del SNC. La formación hipocampal es fundamental para el procesamiento de información del aprendizaje y memoria y del almacenamiento de información.

La memoria es dividida en memoria de corto y largo plazo, basándose en la duración del almacenaje del recuerdo. La memoria a corto plazo acurre en varios minutos o menos, durante los cuales la información permanece accesible antes de ser desechada o transferida a la memoria de largo plazo mediante un proceso de aprendizaje con base en compilación de información repetida o estímulos ambientales familiares. Por otra parte, la memoria de largo plazo es el sistema cerebral de almacenaje de información, manteniendo y recordando información durante largos periodos de tiempo que van desde días hasta años como consecuencia del aprendizaje obtenido a través del tiempo.

A su vez, otra división de la memoria, de acuerdo a las características conductuales y estructuras cerebrales implicadas es: memoria de trabajo, implícita y explícita. La memoria de trabajo se conoce como cognición ejecutiva, la cual consiste en la representación consiente y manipulación temporal de la información necesaria para realizar operaciones cognitivas complejas, como el aprendizaje, comprensión del lenguaje o el razonamiento. Por otro lado, la memoria implícita, procedimental o no declarativa, es la memoria de las cosas que se hacen rutinariamente. Es considerada automática, inconsciente y difícil de verbalizar, con adquisición gradual y se perfecciona con la práctica. Finalmente, la memoria explícita, declarativa, relacional o cognitiva es el almacenamiento cerebral de los hechos (memoria semántica) y eventos (memoria episódica). Este tipo de memoria se adquiere en pocos ensayos a diferencia de memoria implícita y se distingue por expresarse en situaciones y modos diferentes a los del aprendizaje original, por lo que se considera como una memoria de expresión flexible.

Una fracción de la memoria declarativa, que integra gradualmente las características topológicas de los objetos en el entorno inmediato y las relaciones espaciales entre ellos se le conoce como memoria espacial.

La memoria espacial es el resultado del procesamiento de la información proveniente de las neuronas excitadoras en el circuito tri-sináptico del hipocampo. Este tipo de memoria sirve para situar al individuo en relación con su entorno mediante la compilación de una representación cognitiva de su espacio inmediato.<sup>24, 26</sup>

#### 1.4.1. Alteraciones en el aprendizaje y memoria en los HMD

Existe amplia información que asocia la DM crónica en pacientes adultos con complicaciones neurológicas y funciones cognitivas en comparación con la población en general<sup>27,28,29</sup>. Sin embargo, existe mucha controversia en la literatura científica para establecer si los HMD que se desarrollaron en un ambiente intrauterino hiperglucémico presentan o no en la etapa posnatal, alteraciones en su capacidad cognitiva.

Lo anterior ha sido un tema de interés para los investigadores clínicos, quienes han evaluado en la descendencia de madres diabéticas aspectos como son el Índice de desarrollo mental, la función motriz, coeficiente intelectual y desarrollo del lenguaje.

En cuanto al índice de desarrollo mental (IDM), medido por la escala de desarrollo infantil de Bayley (BSID), varios investigadores<sup>30,31,32,33</sup> analizaron niños de 12 y 24 meses de edad, obtenidos de madres diabéticas y encontraron puntajes mentales más bajos que en los hijos de madres sin diabetes.

Townsend en 2005<sup>34</sup>, Nelson en 2000<sup>35</sup>, De Regnier en 2000<sup>36</sup> y DeBoer en 2005<sup>30</sup>; reportaron mediante estudios longitudinales el efecto de los niveles de glucemia materna en niños de 1 año de edad y encontraron puntuaciones cognitivas significativas menores en niños expuestos a la diabetes (sin diferenciar pre-gestacionales o gestacionales) basados en medidas conductuales de BSID que; se correlacionaron con registros electro-fisiológicos, lo que sugiere que los efectos adversos observados podrían estar mediados por daño del hipocampo. Además de lo anterior, otros estudios sugieren que los hijos de madres con diabetes controlada durante el embarazo muestran mejores funciones cognitivas que los hijos de madres con poco o nulo control de diabetes.

Respecto a la medida de la función motriz (FM), evaluada por el índice de desarrollo psico-motor, diversos investigadores han reportado que dicho índice es más bajo en hijos de madres diabéticas que en los hijos de madres

control<sup>32,35,36,33,28</sup>. No obstante Hod en 1999<sup>33</sup> encontró que los niños expuestos a DM T2 obtuvieron puntajes más bajos en FM que los expuestos al DM T1, pero más altos en el puntaje de calidad motriz en comparación con los niños control.

Por su parte los resultados en los que se ha evaluado el coeficiente intelectual (CI) y que han dividido en intervalos de edad: de 3-5 y de 5-12 años; han encontrado una disminución en el CI de los hijos provenientes de madre diabética en comparación con niños obtenidos de madres sin diabetes; sugiriendo un potencial efecto adverso de la diabetes materna sobre la inteligencia de los hijos<sup>37, 38,34,39,40,33,41</sup>

Ornoy en 1998<sup>39</sup> reportó que el índice de función somato-sensorial en los niños expuestos a DM T1 y DM T2 tiende a ser menor cuanto mayor es la hemoglobina glucosilada (Hb1Ac) materna. Rizzo en 1991<sup>40</sup> comparó el efecto de la DMPG (sin discriminación por tipo de diabetes) y la exposición a DMG en niños de 1 año y 3-5 años. Encontraron que ambos niños expuestos a la diabetes presentaban un menor desarrollo conductual e intelectual, aunque la deficiencia de hierro y la hiperglucemia neonatal eran frecuentes en los lactantes de madres preexistentes de la diabetes. Campubri en 2015<sup>42</sup> realizó un meta-análisis quien basado en la heterogeneidad significativa de sus resultados y concluye que no hay evidencia de un menor puntaje de CI observado en niños (3-12 años) de mujeres con diabetes durante el embarazo.

Otras habilidades cognitivas como el desarrollo del lenguaje y el rendimiento motor; se han reportado afectadas negativamente en los niños de madres diabéticas. Sin embargo, no hubo suficientes estudios para sacar conclusiones sobre estos resultados<sup>39</sup>. También se ha encontrado disfunciones cerebrales mínimas en niños con hipoglucemia neonatal en HMD. Altman en 1991<sup>43</sup> y Higgins en 2002<sup>44</sup> describen puntuaciones significativamente inferiores en las áreas de la audición así como un lento desarrollo del lenguaje y el habla en los HMD que al nacimiento fueron afectados por la hipoglucemia neonatal y posnatalmente tenían más probabilidades de ser diagnosticados como fácilmente distraído, hiperactivo e impulsivo.

Llama la atención que los estudios que han evaluado la inteligencia y otras funciones neuropsicológicas en HMDPG e HMDG en edad pre escolar y escolar han proporcionado resultados muy heterogéneos que han dificultado llegar a una conclusión sobre los resultados de los mismos. Lo anterior radica en que se han utilizado herramientas distintas en las evaluaciones aplicadas y se han enfocado a aspectos diversos. Además, se deben de tomar en cuenta otros factores intrínsecos y extrínsecos que también contribuyen al rendimiento cognitivo del niño como son el estado de salud metabólico y el nivel socioeconómico.

Con base en lo anterior y por razones éticas en las que no se pueden llevar a cabo este tipo de investigación en seres humanos, es necesario diseñar estrategias para eliminar variables confusoras y confirmar si esta condición materna afecta los procesos cognitivos en los HMD y cuáles son los mecanismos celulares implicados. Una opción es recurrir a modelos animales, los cuales han servido como una herramienta clave en la ciencia básica, ayudando a la experimentación por sus cortos periodos de desarrollo, bajo costos, metodología accesible, etc.

#### 1.5. Modelos animales de diabetes inducida.

Para facilitar el estudio de la DM se utilizan distintas metodologías que provocan estados hiperglucemicos en el organismo animal, que van desde la extirpación del páncreas, pasando por modificaciones genéticas que alteran la síntesis y metabolismo de insulina y glucosa, hasta los agentes químicos que son ampliamente utilizados en la ciencia básica. La estreptozotocina (STZ) y aloxano (Alo) son toxinas selectivas de células  $\beta$  pancreáticas, que se han utilizado ampliamente para investigar los mecanismos subyacentes de daño mediado por oxígeno en las células  $\beta$  de roedores. Ambos de estos diabetogénicos reducen el nivel de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) en los islotes pancreáticos e inhiben la síntesis de la proinsulina. La especie reactiva de oxígeno, producida por ALO y STZ, es mediador de la necrosis de las células B y un síndrome de DM insulinodependiente permanente.

#### 1.5.1. Estreptozotocina (STZ).

La STZ (2-desoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranosido) (Fig. 6A), es sintetizado por la bacteria *Streptomices achromogenes*es una molécula inestable, que se acumula en las células  $\beta$  pancreáticas. Los mecanismos por los cuales la STZ induce diabetes no se entienden claramente. Se han sugerido que los radicales libres de oxígeno, incluyendo radicales hidroxilo, participan en la acción tóxica de STZ. Estos radicales altamente reactivos ejercen efectos tóxicos directos o indirectos sobre el endotelio de los islotes e intervienen en la fragmentación del ADN nuclear en las células beta. El óxido nítrico generado por STZ se ha sido propuesto como un implicado en el daño de las células beta pancreáticas.

Por otro lado, STZ es un agente alquilante potente conocido por metilar directamente al ADN, es altamente genotóxico, produciendo roturas de hebra en el ADN, formando aductos de ADN, la síntesis de ADN no programada, todos los tipos de aberraciones cromosómicas, y la muerte celular.

El mecanismo de la hiperglucemia inducida por STZ se considera de la siguiente manera; STZ causa roturas de la cadena de ADN en los islotes pancreáticos y

estimula la poli-nuclear (ADP ribosa) sintetasa, y por lo tanto reduce los niveles intracelulares de NAD y NADP.

#### 1.5.2. Aloxano (Alo).

El aloxano (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracilo), es sintetizado a partir de la oxidación de ácido úrico (Fig. 6B). Alo es una sustancia hidrofílica e inestable, pero cuando se utiliza a una dosis alta, el tiempo de descomposición es suficiente para permitir que alcance el páncreas en cantidades que son nocivas, ejerciendo una acción diabetogénica cuando es administrada de forma parenteral. La dosis intraperitoneal en rata es de 150 mg/Kg, la cual es suficiente para inducir el estado diabético

La acción del Alo se caracteriza por una rápida absorción de las células  $\beta$  del páncreas, acompañadas de la producción de especies reactivas de oxígeno producidas por la reducción de Alo producido por diferentes agentes reductores. Tiene gran afinidad por compuestos celulares que contienen SH-, glutatión reducido (GSH), cisteína y proteínas unidas con grupos sulfidrilo incluyendo enzimas como glucosa cinasa y coenzimas, inactivándolas debido a la formación de enlaces disulfuro. Se forma el ácido dialúrico como resultado de la reducción del Alo, el cual se vuelve a oxidar a Alo, estableciendo un ciclo redox para radicales superóxido. Uno de los objetivos de las especies reactivas del oxígeno es el ADN de los islotes pancreáticos. Está fragmentación de ADN tiene lugar en las células  $\beta$  expuestas a Aloxano.<sup>7, 45</sup>



Fig. 6. Estructura química de (A) Estreptozotocina y (B) Aloxano<sup>45</sup>.

Α

#### 1.6. Prueba conductual. LAM

Las pruebas cognitivas son un parámetro muy importante para evaluar los cambios en las capacidades de memoria y aprendizaje. Existen una amplia gama de tareas de comportamiento, tales como cajas de conexión de dos compartimentos, laberintos, tales como Y-laberinto, laberinto en T, brazo radial, laberinto elevado y laberinto acuático de Morris, que han sido desarrollados para probar las capacidades cognitivas en los roedores. Estas tareas se utilizan con diferentes paradigmas del comportamiento, incluyendo el aprendizaje de evitación, el aprendizaje reversión, la memoria consolidada y la memoria a largo plazo en estudios experimentales. Así mismo, estos estudios conductuales en animales arrojan resultados discrepantes sobre la DM materna.

La prueba conductual llamada laberinto acuático de Morris (LAM), desarrollada por Richard Morris en 1981, es utilizada generalmente para evaluar el aprendizaje espacial en roedores, basándose en señales distales visuales para navegar desde las ubicaciones de salida, por toda el área abierta de natación, hasta la meta fijada como una vía de escape (Fig. 7). Las evaluaciones de LAM se basan en repeticiones de una tarea espacial específica asignada por el experimentador, con el objetivo de evidenciar la capacidad del roedor para aprender y recordar la tarea enseñada, consecuentemente evidenciando algún daño presente en la memoria del sujeto experimental con respecto a un sujeto control. El LAM ha demostrado ser una prueba robusta y fiable, que está fuertemente correlacionada con la sináptica del hipocampo y la función del receptor NMDA plasticidad glutamatérgico. El aprendizaje espacial en el LAM se usa comúnmente, además de ser un método fiable para evaluar la función cognitiva dependiente del hipocampo en los roedores, esto es debido probablemente a que el laberinto acuático no requiere de alimentos especiales o restricción de agua, lo que puede poner como variable adicional el estrés fisiológico diferencial sobre los roedores, y también que el aprendizaje en el laberinto acuático procede de manera rápida y eficiente46,47,48,49,50

El hipocampo realiza importantes funciones psicológicas y funciones conductuales incluidas el aprendizaje y memoria espacial en rata y humano, lo que justifica el uso de este modelo demostrando que los resultados obtenidos en rata son fidedignos y extrapolables al humano.



Fig. 7. Esquema de las partes que conforman el laberinto acuático de Morris<sup>46</sup>.

# 1.7. Alteraciones en el aprendizaje y memoria en crías de ratas diabéticas.

Al igual que en el humano, existe amplia información que asocia la DM en modelos animales adultos con complicaciones neurológicas y funciones cognitivas. Por ejemplo Popovic en 2001<sup>51</sup>, reportó una disminución significativa en la retención de la memoria y en tareas de evocación activa dependientes del hipocampo en ratones diabéticos, resultados similares a lo señalado por otros investigadores<sup>52,53</sup>. Por su parte Kamal y cols<sup>54</sup>, reportaron en un modelo de ratas diabéticas, un deterioro progresivo de la plasticidad sináptica entre neuronas hipocampales y por lo tanto en la habilidad de aprender.

Sin embargo, existe poca evidencia en la literatura científica para establecer si las crías de madres diabéticas presentan o no en la etapa posnatal, alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria:

El grupo de Ramanathan<sup>55</sup> y colaboradores al aparear ratas hembras y machos con diabetes inducida previa a la concepción, descubrieron que el ambiente materno hiperglucémico tiene un efecto en la conducta emocional de los descendientes adultos, evaluada mediante pruebas conductuales como exploración en campo abierto y Laberinto Acuático de Morris. Después Kinney<sup>56</sup> y colaboradores en el 2003 utilizaron otras pruebas conductuales a crías de ratas diabéticas para evaluar dicha ansiedad (mediante Laberinto elevado), y diferentes tipos de aprendizaje (Laberinto Lashley III, laberinto de 12 brazos radiales, aparato inhibitorio). Este grupo de investigadores reportó deficiencias en el aprendizaje y aumento en la ansiedad de las crías de rata diabética comparada con los controles. También analizó la influencia de género, observando mayor déficits en la memoria y aprendizaje en las ratas hembras en comparación con los machos, sugiriendo que los efectos producidos por la condición intrauterina de una madre diabética son específicos de género.

Delascio en 2011<sup>46</sup>, aplicando el paradigma de LAM en crías macho P60 obtenidas de ratas Wistar diabéticas, no encontró diferencias significativas entre las crías control y las crías de rata diabética. Chandna en 2015<sup>57</sup> realizó en su estudio otra prueba conductual llamada reconocimiento de objetos a crías de ratas diabéticas Long-Evans, encontrando menor capacidad para reconocer objetos familiares en comparación con las crías de rata control. Un estudio adicional realizado en crías P30 obtenidas de ratas con una dieta alta en sucrosa realizado por Kuang y colaboradores en 2014<sup>58</sup>, reporta un déficit de adquisición y retención espacial debido a la aumento de la apoptosis hipocampal provocado por dicha dieta. Cabe señalar que a excepción de Kuang, los otros investigadores no analizaron la asociación de sus resultados conductuales con algún evento celular involucrado.

Por otro lado se han reportado alteraciones en diversos mecanismos celulares, principalmente en la densidad neuronal en el hipocampo que ha sido un parámetro a evaluar para conocer su posible implicación con las deficiencias cognitivas observadas en las crías de madres diabéticas:

Tehranipour y Khakzad en el 2008<sup>59</sup> estudiaron el efecto de la inducción de diabetes por STZ sobre la densidad neuronal en el hipocampo de ratas recién nacidas (P0), y encontraron que la diabetes en el embarazo puede reducir el número de neuronas hipocampales, especialmente en CA3. Por otro lado Kuang en 2014<sup>56</sup> y Lofti<sup>60</sup> en 2016 midieron la cantidad de muerte neuronal por apoptosis en el hipocampo, el primer autor en crías de 30 días y el segundo en crías P0, P7 y P14. Ambos autores coincidieron en que la diabetes materna afecta negativamente el mecanismo de apoptosis aumentando la cantidad de neuronas

muertas por este mecanismo, en comparación con las crías de rata control y lo relacionaron con los efectos deletéreos en la cognición de la progenie.

Se ha señalado que el factor de crecimiento parecido a la insulina 1 (IGF-1), la insulina y sus respectivos receptores son indispensables para el neurodesarrollo y que están concentrados en varias zonas del cerebro, especialmente en el hipocampo. Hami en 2013<sup>53</sup>, Haghir en 2013<sup>61</sup> y Jing en 2014<sup>62</sup> han reportado una disminución en la expresión y cantidad de dichas proteínas en el hipocampo que pudiera correlacionarse con déficits de aprendizaje y memoria en las crías de rata diabética. Chandna<sup>53</sup> y colaboradores explican en un estudio realizado en el 2015 la importancia de los productos finales de glucosilación avanzada (AGE´s) y sus receptores (RAGE), como señalizadores inflamatorios en la diabetes. También en este estudio analizan la excitabilidad neuronal hipocampal. Los resultado encontrados fueron un aumento en la expresión de RAGE en el cerebro de crías de rata diabética y una alteración en la excitabilidad neuronal hipocampal, trayendo consigo consecuencias que pueden alterar el comportamiento de la progenie de ratas diabéticas, en especial en la memoria de reconocimiento y ansiedad.

En concordancia con lo anterior, experimentos preliminares realizados en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental a nivel conductual mediante la prueba de reconocimiento de objetos y de exploración en campo abierto han señalado que las crías P30 de ratas diabética presentan un déficit en la memoria a corto plazo, y alteraciones en la capacidad de atención, seguridad y locomoción. Las crías también presentaron una menor plasticidad neuronal hipocampal y desregulación cronológica en la maduración neuronal<sup>63,64,65,66</sup>.

No obstante lo anterior, no se ha evaluado el efecto de esta condición materna en la memoria a largo plazo en correlación la plasticidad neuronal

#### 2. Justificación.

La alta frecuencia de embarazos afectados por la DM es un problema de salud a nivel mundial. La naturaleza de las alteraciones de la DM asociadas al embarazo, los procesos de neurodesarrollo en el embrión y/o feto y la posible implicación de esta enfermedad materna en los procesos de aprendizaje en los hijos de madres diabéticas son tres aspectos que aunque han generado resultados contradictorios la mayoría de los estudios concluye la asociación de la hiperglucemia intrauterina con los problemas cognitivos que presenta la descendencia.

Con base en lo anterior y por razones éticas entre otras, es necesario recurrir a modelos biológicos para poder analizar la correlación entre dichos factores. A la fecha son pocos los trabajos experimentales que evalúan el desempeño neurocognitivo con pruebas conductuales en correlato con la plasticidad neuronal en crías prepúberes obtenidas de ratas diabéticas.

Los resultados obtenidos permitirán sugerir mejores estrategias para hacer frente a la diabetes durante la gestación y disminuir el déficit cognitivo que presenta la descendencia.

#### 3. Hipótesis.

Al inducir con STZ un estado hiperglucémico intrauterino en las ratas gestantes se generarán efectos nocivos para el desarrollo del las crías, que se reflejará en un déficit de memoria espacial evidenciado por la prueba de laberinto acuático de Morris y confirmado por la disminución en la cantidad y tipo de espinas dendríticas de las regiones analizadas.

#### 4. Objetivo General.

 Analizar el efecto deletéreo de la diabetes materna inducida sobre la memoria espacial y plasticidad sináptica hipocampal en crías prepúberes sometidas a Laberinto Acuático de Morris.

#### 4.1. Objetivos particulares.

- Obtener crías de ratas con diabetes inducida y controles y registrar tiempo de gestación, peso y glucemia desde el nacimiento hasta los 30 días de vida extrauterina.
- Aplicar la prueba conductual de Laberinto acuático de Morris en crías de 30 días posnatales y evaluar memoria espacial en los grupos de estudio, tanto control (CRC) y experimental (CRD).
- Analizar en crías prepúberes de 42 días posnatales, con prueba conductual LAM, las características morfométricas del cerebro e hipocampo.
- Diferenciar el tipo y la cantidad de espinas dendríticas de CA3 del hipocampo entre los grupos estudiados y relacionarlo con la memoria espacial.
- Relacionar el conteo de espinas dendríticas de las regiones SP-DA y 1ra R-DA y la memoria espacial con la diabetes durante el embarazo.

#### 5. Procedimiento Experimental.

5.1. Esquema experimental.




# 5.2. Obtención de Ratas Gestantes.

Para llevar a cabo los objetivos planteados se seleccionaron 16 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 250-300 g de peso corporal; de ciclo circadiano normal, alimentadas ad libitum y mantenidas con ciclos de luz-oscuridad de 12:12 hrs.

Se les monitoreó diariamente el ciclo estral a cada rata y cuando se encontraron en etapa de pro-estro o estro se procedió a cruzarlas por el método de la triada (3 hembras y 1 macho de fertilidad comprobada). Para confirmar la cópula, al día siguiente, antes de las 8 de la mañana, se realizó un frotis vaginal teñido con azul de toluidina (Anexo 1.1). La presencia de espermatozoides o tapón vaginal mucoso, establecieron el día cero e inicio de la gestación.

# 5.3. Asignación de grupos.

Las ratas que quedaron gestantes, se separaron de las no preñadas y se colocaron individualmente en su caja de policarbonato con las condiciones estándar de alojamiento.

Aleatoriamente se dividieron en dos grupos:

# 5.3.1. Experimental o RD. (n=8)

Posterior a la implantación del embrión en el útero (5° día de la gestación), se procedió a inducir la diabetes mediante una dosis única de 40 mg/Kg de estreptozotocina (STZ) (Anexo 1.2) por vía intraperitoneal. A los dos días posteriores a la inducción se cuantificó la concentración de glucosa en sangre mediante la extracción de una gota de sangre de la vena caudal y utilizando un glucómetro Abbot Freestyle OptiumH. Solo se incluyeron las ratas que presentaron niveles de glucemia  $\geq$  a 200 mg/dL y que permanecieron durante todo el periodo gestacional arriba de la concentración señalada. Las que no cumplieron este criterio de inclusión, se sacrificaron con pentobarbital sódico a dosis letal.

## 5.3.2. Control o RC. (n=8)

Ya confirmada la gestación, las ratas asignadas a este grupo también se colocaron en cajas individuales, pero no se les realizó ninguna manipulación adicional, ni se les inyectó ninguna solución química.

En ambos grupos se registró el peso corporal y glucemia durante toda la gestación (Anexo 2.1) y al final de esta, se cuantificó la hemoglobina glucosilada fracción A1c. Se estuvo muy atento a vigilar que el parto cursara sin problemas para obtener a las crías de ambos grupos.

# 5.4. Obtención de Crías.

Se contabilizó el número de crías obtenidas en cada rata y se ajustó la camada a 8 crías. Del día 1 posnatal (P1) y hasta el día 9 (P9) se registró el peso corporal de todas las crías juntas y se promedió para obtener su peso individual. A partir del día P9, con marcaje indeleble en la cola se numeraron consecutivamente todos los integrantes de la camada y se continuó monitoreando y registrando los valores de peso y glucemia (Anexo 2.2) hasta el día 30 posnatal (P30).El destete se realizó el día 21.

A partir del día P30, las crías de rata obtenidas de gestantes diabéticas CRD (n=24) y las obtenidas de ratas control CRC (n=24) se sometieron al paradigma conductual de laberinto acuático de Morris.

# 5.5. Laberinto acuático de Morris (LAM).

El Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental cuenta con un laberinto acuático de Morris, con las características descritas previamente. (Ver figura 7). Dentro de la piscina se colocó la plataforma de escape en el cuadrante meta (cuadrante 4). La cámara de video que se utilizó fue de la marca Panasonic SRD-H86, conectada a un monitor Sony Trinitron, que permitió ver el nado de la rata.

## 5.5.1. Procedimiento:

Previo a la prueba conductual (3 días antes), las crías fueron aclimatadas o acondicionadas para que reconocieran los pasos previos a la prueba y para identificar el olor del experimentador como algo familiar, descartando el factor estrés.

El día de la prueba, tomando en cuenta el ciclo de oscuridad de las ratas, la piscina se llenó con agua de la llave hasta 2 cm por arriba de la superficie de la plataforma de escape y mediante una resistencia eléctrica se calentó el agua hasta tener una temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Enseguida se inició la grabación y se colocó la cría de ratas diabética o control según fuera el caso, en el primer punto de salida de la piscina, dirigiendo su cabeza hacia la pared del laberinto para no influir en la dirección de nado seleccionado (Fig. 8).



Fig. 8. Esquema real del LAM utilizado en el estudio conductual. (A) Inicio en el primer punto de salida. (B) Final del primer punto en la plataforma de escape.

Se cronometró el tiempo que tardaron en llegar a la plataforma de escape (latencia de escape). Los valores obtenidos se registraron en el formato del LAM (Anexo 2.3). Las que tardaron más de 60 segundos en llegar a la plataforma, se les condujo manualmente hacia ella. En ambos casos se verificó que se mantuvieran durante 30 segundos sobre la plataforma. Pasados los 30 segundos, se levantó a la rata se secó con una tela de algodón y se dejó descansar durante 20s (Fig. 8). Esto se repitió en los 7 puntos de salida restantes. Al finalizar con el último punto de salida, se retiró a la rata y se colocó en una tela de algodón para secarla y se regresó a su jaula. Este procedimiento se repite por cuatro días más para completar la etapa de adquisición de la información.

Después de las 5 sesiones, los sujetos de estudio se mantuvieron 1 semana en condiciones estándar de bioterio para que consolidaran la información obtenida y en el día 41 posnatal (P41) se les aplicó la prueba de memoria en el LAM. Esta prueba consiste en hacer un promedio de todas las mediciones de latencia de escape, este promedio fue el tiempo que se dejó nadando a la rata en la tina durante la prueba, representando el 100% de nado en el cuadrante meta (cuadrante 4). Se liberó a la rata desde cada cuadrante y se midió el tiempo de latencia y el tiempo de estancia en el cuadrante meta. Esto se realizó bajo las mismas condiciones de la prueba de adquisición, con la diferencia de que se retiró la plataforma de escape.

Una vez terminada la intervención conductual, para cada uno de los grupos se realizó lo siguiente:

# 5.6. Análisis morfométrico del Cerebro.

Crías de 42 días (P42) obtenidas de madres diabéticas y no diabéticas, sometidas y no sometidas a prueba conductual, se midieron y pesaron. Enseguida por decapitación se extrajo el cerebro y rápidamente se pesó en una balanza analítica marca ADAM y se midió con la ayuda un vernier digital Starrett. Para el eje longitudinal se tomó como referencia el lóbulo frontal y la hendidura que se localiza entre el cerebelo y el lóbulo occipital y para el eje transversal se tomó de referencia la distancia más ancha entre los hemisferios cerebrales (ver Fig. 9). Los datos se registraron en un formato diseñado para tal fin (Anexo 2.4)



Fig.9. Imagen de un cerebro obtenido de una cría de rata CRC en la que se midieron los ejes longitudinal (L) y trasversal (T).

## 5.6.1. Análisis morfométrico del Hipocampo dorsal.

El tamaño del hipocampo dorsal y la plasticidad de las neuronas piramidales del campo CA3 se evaluó impregnando el cerebro con metales pesados con el kit Golgi Rápido (FD Rapid Golgi Stain<sup>™</sup>).

Los cerebros inmediatamente después de medirlos se sumergieron 48 horas en solución de impregnación que consta de una mezcla de solución A (dicromato de potasio al 4.5%) y solución B (ácido ósmico al 1%) en partes iguales preparada un día antes y conservada en un frasco ámbar. Posterior a esas 48 horas, se procedió a realizar un cambio con la misma solución A y B. Después 12 días en esa solución, se continuó con la solución C (nitrato de plata al 0.75%) sumergiendo el cerebro en esta solución y dejándolo una semana más.

Una vez procesado, se realizaron cortes sagitales de cerebro de 100 µm de grosor en el Vibrátomo EMS OTS-400, se colocaron de 6 en 6 en laminillas impregnadas de gelatina (Anexo 1.3) previamente preparadas. Ya con los cortes en las laminillas, se utilizó la metodología descrita en el kit de Golgi Cox rápido, la cual consiste en montar un tren para revelar las neuronas impregnadas. Primero las laminillas con los cortes se enjuagaron en agua bidestilada dos veces por dos minutos cada vez, después se colocaron en una mezcla que consiste en una parte de solución D, una parte de solución E y dos partes de agua bidestilada o Mili-Q, de 10 a 14 minutos. Seguimos con dos lavados de agua bidestilada de 4 minutos cada uno, se continuó con la deshidratación con etanol al 50%, 75%, 95% por 4 minutos cada uno y al final con etanol absoluto 4 veces durante 4 minutos cada uno. Se aclararon con xilol, tres lavados de 4 minutos cada uno. Se montaron con resina sintética (Enthelan) y cubreobjetos para su observación.

Para medir el hipocampo dorsal a bregma -3.36 a 5.64<sup>67</sup> se fotografiaron los hipocampos con la ayuda del microscópico estereoscópico Calr Ziess y la cámara Axo-Vision con zoom 13x para medir los ejes. Posteriormente, con ayuda del microscopio óptico Olimpus BH2 y la cámara Nikkon, se observaron y contabilizaron las ED por tipo, ya sean en forma de hongo, larga, corta y otras haciendo la suma de los promedios de cada región estudiada (SP-DA y 1ra.RDA), y por localización en segmento proximal de la dendrita apical y en la 1ra ramificación de la dendrita apical. (Anexo 2.5) (Ver figura 10).



Fig.10. A. Imagen de una neurona piramidal del CA3 del hipocampo dorsal en la que se señalan la región proximal (SP-DA) y la primera ramificación de la dendrita apical (1ra.RDA). B. Forma de las ED contabilizadas en cada uno de los segmentos estudiados.

## 5.7. Plan de análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa para Windows SPSS Statistics versión 19.0. Los gráficos representan los valores de los promedios ± DE. (Desviación estándar). En los casos donde la comparación fue entre dos grupos, se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes. Para las mediciones de la prueba de memoria se utilizó ANOVA de medidas repetidas y ANOVA factorial para verificar las diferencias de desempeño entre cada grupo. En todos los casos el nivel mínimo de significancia se fijó en el 95%, por lo que se consideraron como diferencias significativas los análisis en los que el valor de p<0.05.

#### 6. Resultados.

## 6.1. Monitoreo Materno.

Al confirmar que las ratas resultaron preñadas, mediante la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal, se estableció el inicio de la gestación como día 0 en que se registraron los valores iníciales de peso y glucemia durante toda la gestación. La ganancia del peso corporal promedio al final de la gestación (día 21) en el grupo RC fue significativamente mayor que en el grupo RD (392±10.2/360.6±14.7) (Gráfica 1).



Gráfica 1. Comparativo de peso corporal entre las ratas gestantes diabéticas durante la gestación. \*P<0.05.

Respecto al monitoreo de los niveles de glucosa en sangre se observó en el grupo experimental (RD) un aumento súbito en la concentración de este carbohidrato como resultado de la acción de la STZ, la diferencia fue estadísticamente significativa a partir del día 7 de la gestación. Dichos niveles de hiperglucemia se mantuvieron por arriba de los 200 mg/dl durante toda la gestación. Por su parte las ratas del grupo control (RC) mantuvieron desde el inicio de la gestación niveles normales de glucemia (85-105 mg/dl). (Gráfica 2). Este resultado se relacionó con la concentración elevada de hemoglobina glucosilada fracción A1c al final de la gestación. (Grafica 3)



Gráfica 2. Comparativo de glucemia entre los grupos de estudio. Nótese que en las ratas del grupo CRD una vez realizada la inducción la hiperglucemia persistió durante toda la gestación y el parto se prolongó 2 días más. p<0.05.



Gráfica 3. Comparativo de hemoglobina glucosilada fracción A1c de las ratas gestantes. Observe el aumento de más del doble de la concentración de esta proteína en el grupo CRD. La diferencia es significativa entre los grupos. \*p<0.05.

#### 6.2. Monitoreo de Crías.

Las crías recién nacidas de ratas sin diabetes (CRC) no presentaron diferencias significativas de peso corporal con respecto a las crías nacidas de ratas diabéticas (CRD), aún cuando el periodo gestacional se prolongó 2 días más en el grupo experimental. (P0 CRC/CRD =  $8.3 \pm 1.1/6.7 \pm 0.13$ ). Este comportamiento fue similar en los días P3 (CRC/CRD = $9.66 \pm 0.18/8.4 \pm 0.69$ ) y P6 (CRC/CRD = $12.0 \pm 0.01$  /11.76±0.58). A partir del día 9 las crías de madre control presentaron mayor ganancia de peso corporal en comparación con las crías de madres diabética hasta la aplicación de la prueba conductual realizada el día P30 (CRC/CRD =  $24.7 \pm 1.8/15.3 \pm 0.9$ ). Ver Gráfica 4.



Gráfica 4. Comparativo de peso entre las crías de ratas diabéticas y controles. Observe la menor ganancia de peso de las crías que vivieron en un medio ambiente hiperglucémico intrauterino. Hay diferencias significativas a partir del día 9 y hasta el día 30 (n= 24 c/gpo). \*p<0.05.

El promedio de valores de glucemia en las crías obtenidas de ratas diabéticas en los días P9 y P12 fue mayor en comparación con el grupo control (CRC /CRD=110.5±2.12/287.8±188.33), sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (Gráfica 5). Posteriormente los valores de glucemia fueron prácticamente iguales.



Gráfica 5. Datos de glucemia de las crías de ambos grupos desde el nacimiento hasta el día P42. Las crías de ratas diabéticas normalizan sus niveles de glucemia en el día 12. No existen diferencias significativas en ningún día. (n= 24 c/gpo). \*p<0.05.

# 6.3. Resultados de la Prueba conductual LAM.

Durante todas las sesiones de adquisición de la información, las crías de ratas diabéticas (CRD) presentaron tiempos más prolongados para llegar a la plataforma de escape (latencia de escape) en comparación con las crías de ratas control (CRC).

Los valores promedio (± desviación estándar) en cada uno de los 8 puntos de salida obtenidos durante la prueba fueron los siguientes: 1° cuadrante. CRC=19.13 (± 2.54), CRD=25.31 (±2.92), 2°cuadrante. CRC= 14.43 (±2.13), CRD=18.61 (±2.93) 3° cuadrante CRC=6.9 (± 2.04), CRD=14.23 (±3.23), 4° cuadrante CRC=9.93 (± 2.01), CRD=16.2 (±3.02), 5° cuadrante CRC=8.03 (± 1.84), CRD=11.87 (±2.47), 6° cuadrante CRC=8.29 (±2.08), CRD=12.57 (±2.69), 7° cuadrante CRC=7.21 (± 1.59), CRD=9.02 (±2.5) y 8° cuadrante CRC=7.97 (± 1.89), CRD=13.9 (±2.41). (Gráfica 6).



Gráfica 6. Latencia promedio de escape para encontrar la plataforma en cada punto de salida de salida. Se observan mayores tiempos en el grupo CRD comparado con el grupo CRC. (n= 24 c/gpo). \*p<0.05.

Los valores promedio de latencia (± desviación estándar) durante las 5 sesiones que duró la prueba conductual fueron los siguientes: 1° día, **CRC**=16.50 (± 2.5), **CRD**=32.29 (±3.87), 2° día **CRC**=11.95 (± 1.81), **CRD**=19.39 (±2.86), 3° día

**CRC**=9.52 (± 1.89), **CRD**=13.62 (±2.47), 4° día **CRC**=7.18 (± 1.41), **CRD**=7.92 (±2.18), 5°día **CRC**=5.90 (± 1.34), **CRD**=6.04 (±1.7). (Gráfica 6). los tiempos de latencia promedio del grupo CRD fueron mayores a los tiempos del grupo CRC (Gráfica 7).



Gráfica 7. Latencia en los 5 días de la fase de aprendizaje. Se observa mayor tiempo de latencia en el grupo CRD comparado con el CRC en los primeros dos días, que denota alteraciones en el proceso de adquisición de la información (n= 24 c/gpo). \*p<0.05.

#### 6.3.1. Resultados de la fase de Memoria.

Haciendo un promedio del tiempo de estancia en cada cuadrante observamos que el grupo CRC permaneció más tiempo en cuadrante 4 (cuadrante meta) en comparación con el grupo CRD (Gráfica 8).



Gráfica 8.Comparativo del promedio de estancia en cada cuadrante Hay una disminución significativa en la estancia en el cuadrante meta (4) del grupo CRD comparado con CRC (n= 24 c/gpo). \*p<0.05.

# 6.4. Estudio morfométrico de cerebro e hipocampo en crías prepúberes.

Una vez terminada la intervención conductual en ambos grupos de estudio, el peso del cerebro fue significativamente más pequeño en las CRD en relación a las CRC ( $1.51\pm0.11/1.72\pm0.09$ ) (Gráfica 9). No obstante, al medir el tamaño de este órgano (ejes longitudinal y transversal), no se encontraron diferencias significativas (L CRC=14.83 ( $\pm0.35$ ) CRD=14.27 ( $\pm0.33$ ), T CRC=15.58 ( $\pm0.32$ ) CRD=14.99 ( $\pm0.57$ ), (Gráfica 10).



Gráfica 9. Peso del cerebro de las crías pre-púberes. Observe que las crías de ratas control (CRC) mostraron mayor peso cerebral que las crías del grupo diabético (CRD). (n= 24 c/gpo). \*p<0.05.



Gráfica 10. Promedio y desviación estándar de las longitudes de los ejes longitudinal (L) y transversal (T) del cerebro de crías de 42 días de edad de los grupos: Control (CRC) y Experimental (CRD). (n= 24 c/gpo). P>0.05

Con respecto al tamaño del hipocampo se observó que los ejes longitudinal y transversal fueron más pequeños en las CRD en comparación con las CRC (L CRC= 4.19 (±0.22) CRD=3.95 (±0.12), T CRC=2.02 (±0.13) CRD=1.91 (±0.09)) pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (Gráfica 11).



Gráfica 11. Promedio y desviación estándar del tamaño de los ejes longitudinal (L) y transversal (T) del hipocampo dorsal (Bregma -3.36). CRC y (CRD) (n= 24 c/gpo). P>0.05

## 6.4.1. Plasticidad neuronal hipocampal en crías prepúberes

Se observó en las CRC que el hipocampo dorsal es una estructura bien delimitada con la forma característica de "caballito de mar". En contraste en las CRD los límites del hipocampo no son precisos (Compare A y B en Fig. 1). A pesar de esto, en ambos grupos, fue posible identificar la región CA3 donde se observan grandes neuronas piramidales con prolongaciones extensas. (Fig. 11).



Figura 11. Fotomicrografía del hipocampo dorsal en el Bregma -3.60 mm de crías prepuberes de ambos grupos de estudio. A= Cría de rata control y B= Cría de rata diabética. Se observa el giro dentado (GD), las regiones CA1 y CA3. Se observa menor número de células piramidales en el hipocampo de crías de madres diabéticas. Técnica de Golgi rápido. Escala de la barra 100 µm.

Con los objetivos 40x y 100x se logró visualizar de manera ideal a las neuronas piramidales del área CA3. En ellas fue fácil distinguir el soma definido en forma piramidal, el axón, la dendrita basal (DB) y la dendrita apical (DA) con las zonas de interés para este trabajo de investigación: la región proximal (RP-DA) y su primera ramificación (1ra R-DA). (Fig. 12). En las CRC se observó la dendrita basal con numerosas ramificaciones dendríticas; en cambio en las neuronas piramidales de CRD se observó una arborización dendrítica escasa (compare figura 12 A con B).



Fig. 12 Fotomicrografías de neuronas piramidales de CA3 de hipocampo dorsal de crías P42 obtenidas de ratas sin diabetes (A y C) y de ratas con diabetes (B y D). Se señala el soma, el segmento proximal de la dendrita apical (SP-DA) y la primera ramificación de la dendrita apical (1ra R-DA). Escala de la barra 25 µm. Técnica de Golgi rápido. Obsérvese la disminución de ramificaciones en la arborización dendrítica basal en las crías de ratas diabéticas comparadas con los controles. (n=30 para c/gpo).

#### 6.4.2. Resultados del conteo de ED.

En la primera ramificación de la dendrita apical se apreciaron diferentes tipos de espinas distribuidas a lo largo de dicha estructura en ambos grupos de estudio. No obstante en el grupo experimental se ven espacios en la dendrita sin ED y las que se aprecian son poco definidas en comparación con las CRC. (Compare figura 13 AC con BD).



Fig. 13. Micrografía que muestra la densidad de ED de la primera ramificación de la dendrita apical (1ra R-DA) de neuronas piramidales del CA3. A y C grupo control, C y D grupo experimental. En el grupos de crías experimentales se aprecia menor densidad de espinas dendríticas comparadas con las controles L=espina larga, C=espina corta, H=espina hongo, O=otro tipo de espinas. Escala de la barra 10 µm. Técnica de Golgi rápido. Observe en el grupo experimental intacto las espinas poco definidas.

El estudio morfométrico de ED en esta región mostró una cantidad significativamente mayor de dichas estructuras plásticas en las CRC en comparación con las CRD (54.55±3.053/42.10±3.034).



Gráfica 12. Densidad de espinas dendríticas (ED) en la primera ramificación de la dendrita apical (1ra R-DA). Las crías obtenidas de ratas control (CRC) presentaron mayor densidad de ED comparado con el grupo experimental (CRD). \*P<0.05

Con respecto al segmento proximal de la dendrita apical la cantidad de espinas fue menor en comparación a la 1ra R-DA en ambos grupos de estudio. La densidad de espinas dendríticas en esta región se muestra en la figura 14 y gráfica 13.

En el grupo control la densidad de espinas dendríticas fue significativamente menor en comparación con el grupo experimental  $(53.55\pm3.05/40.52\pm2.22)$ . p<0.05



Fig.14. Fotomicrografías que muestran la densidad de espinas dendríticas del segmento proximal de la dendrita apical (SP-DA) de neuronas piramidales de CA3 de crías P42 de ambos grupos de estudio. A y C: de crías obtenidas de ratas control. B y D: de crías experimentales. Escala de la barra 25 µm. Técnica de Golgi rápido. L=espina larga, C= espina corta, H=espina hongo y O=otro tipo de espinas.



Gráfica 13. Conteo promedio de espinas de la región proximal (RP) de la dendrita apical de las neuronas piramidales de CA3. (n=30 para c/gpo). \*P<0.05.

La suma total de la densidad total de espinas dendríticas en ambas regiones de estudio (RP-DA y 1ra R-DA) mostraron significativamente una mayor plasticidad dendrítica en las crías de madres que no cursaron con diabetes durante la gestación, mientras que las crías que estuvieron en un ambiente intrauterino hiperglucémico presentan una menor cantidad de espinas dendríticas y por tanto menor plasticidad dendrítica. (Gráfica 14)



Gráfica 14. Densidad total promedio de las ED cuantificadas en los 25 µm de las regiones estudiadas en neuronas piramidales de CA3 del hipocampo dorsal de crías P42 después de la prueba conductual (n=30 para c/gpo). \*P<0.05.

Respecto al tipo de espinas identificadas en las dos regiones de estudio las espinas largas y hongo fueron las que se cuantificaron más. En la gráfica 15 se muestra que la densidad de espinas largas fue significativamente mayor en el grupo control con respecto al experimental con valores de media y desviación estándar. 1ra R-DA fue CRC=15.52 ( $\pm 2.29$ ), CRD=11.05 ( $\pm 2.50$ ) y en RP fue CRC=16.04 ( $\pm 2.28$ ), CRD=11.39 ( $\pm 1.86$ ) y un valor de p≤ 0.05.



Gráfica 15. ED tipo largas. Conteo promedio de ED largas en 25  $\mu$ m en las dos regiones de estudio (SP-DA y 1raR-DA) (n=30 para c/gpo). \* p<0.05.

La densidad del tipo de espinas hongo se muestra en la gráfica 16, presentando un comportamiento igual al del tipo largas, sus valores de media y desviación estándar fueron: 1ra R-DA fue CRC=16.30 (±1.80), CRD=11.11 (±1.70) y en RP CRC=15.33 (±1.36), CRD=10.84 (±1.30) y un valor de P≤0.05.



Gráfica 16. Conteo promedio de las ED Hongo regiones de estudio (SP-DA y 1raR-DA). \*Existen diferencias significativas entre los grupos CRC y CRD (n=30 para c/gpo). \*p<0.05.



Las espinas cortas (Gráfica 17) no aportan resultados significativos. A pesar de que este tipo de espina fue abundante en ambos grupos de estudio.

Gráfica 17. Conteo promedio de las espinas Cortas de las neuronas piramidales de CA3. No existen diferencias significativas entre los grupos CRC y CRD (n=30 para c/gpo). p>0.05

Y el último tipo de espinas cuantificado con el criterio de "otras" (gráfica 18), fue prácticamente similar en ambos grupos de estudio Los valores de media y desviación estándar para el grupo CRC con respecto al grupo CRD fue de: 1ra R-DA fue CRC=10.66 (±1.75), CRD=8.79 (±1.81) y en RP CRC=10.22 (±2.12) CRD=7.42 (±1.46), en este tipo de espinas no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 18. Conteo promedio de otras espina de las neuronas piramidales de CA3. No existen diferencias significativas entre los grupos CRC y CRD. p>0.05

#### 7. Discusión.

El incremento en las discapacidades cognitivas y las conductas aberrantes de los niños y jóvenes correlaciona con una mayor prevalencia de diabetes materna a nivel mundial. Por razones éticas y para lograr conocer los mecanismos celulares que están implicados, en el presente trabajo utilizamos un modelo de diabetes química inducida experimentalmente en la rata mediante la inyección ip de STZ, con la finalidad de conocer la influencia de la diabetes materna en el desarrollo intrauterino y su efecto en las características morfo-funcionales del hipocampo.

Esta es la primera evidencia que correlaciona el desempeño neurocognitivo mediante la prueba conductual de Laberinto acuático de Morris con la plasticidad neuronal en crías prepúberes obtenidas de ratas diabéticas. Aportando así, información para resolver la controversia sobre los efectos de la DM durante el embarazo en el aprendizaje y memoria de su descendencia.

El monitoreo de peso corporal a ratas gestantes fue similar en ambos grupos (Gráfica 1), así como el tamaño de la camada obtenida, lo que pudiera relacionarse a que cuando se inyectó a las ratas gestantes ya había ocurrido el proceso de implantación y que el proceso de organogénesis no fue alterado<sup>64</sup>. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Kiss y colaboradores en 2009<sup>68</sup> quienes señalan una menor ganancia de peso corporal en el grupo de ratas con diabetes inducida (RD), pero los investigadores no consideraron que un menor número de crías obtenidas repercuta en el peso corporal de las ratas gestantes.

Por otra parte, la cuantificación de la hiperglucemia registrada durante y al final del embarazo en las RD, confirmó el efecto diabetogénico eficaz que tiene la estreptozotocina para provocar altas concentraciones de este metabolito en sangre y además que se mantuviera en valores mayores a 200 mg/dl durante toda la gestación (ver Gráfica 2). Esta condición materna inducida, permitió analizar el efecto que provoca este medio ambiente hiperglucémico sobre el desarrollo del SNC, específicamente en hipocampo. Haghir<sup>61</sup> y Hami<sup>69</sup> también encontraron resultados similares a los nuestros y se extrapolan a lo encontrado por Plagemann y cols.<sup>70</sup> en el humano quienes establecen que los hijos de madres diabéticas presentan niveles de glucosa elevados debido a que hay una menor secreción de insulina de las crías, en otros casos se observa una importante resistencia a la insulina. En este exceso en la producción de insulina conlleva a episodios periódicos de hipoglucemia fetal, que puede suponer un daño irreversible para el cerebro.

Aunado a esto, las altas concentraciones de hemoglobina glucosilada fracción A1c, de casi el doble comparado con las RC confirmaron la condición diabética en el grupo de RD. (Ver gráfica 3). Como es bien conocido este parámetro es indicativo de la presencia de hiperglucemia durante toda la gestación debido a que las concentraciones de glucemia fueron directamente proporcionales a la cantidad de hemoglobina enlazada con la glucosa. Dado que la vida promedio de los eritrocitos es de 120 días, se puede evaluar el rango de control glucémico en un periodo largo previo. Existen reportes que señalan a esta proteína de importancia en el seguimiento de la gestante diabética ya que sus valores elevados durante el embarazo, provocado por una hiperglucemia no controlada, están asociados con defectos en el neurodesarrollo en los hijos<sup>10</sup>.

Es importante señalar que en el grupo experimental, el parto se postergó dos días más, es decir, las crías nacieron en el día 23 de la gestación (23dg) en comparación con las ratas del grupo control que parieron el 21dg. Este evento se relacionó con las características morfológicas externas de las crías recién nacidas que aunque presentaron prácticamente el mismo peso corporal al nacer (grafica 4), las crías de madre diabética no estaban totalmente desarrolladas, se apreció un retraso en el desarrollo de los parpados y pabellón auricular; en cambio las CRC presentaron morfología característica propia de un roedor con la maxila prominente. Este acontecimiento se ha relacionado a una desregulación cronológica en diferentes eventos celulares durante el desarrollo embrio/fetal provocada por hiperglucemia materna<sup>64,71.</sup>

Las concentraciones elevadas de glucemia en las CRD antes del destete fueron proporcionales a las concentraciones de glucemia de sus progenitoras (comparar gráficas 2 y 5). Los niveles de glucemia por encima de los valores normales se debieron a la alimentación impartida por la madre, pues la hiperglucemia manifestada en ellas a través de la leche materna, se trasladó también en las crías. Pero una vez que se destetaron las concentraciones de este carbohidrato fueron muy similares a las CRC.

Respecto al monitoreo de peso de ambos grupos de estudio, las CRD presentaron menores valores de peso con respecto a las CRC (Gráfica 4), lo que también se relaciona con los valores de glucemia materna. Bell y colaboradores<sup>72</sup>, refieren que la frecuencia de variación de peso en los HMD parece estar directamente relacionada con la severidad de la hiperglucemia materna, es decir, a mayores niveles de glucemia, mayores defectos o problemas presentarán los hijos.

A diferencia de lo que sucede con los hijos de madres diabéticas que presentan 50% de productos macrosómicos, 30% son de bajo peso al nacer y el 20 % de peso normal, en nuestro modelo de diabetes inducida encontramos el mismo

peso al nacer y conforme avanzo el periodo posnatal fueron perdiendo peso (ver gráfica 4). Probablemente factores epigenéticos, como la diabetes durante el desarrollo intrauterino, en periodos perinatales, repercuten en el crecimiento corporal y provoque defectos neuronales en áreas cerebrales vulnerables como la neocorteza o el hipocampo, produciendo trastornos que van desde la alteración del ciclo celular hasta daños en la integración funcional a lo largo de todo el periodo de vida que podrían mejorarse con la propuesta de novedosas estrategias terapéuticas

Asimismo debido a que se sabe que el grado de maduración del SNC en la rata de 42 días corresponde a un individuo prepuber<sup>73</sup>, etapa en la que la que los procesos de mielinización, macroneurogénesis, gliogénesis y microneurogénesis han acontecido con mayor preponderancia, es posible a partir de los hallazgos en rata hacer inferencias en los adolescentes de esta edad.

Los sujetos de estudio que fueron sometidos a la prueba conductual de Laberinto acuático de Morris, codificaron, almacenaron y recuperaron información acerca las pistas visuales que se les colocaron espacialmente en el cuarto de estudios conductuales, lo que les permitió construir sus mapas cognitivos<sup>74</sup>. Con lo anterior se logró evaluar alteraciones en la consolidación de la memoria espacial de la progenie de ratas diabéticas con respecto a las crías de ratas no diabéticas. Además en esta prueba se valoró la memoria de referencia ya que la plataforma permaneció en el mismo lugar durante los ensayos consecutivos.

La hiperglucemia intrauterina alteró la fase de adquisición o aprendizaje en las CRD porque presentaron latencias de escape prolongadas con respecto a las CRC quienes llegaron en un tiempo menor al cuadrante meta a largo de las sesiones, es decir a la progenie obtenida de ratas diabéticas se les dificultó construir su mapas mentales los primeros días de ensayo, aprendiendo hasta la tercer sesión (gráfica 6 y 7).

La última prueba de retención o ensayo de investigación sin plataforma durante 11.94 segundos confirmó el daño provocado por esta condición materna sobre la memoria espacial y de referencia (gráfica 8). Al dejar pasar los 7 días de la etapa de consolidación sin manipulación adicional, las mediciones de estancia en cada cuadrante muestran la menor capacidad de retención de información de CRD, pues los tiempos de estancia al cuadrante meta son menores en comparación con las crías controles, esto se explica en la gráfica 8. Estos datos se traducen a que CRC recuerdan en mayor medida la tarea espacial enseñada en la fase de adquisición, es decir que la memoria conformada por las crías CRC en la fase de adquisición es mayor en comparación con las crías CRD.

En el caso de los niños de madres diabéticas es de esperar que este tipo de deficiencias no les permita formar mapas cognitivos dependientes de hipocampo lo que les provoca dificultades en el aprendizaje y memoria, ya que incluso a temprana edad tienen problemas para mantener la atención en tareas o juegos que en la etapa escolar se acentúa más y provoca mayores costos al contratar profesionales de educación especial para atender a estos niños.

Nuestros resultados no concuerdan con lo reportado por Delascio y sus colaboradores<sup>44</sup> quienes concluyen que los grupos experimental y control no tuvieron diferencias en los tiempos de latencia de escape. Sin embargo, su diseño experimental varía con respecto al nuestro ya que utilizaron diferente cepa de rata (Wistar vs Spague Dawley) y la edad de aplicación fue a los 60 días posnatales. Lo anterior nos cuestiona si este daño en los procesos de memoria y aprendizaje se compensan en etapas posteriores a los 30 días.

Haider reportó en 2012 una menor adquisición y retención en las ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina evaluadas en LAM, en comparación con las crías de ratas sin inducción, tanto en la fase de adquisición con latencias de escape (55% de deterioro), como en la fase de memoria (40% de deterioro)<sup>52</sup> Además de lo anterior mencionado, un estudio realizado por Kuang en 2014, menciona las deficiencias en el LAM en las crías de rata debido a una dieta alta en sacarosa comparado con crías de rata con dieta normal, encontrando menores capacidades de aprendizaje y memoria debido al incremento en la ingesta de este carbohidrato,<sup>58</sup> que es equivalente con la presente tesis pues esta ingesta de sacarosa generó un aumento de glucemia en la rata gestante ocasionando los déficits de aprendizaje y memoria en la progenie puesta a prueba en LAM.

Hay que resaltar que el LAM es una prueba robusta utilizada para evaluar déficits de memoria mediante el registro de latencias (tiempo) para llegar a la plataforma, pero un reciente artículo de Singh y colaboradores, publicado a finales de 2015 reporta que la latencia no es del todo eficiente para medir alteraciones en el aprendizaje y la memoria. Estos investigadores proponen el método de dimensiones fractales (fractal dimensions) que aseguran una relación más estrecha entre los efectos de los déficit de memoria sobre el hipocampo y la terea espacial impartida al sujeto experimental. Aclarando que esta prueba no sustituye ni sepulta la latencia de escape, pero es un mejor parámetro para evaluar la relación del daño al hipocampo con los déficits en la memoria.<sup>49</sup>Es importante destacar que no se usó esta metodología debido a su fecha reciente de publicación y que utiliza aparatos, instrumentos y software especializado, lo que limita su uso a ciertas áreas con solvencia económica. No obstante lo anterior, hasta el día de hoy las pruebas conductuales son una metodología accesible y eficiente para evaluar procesos cognitivos si se controlan de forma cabal las

variables implicadas a los modelos in vivo, pues un organismo vivo presenta múltiples variables intrínsecas.

La DM inducida no solo afectó a la madre durante el periodo gestacional, sino que también implicó alteraciones del desarrollo cerebral en la descendencia de 42 días posnatales. Aunque el tamaño del cerebro fue prácticamente el mismo (Grafica 10), las CRD que se desarrollaron en un ambiente hiperglucémico mostraron menor peso cerebral (Gráfica 9) y menor densidad celular hipocampal en comparación con aquellos que se desarrollaron en un ambiente normoglucémico (Fig. 11). Estos resultados coinciden con lo encontrado por Fahrenkrog y cols<sup>75</sup>, quienes reportan una disminución en el volumen del cerebro en crías P21 de madres diabéticas; así mismo Yamano y cols en 1986<sup>76</sup> encontraron una disminución en el peso del cerebro en crías de rata P1, P30 y P70.

Por otra parte el hipocampo en ambos grupos de estudio, fue prácticamente similar (gráfica 11) y aunque no cuantificamos la densidad celular por la técnica de impregnación argéntica que se utilizó para evaluar la plasticidad neuronal, estudios previos realizados en el laboratorio de Biología del desarrollo han evidenciado menor densidad celular hipocampal en CRD en comparación con las CRC<sup>53</sup>; datos que coincide con lo publicado por Lotfi y cols<sup>60</sup> en 2016 quienes evidenciaron en el hipocampo menor densidad celular en crías P0, P7 y P14 considerando a la apoptosis como el evento celular preponderante.

Las crías CRC presentaron una mayor estimulación sináptica, debido a la mayor cantidad de ED presentes en comparación con las CRD (Gráfica 14), pues se ha reportado que mientras mayor cantidad de espinas existan hay mayor cantidad de sitios para realizar la sinapsis de tipo excitadora en el hipocampo, captando y procesando con mayor eficiencia la información espacial ambiental compilada por los sentidos mediante el circuito tri-sináptico lo que tendría como resultado un mapeo espacial general almacenado disponible más completo, logrando menores tiempos de latencia en la fase de adquisición y mayores tiempos de estancia en cuadrante meta en la etapa de memoria al momento de comparar los grupos, asegurándonos la existencia de daño a nivel del hipocampo provocado por la hiperglucemia inducida a la rata gestante<sup>53</sup>.

Los datos de la densidad de espinas (DE) por zona de las neuronas piramidales entre los grupos (Gráfica 12 y 13) mostraron que el estado hiperglucémico materno provocó alteraciones plásticas evidenciándose un menor número de espinas dendríticas totales (Gráfica 14). De esta manera las alteraciones funcionales que encontramos durante la prueba conductual de LAM se tradujeron en alteraciones la plasticidad neuronal anatómica, es decir, provocó cambios en la estructura, la distribución y el número de sinapsis. Diversos cambios en la estructura sináptica en diferentes estructuras cerebrales han sido descritos como correlato de diversos aprendizajes y posteriormente de la formación de la memoria<sup>77</sup>. Algunos de los cambios estructurales que resultan de diversas experiencias y de la actividad neuronal son: modificación del tamaño de la densidad postsináptica, cambios en el número y el tipo de espinas dendríticas, cambios en la densidad de botones presinápticos, entre otros<sup>78 79</sup>.

Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Ornoy en 2001<sup>80</sup> quien señala que los HMD en edad escolar presentan deficiencias en funciones motoras finas, y en marcadores cognitivos, y con Van der Zee en 2015<sup>24</sup>, quien señala que una disminución en la densidad de espinas dendríticas está correlacionada con una menor capacidad de aprendizaje y memoria.

Probablemente la diversidad de resultados en el ámbito clínico respecto a este tema es que falta involucrar el nivel socioeconómico de los participantes del estudio. Nomura en el 2012<sup>37</sup> indica que un bajo nivel socioeconómico incrementa el riesgo, es decir, que estos niños expuestos a DMG presentan CI bajo y pobres habilidades de lenguaje. Por su parte Fraser en 2012<sup>38</sup> menciona que hay una correlación negativa entre la DMG y el CI de los hijos provocando que obtuvieran menores puntajes comparados con hijos de madres sin diabetes. Ambos autores nos indican que hay una relación negativa dosis-respuesta entre la hiperglucemia y el CI.

Al hacer la distinción morfológica de las ED en las dos áreas estudiadas del hipocampo dorsal se logró observar que ambos grupos de crías mostraron modificaciones diferenciales en los tipos de espinas. Las ED largas (Gráfica 15) y de hongo (gráfica 16) arrojaron una menor cantidad en el grupo CRD comparado con CRC. Estas espinas dendríticas están vinculadas estrechamente con la memoria y el aprendizaje respectivamente a su grado de maduración. Las espinas hongo tienen una mayor eficiencia sináptica ya que existe una correlación positiva entre el tamaño de la cabeza y el tamaño de la densidad posináptica (PSD), así como con el número de vesículas en la presinapsis<sup>81</sup>.El aprendizaje provocó aumentos en el tipo de espina en forma de hongo y largas en el SP-DA y en la 1ra R-DA. Se ha documentado que el aprendizaje es el estímulo iniciador para la formación y estabilización de la espina y llevado a cabo por cascadas de señalización de actina<sup>23</sup>. En cuanto a las espinas de tipo corta (Gráfica 17) y otras (Gráfica 18) no se encontraron resultados significativos.

Estos resultados permiten inferir que la diabetes durante el embarazo alteró la capacidad de memoria de su descendencia, pues la deficiencia provocada en la integridad del hipocampo dorsal no permitió la consolidación de la información. A este respecto, sugieren que esta situación se dá por la adición de más receptores

glutamatérgicos debido a las señales retrogradas, que consolidan y almacenan la información adquirida, mientras que las espinas cortas infiernen una pérdida de información<sup>20</sup>.

Este comportamiento también se ha observado en la etapa en modelos experimentales adultos diabéticos. Taylor en 2015<sup>53</sup> encontró que las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de CA1 se ven afectadas en ratones inducidos con STZ, mostrado en la menor capacidad de aprendizaje confirmado por latencias de escape mayores y promedio de estancia en el cuadrante meta menores en el laberinto acuático comparado con ratones no inducidos.

La limitada información que relaciona a la DMG con los déficits de aprendizaje y memoria y la disminución de espinas dendríticas compromete a continuar con las investigaciones para generar mayores antecedentes y para sugerir mejores estrategias para hacer frente a la diabetes durante la gestación y disminuir las afecciones que causa esta enfermedad en el déficit cognitivo de la progenie.

#### 8. Conclusiones.

- El menor peso cerebral de crías prepúberes obtenidas de ratas diabéticas, las alteraciones en el patrón de maduración dendrítico, la menor espinogénesis de las neuronas piramidales de CA3 del hipocampo dorsal y su correlación con las alteraciones en el aprendizaje espacial sugieren un efecto deletéreo de la hiperglucemia materna en el neurodesarrollo prenatal que se reflejó en la etapa postnatal.
- Los resultados observados con este modelo biológico sugieren que las deficiencias cognitivas observadas en los hijos de madres diabéticas, pueden estar relacionadas con la dificultad para formar mapas cognitivos dependientes de hipocampo que afectan sus procesos neurocognitivos.

#### 9. Anexos.

#### Anexo 1. Soluciones

#### 1.1. Azul de toluidina.

Azul de toluidina	0.5g
Tetraborato de sodio	0.4g
Agua destilada	100mL

Disolver el tetraborato de sodio en agua caliente y agregar el colorante azul de toluidina. Dejar enfriar y filtrar. Guardar en un recipiente ámbar en refrigeración.

#### 1.2. Estreptozotocina.

Buffer de acetato de sodio 0.1M pH 4.3.

Agua desionizada	10mL
Acetato de sodio	0.1361 g
Ácido acético	Cbp_llegar a pH 4.3

Preparación: Se agrega el acetato de sodio al agua, se ajusta el pH a 4.3 para mantener la actividad de la STZ y se enfría a 4°C.

# Solución de STZ 50 mg/dL.

Buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 4.3	5 mL
STZ	0.25g
Preparación: Mezclar, realizar alícuotas de 1mL y congelarlas.	· ·

1.3. Portaobjetos con gelatina

Gelatina para laminillas.

Agua destilada	500mL
Gelatina nutritiva (marca Fulkabiochemika. Catalogo 70151)	2.5g
Sulfato de cromo y potasio (KCr(S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )4) (marca Fisher Chemicals catalogo C337)	0.25g

Preparación.

- Calentar y mantener la temperatura del agua destilada a más de 50 °C en un matraz de 500 mL o 1L con un agitador magnético.
- Agregar la gelatina.
- > Agregar el KCr( $S_2O_4$ )4.
- Filtrar con papel filtro.

Tratamiento de portaobjetos.

- > Colocar lo portaobjetos en canastillas.
- Lavar en acetonas durante 3 min.
- > Enjuagar en agua corriente de 2 a 3 min.
- > Enjuagar en agua destilada dos veces por 30s cada uno.
- > Sumergirlos en gelatina durante 2 min.
- Secar en horno a 57-100°C.
- > Guardarlos en una caja y anotar la fecha de elaboración.

# Anexo 2. Bitácoras.

# 2.1. Bitácora materna.

No de rata	a							
Fecha de pesado	Peso (g)	Cruza	Тх	Inicio de Tx	Días de gesta	Glucemia mg/dL	HbA1c	Observaciones

# 2.2. Bitácora de crías.

No Rata	No caja	Grupo	Fecha Nac	Des. 21	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

## 2.3. Formato LAM.

Fecha										
	Gpo	No rata	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
D1										
D2										
D3										
D4										
D5										
М										

## 2.4. Formato sacrificio 42P

Fecha de nacimiento Fecha de Sacrificio No materno Grupo											
No cría	Peso (g)	Glucemia	Cerebr	0		Talla (cm)	Género				
		(mg/dL)	Peso (g)	L (mm)	M (mm)						
2.5. Formato de espinas dendríticas.

Grupo	0 0	
Neurona	Región	Primera
	Proximal	Ramificación
	Н	Н
	L	L
	С	С
	0	0

## 10. Referencias.

<sup>1</sup>American Diabetes Association (ADA).Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 37(1). (2014).

<sup>2</sup>Tébar F. Escobar F. La Diabetes en la Práctica Clínica. Médica Panamericana. (2014). 1-9.

<sup>3</sup>Atlas de la Diabetes. Federación Internacional de Diabetes. 6ta edición. (2014).

<sup>4</sup>Meza R. Barrientos-Gutierrez. Rojas-Martinez R. Reynoso-Noverón N. Palacio-Mejia L S. Lazcano-Ponce E. Hernández-Ávila M. Burden of type 2 diabetes in Mexico: past, current and future prevalence and incidence rates. Preventive Medicine. 81. (2015). 445–450.

<sup>5</sup>Ornoy A. Reece A. Pavlinkova G. Kappen C. Kermit Miller R. Effect of Maternal Diabetes on the Embryo, Fetus, and Children: Congenital Anomalies, Genetic and Epigenetic Changes and Developmental Outcomes. Birth Defects Research. 105. (2015). 53–72.

<sup>6</sup>García C. Diabetes mellitus gestacional. Med IntMex. 24. (2008). 148-156.

<sup>7</sup>Ahmed R.G. Evolutionary interactions between diabetes and development. Diabetes Research and Clinical Practice. 92. (2011). 153–167.

<sup>8</sup>Stuart N. Y Kieran. M.D. Diabetes mellitus can affect the nervous system. Ravalli Republic Hamilton Montana. News Bitterroot Neurology. (2011).

<sup>9</sup>Reas E. Azúcar y Salud cerebral: Relacionan la hiperglucemia con una reducción del hipocampo. Mente y cerebro Nº 68. Scientific American. (2014).

<sup>10</sup>Hami J. Shojae F. Vafaee-Nezhad S. Lotfi N. Kheradmand H. Haghir H. Some of the experimental and clinical aspects of the effects of the maternal diabetes on developing hippocampus. World J Diabetes. 15 (2015). 412-422.

<sup>11</sup>Blümcke I. Thom M. Spreafico R. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. Epilepsia. (2013). 1–15.

<sup>12</sup>Lothman E. Bertram E. Stringer J. Functional anatomy of hippocampal seizures. Progress in Neurobiology. 37. (1991). 1-82. <sup>13</sup>Bauer P. and Dugan J. Suggested use of sensitive measures of memory to detect functional effects of maternal iodine supplementation on hipocampal development. Am J Clin Nutr. (2016).

<sup>14</sup>Bayer S. Development of the hippocampal region in the rat I. Neurogenesis examined with H-thymidine autoradiography. Journal of Comparative Neurology. 190. (1980). 87–114.

<sup>15</sup>González Burgos I. Velazquez Zamora A. Gonzalez-Tapia. Cervantes M. A golgi study of the plasticity of dendritic spines in the hypothalamic ventromedial nucleus during the estrous cycle of female rats. Neuroscience. 298. (2015). 74–80.

<sup>16</sup>Lopez-Rojas J. Kreutz M. Mature granule cells of the dentate gyrus—Passive bystanders or principal performers in hippocampal function? Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 64. (2016). 167–174.

<sup>17</sup>Shetty A. Hattiangady B. Postnatal age governs the extent of differentiation of hipocampal CA1 and CA3 subfield neural stem/progenitor cells into neurons andoligodendrocytes. Int. J. Devl Neuroscience. 31. (2013). 646–656.

<sup>18</sup>Fitch J, Juraska J. Washington L. The dendritic morphology of pyramidal neurons in the rat hippocampal CA3 area. I. Cell types. Brain Research. 479. (1989). 105-114.

<sup>19</sup>Pawluski J. L. Valenca A. Santos A. Costa-Nunes J. Steinbusch H. and Strekalova T. Pregnancy or Stress Decrease Complexity of CA3 Pyramidal Neurons in the Hippocampus of Adult Female Rats. Neuroscience 227. (2012). 201–210.

<sup>20</sup>Alvarez V. Sabatini B. Anatomical and Physiological Plasticity of Dendritic Spines. Annu Rev Neurocience. 30. (2007). 79-97.

<sup>21</sup>González-Ramírez M. Velázquez-Zamora D. Olvera-Cortés M. González-Burgos I. Changes in the plastic properties of hippocampal dendritic spines underlie the attenuation of place learning in healthy aged rats. Neurobiology of Learning and Memory. 109. (2014). 94–103.

<sup>22</sup>Kwok-On Lai. Nancy Y. Structural plasticity of dendritic spines: The underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders. Biochimica et Biophysica Acta. 1832. (2013). 2257–2263.

<sup>23</sup>Soria Fregozo C. Pérez Vega M. Participación de las proteínas de unión a la actina y vías de señalización asociadas a la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas. Neurología. 27. (2012). 421-431.

<sup>24</sup>Van der Zee E. Synapses, spines and kinases in mammalian learning and memory, and the impact of aging. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 50. (2015). 77–85.

<sup>25</sup>Zarrinkalam E. Heidarianpour A. Salehi I. Ranjbar K. Komaki A. Effects of endurance, resistance, and concurrent exercise on learning and memory after morphine withdrawal in rats. Life Sciences. 157. (2016).19–24.

<sup>26</sup>Olivares J. Juarez E. García F. El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. Artículo de Revisión.Rev Med UV. (2015).

<sup>27</sup>Biessels GJ. Staekenborg S. Brunner E. Brayne C. Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: A systematic review. Lancet Neurol. 5. (2006). 64-74.

<sup>28</sup>Biessels GJ. Deary IJ. Ryan CM. Cognition and diabetes: a lifespan perspective. Lancet Neurol. 7. (2008), 184–190.

<sup>29</sup> Seaquist ER. The Final Frontier: How Does Diabetes Affect the Brain? Diabetes.
59 (1). (2010). 4-15.

<sup>30</sup>DeBoer T. Wewerka S. Bauer PJ. Georgieff MK. Nelson CA. Explicit memory performance in infants of diabetic mothers at 1 year of age. Dev Med Child Neurol. 47(8). (2005). 525–531.

<sup>31</sup>Hod M, Levy-Shiff R. Lerman M. Schindel B. Ben-Rafael Z. Bar J. Developmental outcome of offspring of pregestational diabetic mothers. J Pediatr Endocrinol Metab. 12(6). (1999). 867–872.

<sup>32</sup>Nelson CA. Wewerka SS. Borscheid AJ. DeRegnier RA. Georgieff MK. Electrophysiologic evidence of impaired cross-modal recognition memory in 8-month-old infants of diabetic mothers. J Pediatr. 142(5). (2003). 575–582.

<sup>33</sup>Sells CJ. Robinson NM. Brown Z. Knopp RH. Long-term developmental follow-up of infants of diabetic mothers. J Pediatr. 125(1). (1994). 9–17.

<sup>34</sup>Townsend E. Georgieff M. Nelson C. Neurobehavioral functioning in five-year-old children born to diabetic mothers. Cognition, Brain, Behavior. 9(2). (2005). 363–381.

<sup>35</sup>Nelson CA. Wewerka S. Thomas KM Tribby-Walbridge S. DeRegnier R. Georgieff M. Neurocognitive sequelae of infants of diabetic mothers. Behav Neurosci. 114 (5). (2000). 950–956.

<sup>36</sup>DeRegnier RA. Nelson CA. Thomas KM. Wewerka S. Georgieff MK. Neurophysiologic evaluation of auditory recognition memory in healthy newborn infants and infants of diabetic mothers. J Pediatr. 137(6). (2000). 777–784.

<sup>37</sup>Nomura Y. Marks DJ. Grossman B. Yoon M. Loudon H. Stone J. Exposure to gestational diabetes mellitus and low socioeconomic status: effects on neurocognitive development and risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in offspring. Arch Pediatr Adolesc Med. 166(4). (2012). 337–343.

<sup>38</sup>Fraser A. Nelson SM. Macdonald-Wallis C. Lawlor DA. Associations of existing diabetes, gestational diabetes, and glycosuria with offspring IQ and educational attainment: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. Exp Diabetes Res. (2012).

<sup>39</sup>Ornoy A. Ratzon N. Greenbaum C. Peretz E. Soriano D. Dulitzky M. Neurobehaviour of school age children born to diabetic mothers. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 79(2). (1998). 94–99.

<sup>40</sup>Rizzo T. Metzger BE. Burns WJ. Burns K. Correlations between antepartum maternal metabolism and child intelligence. N Engl J Med. (1991); 325(13):911–916.

<sup>41</sup>Yamashita Y. Kawano Y. Kuriya N. Murakami Y. Matsuishi T. Yoshimatsu K. Intellectual development of offspring of diabetic mothers. Acta Paediatr. (1996); 85(10):1192–1196.

<sup>42</sup>Camprubi Robles M. Campoy C. Garcia Fernandez L. Lopez-Pedrosa JM. Rueda R. Martin MJ. Maternal Diabetes and Cognitive Performance in the Offspring: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS ONE. 10(11). (2015).

<sup>43</sup>Altman G. Practical Statistics for medical research London, UK. Chapman & Hall. (1991).

<sup>44</sup>Higgins JPT. Thompson SG. Quantifying heterogeneity in meta-analysis. Sta Med. 21(11). (2002).1539–1558.

<sup>45</sup>SzkudelskI T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. Physiol. Res. 50. (2001). 536-546.

<sup>46</sup>Delascio Lopes C. Sinigaglia-Coimbra R. Mazzola J. Camano L. and Mattar R. Neurofunctional Evaluation of Young Male Offspring of Rat Dams with Diabetes Induced by Streptozotocin. International Scholarly Research Network ISRN Endocrinology. (2011).

<sup>47</sup>D'Hooge R. Procter P. De. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain research reviews. 36(1). (2001). 60-90.

<sup>48</sup>Morris RG Spatial localization does not depend on the presence of local cues. Learn Motiv. (1981).

<sup>49</sup>Singh S. Kaur H. Sandhir R. Fractal dimensions: A new paradigm to assess spatial memory and learning using Morris water maze. Behavioural Brain Research. 299. (2016).141–146.

<sup>50</sup>Wang L. and Xu R. The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. Asia Pac J Clin Nutr. 16(1). (2007). 467-472.

<sup>51</sup>Popovic M. Biessels GJ. Isaacson RL. Gispen WH. Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial/object discrimination task. Behav Brain Res. 122. (2001). 201-207.

<sup>52</sup>Haider S. Ahmed S. Tabassum S. Memon Z. Ikram M. Haleem D. Streptozotocininduced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. Acta Neurol Belg. 113. (2013). 35–41.

<sup>53</sup>Taylor S. Trudeaua D. Arnold B. Wang J. Gerrow K. Summerfeldt K. Holmes A. Zamani A. Brocardo P. Brown C. VEGF can protect against blood brain barrier dysfunction, dendritic spine loss and spatial memory impairment in an experimental model of diabetes. Neurobiology of Disease. 78. (2015) 1–11.

<sup>54</sup>Kamal A. Biessels GJ Duis SE. Gispen WH. Learning and hipocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. Diabetogenia. 43. (2000). 500-506.

<sup>55</sup>Ramanathan M. Jaiswal AK. Bhattachary SK. Hyperglycaemia in pregnancy: effects on the offspring behaviour with special reference to anxiety paradigms. Indian J Exp Biol. 38(3). (2000). 231-236.

<sup>56</sup>kinney B. Rabe M. Jensen R.† Steger R. Maternal Hyperglycemia Leads to Gender-Dependent Deficits in Learning and Memory in Offspring. Exp Biol Med. 228. (2003). 152–159.

<sup>57</sup>Chandna A. Kuhlmann N. Bryce C. Greba Q. Campanucci V. Howland J. Chronic Maternal Hyperglycemia Induced During mid-pregnancy in Rats Increases RAGE expression, augments hippocampal excitability, and alters behavior of the offspring. Neuroscience. 303. (2015). 241–260.

<sup>58</sup>Kuang H. Suna M. Lva J. Lia J. Wua C. Chena N. Boa L. Weia X. Gua X. Liua Z. Maoa C. Xu Z. Hippocampal apoptosis involved in learning deficits in the offspring

exposed to maternal high sucrose diets. Journal of Nutritional Biochemistry. 25. (2014). 985–990.

<sup>59</sup>Tehranipour M. Khakzad MR. Effect of maternal diabetes on hippocampus neuronal density in neonatal rats. J Biol Sci. 6. (2008). 1027-1032.

<sup>60</sup>Lotfi N. Hami J. Hosseinid M. Haghira D. Haghir H. Diabetes during pregnancy enhanced neuronal death in the hippocampus of rat offspring. Int. J. Devl Neuroscience 51. (2016). 28–35.

<sup>61</sup>Haghir H. Rezaee A. Sankian M. Kheradmand H. Hami J. The effects of induced type-I diabetes on developmental regulation of insulin & insulin like growth factor-1(IGF-1) receptors in the cerebellum of rat neonates. Metab Brain Dis. 28. (2013). 397–410.

<sup>62</sup>Yu-Hong Jing. Yan-Feng Songa. Ya-Ming Yaoa, Jie Yina. De-gui Wanga. Li-Ping Gao. Retardation of fetal dendritic development induced by gestational hyperglycemia is associated with brain insulin/IGF-I signals. Int. J. Devl Neuroscience. 37. (2014). 15–20.

<sup>63</sup>Lleverino T. L. Alteraciones en la plasticidad neuronal hipocampal en crías de ratas diabéticas sometidas a conducta de reconocimiento de objetos. Tesis para obtener el título de Licenciatura en Medicina. Universidad Juárez del Estado de Durango, Campus Gómez Palacios Durango (2013).

<sup>64</sup>Berrones S.K.I. Efecto de la diabetes materna inducida sobre la citodiferenciación neuronal hipocampal de la progenie. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud. Escuela Superior de Medicina IPN. (2015).

<sup>65</sup>Chávez G.P. Patrón de expresión de Nestina, ß-tubulina III Y MAP-2 en el hipocampo de crías de ratas diabéticas recién nacidas y 30 días. análisis por Western Blot. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología. Universidad Tecnológica de Tecámac. (2015).

<sup>66</sup>Salazar García M. Reyes Maldonado E. Revilla Monsalve M. Villavicencio Guzmán L. Reyes López A. Sánchez-Gómez C. Importance of Maternal Diabetes on the Chronological Deregulation of the Intrauterine Development: An Experimental Study in Rat. Journal of Diabetes Research. (2015).

<sup>67</sup>Paxinos G. Watson C. The Rat Brain. In Sterotaxic Coordinates. 6th edition .Academic Pres. Elservier. (2007). 60-70.

<sup>68</sup>Kiss A. Lima P. Sinzato Y. Takaku M. Takeno M. Rudge M. Damasceno D. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. Diabetology & Metabolic Syndrome. (2009) 1-21.

<sup>69</sup>Hami J. Sadr-Nabavi A. Sankian M. Balali-Mood M. Haghir H. The effects of maternal diabetes on expression of insulin-like growth factor-1 and insulin receptors in male developing rat hippocampus. Brain Struct Funct. 218. (2013). 73–84.

<sup>70</sup>Plagemann A. Harder T. Kohlhoff R. Rohde W. Dorner G: Glucose tolerance and insulin secretion in children of mothers with pregestational IDDM or gestational diabetes. Diabetologia. 40(9). (1997). 1094-1100.

<sup>71</sup>Padmanabhan R. Shafiullah M. Intrauterine Growth Retardation in Experimental Diabetes: Possible Role of the Placenta. Archives of physiological and biochemestry. 109(3). (2001). 260-271.

<sup>72</sup>Bell R. Glinianaia S.V. Tennant P.W. Bilous R.W. Rankin J. Peri-conception hyperglycaemia and nephropathy are associated with risk of congenital anomaly in women with pre-ex. Diabetologia. 55. (2012). 936–947.

<sup>73</sup>Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. Int J Prev Med. 4(6). (2013). 624–630.

<sup>74</sup>Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods. 11. (1984). 47-60.

<sup>75</sup>Fahrenkrog S. Harder T. Stolaczyk E. Melchior K. Franke K. Joachim Dudenhausen W. and Plagemann A. Cross-Fostering to Diabetic Rat Dams Affects Early Development of Mediobasal Hypothalamic Nuclei Regulating Food Intake, Body Weight, and Metabolism. Nutritional Neurosciences. (2004).

<sup>76</sup>Yamano T. Shimada M. Fujizeki Y. Kawasaki H. Onaga A. Quantitative synaptic changes on Purkinje cell dendritic spines of rats born from streptozotocin-induced diabetic mothers. Brain Dev. 8. (1986). 269–273.

<sup>77</sup>Leuner B. Falduto J. Shors TJ. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. J Neurosci. 23(2). (2003). 659-665.

<sup>78</sup>Holtmaat A. Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain.Nat. Rev. Neurosci. 10. (2009). 647–658.

<sup>79</sup>Wang H. Hu Y. Tsien J. Z. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. Prog. Neurobiol. 79. (2006). 123–135.

<sup>80</sup>Ornoy A. Ratzon N. Greenbaum C. Wolf A. Dulitzky M. School-age children born to diabetic mothers and to mothers with gestational diabetes exhibit a high rate of inattention and fine and gross motor impairment. J Pediatr Endocrinol Metab.14(1). (2001). 681-689.

<sup>81</sup>Harris K. Stevens J. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. J Neurosci. 9(8). (1989). 2982-2997.