



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA “Isidro Espinoza de los Reyes”

Papel del receptor H₁ sobre la activación de PKC en el neuroepitelio cortical de embriones de rata diabética: posible participación en la translocación nuclear de FoxP2

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Biol. Diana Sarahi de la Merced García

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Anayansi Molina Hernández

Instituto Nacional de Perinatología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Néstor Fábian Díaz Martínez

Instituto Nacional de Perinatología

Dr. Octavio César García González

Facultad de Psicología, UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Agosto 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la oportunidad brindada para continuar con mi formación académica.

Al Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes” (INPer) por el financiamiento otorgado al proyecto 2019-1-11.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado a través de la beca con número CVU **818206** durante el periodo que tomó la realización de esta tesis.

A mi tutora, la Dra. Anayansi Molina Hernández por su total apoyo en mi formación como investigadora, así como para la realización de este proyecto

Al Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez y al Dr. Octavio César García González por el apoyo brindado para la mejora de este trabajo.

A los miembros del Jurado, Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda, Dra. Aurea Orozco Rivas, Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez y Dr. David Erasmo García Díaz por sus valiosos comentarios que fortalecieron este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la **Dra. Anayansi Molina Hernández** quien me ha permitido seguir formando parte de su equipo, por la confianza y apoyo académico, técnico y moral que me ha brindado durante todo este tiempo.

Al **laboratorio de Investigación de Células Troncales y Biología del Desarrollo** y a mis compañeros, especialmente a...

La **Dra. Nayeli Rivera** por su apoyo en el laboratorio y por su valiosa amistad, llegaste a hacer diferente el laboratorio, gracias por compartir tu conocimiento, experiencia y amistad, eres una persona súper especial para mí y siempre estaré agradecida por haberme encontrado contigo en el laboratorio, contigo todo fue más bonito ¡Te quiero y te admiro demasiado!

Al futuro **Médico Juan H. Yonca**, y a la futura **Bióloga Molecular Fernanda Pérez**, a pesar de que llegaron a la parte final de esta etapa, han sido una pieza esencial y muy valiosa en esto, gracias por llegar en la semana donde estaba vuelta loca sacando resultados, gracias por ayudarme, por permitirme compartir con ustedes lo que me gusta hacer "Ciencia", por ser parte de su formación y darme la oportunidad de seguir aprendiendo con ustedes... y aun mejor la llegada de la **futura Bióloga Rebeca Hernández** que vino a sumar al trio. Los tres son personas excepcionales que han llegado a sumar a mi vida, gracias por regalarme esos momentos de risas, los quiero muchísimo y en verdad se han convertido parte de mi familia.

¡Gracias a todas las personas que estuvieron conmigo durante todo este proceso!

DEDICATORIA

A mi abuelita Francisca Zaldívar que con amor todos te llamamos "Panchita". De la manera menos esperada te convertiste en un gran aprendizaje y diste un giro a mi vida justo en este momento de mi formación, Te amo y estaré eternamente agradecida con la vida y con Dios por todo lo que hemos vivido.

¡Siempre estaré contigo!

Dívina tu... Panchita

CONTENIDO

I.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
II.	ÍNDICE DE TABLAS.....	8
III.	SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	9
IV.	RESUMEN.....	12
V.	ABSTRACT.....	13
VI.	INTRODUCCIÓN.....	14
	1. La corteza cerebral.....	14
	1.1 Neurogénesis cortical.....	14
	2. La histamina en la corticogénesis.....	17
	3. La diabetes materna y el desarrollo del sistema nervioso central	21
	4. El factor de transcripción FoxP2.....	25
	4.1 Función de FoxP2 en la Corticogénesis.....	26
	4.2 La fosforilación como regulador de la translocación nuclear	27
	5. Proteínas Cinasas C (PKC).....	29
	5.1 Activación de PKC clásicas y nuevas.....	30
VII.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
VIII.	HIPÓTESIS.....	35
IX.	OBJETIVOS.....	35
X.	MATERIAL Y MÉTODOS	36
	1. Animales.....	36
	2. Inducción a diabetes materna.....	36
	3. Bloqueo farmacológico del RH ₁	37
	4. Obtención de embriones.....	37
	5. Extracción de RNA	38
	6. Reacción de Retrotranscripción (RT)	38
	7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	39
	8. PCR en tiempo real “cuantitativa” (qPCR).....	40
	9. Extracción y electroforesis de proteínas	41
	10. Western Blot.....	43
	11. Análisis estadístico	44

XI. RESULTADOS	45
1. La corteza cerebral.....	45
2. Expresión de PKC en el neuroepitelio cortical de embriones E12.....	46
3. Nivel de activación de PKC α en el neuroepitelio cortical de embriones E12.....	48
4. Marcadores de CTN y PI en el neuroepitelio cortical de embriones E12....	49
XII. DISCUSIÓN.....	51
XIII. CONCLUSIONES	56
XIV. LITERATURA CITADA	57

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corticogénesis en la rata.....	16
Figura 2. Vía de señalización del RH ₁	19
Figura 3. El RH ₁ incrementa la diferenciación neuronal del fenotipo FoxP2 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	20
Figura 4. La diabetes materna incrementa la diferenciación y maduración neuronal	23
Figura 5. La diabetes materna incrementa la expresión y el nivel de proteína del RH ₁ en el neuroepitelio cortical	24
Figura 6. Expresión de FoxP2 en la corteza cerebral de ratón	26
Figura 7. Sitios putativos de fosforilación por PKC.....	29
Figura 8. Estructura de las subfamilias de las PKC.....	31
Figura 9. Análisis de la expresión de FoxP2 en el neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabética	45
Figura 10. Análisis del contenido nuclear y citoplasmático de FoxP2 en el neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabética...	46
Figura 11. Análisis de la expresión de PKC en el neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabética	47
Figura 12. Análisis del nivel de PKC α activa en el neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabética	48
Figura 13. Análisis de marcadores de CTN Sox9 y Pax6 en extractos nucleares del neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabética...	49
Figura 14. Análisis del nivel de proteína del marcador de PI Tbr2 en el neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabéticas	50

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de “primers” utilizadas en la RT-qPCR.....	40
Tabla 2. Resumen de los Rangos Dinámicos.....	41
Tabla 3. Anticuerpos primarios.....	43

III. SIGLAS Y ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementario
4E-BP1	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1</i>
Cdk2	<i>Cyclin Dependent Kinase 2</i>
Cdk4	<i>Cyclin Dependent Kinase 4</i>
CHO	Línea celular de ovario de hámster chino
CR	Neuronas de Cajal-Retzius
Ctip2	<i>COUP-TF-interacting protein 2</i>
CTN	Células troncales neurales
Cux1	<i>Cut Like Homeobox 1</i>
Cux2	<i>Cut Like Homeobox 2</i>
DAG	Diacilglicerol
Dcx	<i>Doublecortin</i>
Disc1	<i>Disrupted In Schizophrenia 1 Protein</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos
E	Día embrionario
Fezf2	<i>FEZ Family Zinc Finger 2</i>
FGFR2-IIIC	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2-IIIC</i>
FGFR3	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i>
Fox	<i>Forkhead box Family Transcription Factors</i>
FoxM1	<i>Forkhead Box M1</i>
FoxO3A	<i>Forkhead Box O3A</i>
FoxO4	<i>Forkhead Box O4</i>
FoxP	<i>Forkhead box P Subfamily Transcription Factors</i>
FoxP2	<i>Forkhead Box P2</i>
Gap43	<i>Growth Associated Protein 43</i>
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GR	Glía radial
HA	Histamina
Id	<i>Inhibitor of differentiation proteins</i>
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol

JNK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 8</i>
L	Lámina de la Corteza Cerebral
L II	Lámina Granular Externa
L III	Lámina Piramidal Externa
L IV	Lámina Granular Interna
L V	Lámina Piramidal Interna
L VI	Lámina Multiforme
MAP2	<i>Microtubule Associated Protein 2</i>
MEK/MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mRNA	RNA mensajero
Nav2	<i>Neuron Navigator 2</i>
Nedd9	<i>Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9</i>
Ngn1	<i>Neurogenin 1</i>
P	Día posnatal
p21^{Cip1}	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
p27^{Kip1}	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B</i>
Pax6	<i>Paired Box 6</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDK-1	Cinasa dependiente de fosfoinositol
PI	Progenitores Intermedios
PKC	Proteínas cinasa C
PLCβ	Fosfolipasa C β
Prox1	<i>Prospero Homeobox 1</i>
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
Raf	<i>Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>
RH₁	Receptor a Histamina tipo 1
RH₂	Receptor a Histamina tipo 2
RH₃	Receptor a Histamina tipo 3
RH₄	Receptor a Histamina tipo 4
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Reacción de transcriptasa reversa
Satb2	<i>SATB Homeobox 2</i>

SNC	Sistema nervioso central
Sox2	<i>SRY-Box Transcription Factor 2</i>
Sox9	<i>SRY-Box Transcription Factor 9</i>
STZ	Estreptozotocina
Tbp	<i>TATA-Box Binding Protein</i>
Tbr1	<i>T-Box, Brain 1</i>
Tbr2	<i>Eomesodermin</i>
U-373 MG	Línea celular U-373 MG de glioblastoma
ZV	Zona ventricular

Nota: La nomenclatura convencional

(<https://www.biosciencewriters.com/Guidelines-for-Formatting-Gene-and-Protein-Names.aspx>) de los genes y mRNA determina que deben estar en cursiva y mayúscula para el humano (ej. *FOXP2*), y minúscula para roedores y otros vertebrados (ej. *FoxP2*). Las proteínas no se ponen en cursiva (ej. FOXP2 para humano y FoxP2 para roedores).

IV. RESUMEN

La neurogénesis cortical es un proceso en donde las etapas celulares de proliferación y diferenciación ocurren en periodos específicos que están determinados por la expresión de factores de transcripción y por la acción de moléculas extracelulares. En la rata, la mayor expresión y densidad reportada para el receptor a histamina H₁ (RH₁) coincide con el inicio de la diferenciación neuronal, en el día embrionario (E) 12 (E12). Además, la activación del RH₁ *in vitro* aumenta la diferenciación neuronal del fenotipo *Forkhead Box P2* (FoxP2), mientras que, su bloqueo *in vivo* disminuye la diferenciación de neuronas FoxP2⁺. FoxP2, además de ser marcador de neuronas de la lámina profunda, es un factor de transcripción que durante la corticogénesis participa en la transición de células troncales neurales (CTN) a progenitores intermedios, y en la adquisición del compromiso neuronal para el establecimiento de las láminas profundas de la corteza cerebral.

De manera interesante, la diabetes materna promueve alteraciones durante la corticogénesis, entre las cuales se han reportado el incremento del RH₁, de la proteína de FoxP2 nuclear presumiblemente en las CTN y de marcadores neurogénicos en E14. El bloqueo farmacológico de RH₁ en E12 previene el aumento de la neurogénesis y de FoxP2 nuclear en embriones de madres diabéticas. El RH₁, es un receptor acoplado a una proteína G_{αq/11}, que a través de segundos mensajeros activa a las PKC, un tipo de enzimas que regula la función de diversas proteínas a través de la fosforilación. En un análisis bioinformático identificamos sitios putativos de fosforilación de PKC en regiones cercanas a las secuencias de localización nuclear de FoxP2; esto, junto con el efecto del bloqueo de RH₁ en la localización celular de FoxP2 observado en el telencéfalo dorsal de embriones en el E14 expuestos a alta glucosa, sugiere que la translocación nuclear de FoxP2 podría estar regulada por la activación de RH₁.

Por lo anterior este trabajo tuvo como objetivo evaluar cambios en el nivel de FoxP2 nuclear, cambios en la expresión de PKC clásicas y PKC δ , y analizar la posible participación del RH₁ en el nivel de actividad de la PKC α en el telencéfalo de embriones de rata diabética de E12 a través de la administración sistémica de clorfeniramina a las ratas hiperglucémicas en E12.

Los resultados muestran que el neuroepitelio cortical de embriones en E12 de ratas diabéticas presenta un incremento en la expresión de PKC α y PKC δ , un aumento de la forma activa de PKC α que fue parcialmente prevenida por la clorfeniramina, y un aumento de la proteína de Sox9. Los resultados sugieren que la hiperglucemia promueve una mayor actividad de PKC α debido en parte a una mayor actividad del RH₁, fenómeno que podría ser responsable de una mayor translocación nuclear de FoxP2 y consecuentemente una mayor neurogénesis en el diabético.

V. ABSTRACT

Cortical neurogenesis is a process where the cell proliferation and differentiation occur in specific periods determined by expression of transcription factors and action of extracellular molecules. In the rat, the highest expression and density reported for histamine type 1 receptor (H₁R) coincides with the start of neuronal differentiation (E12). Furthermore, it has been recently reported that H₁R activation increases FoxP2⁺ neuronal differentiation *in vitro*, while its *in vivo* blockade decreases the differentiation of FoxP2⁺ neurons. FoxP2, in addition to being a marker for deep layer neurons, is a transcription factor that during corticogenesis promotes the transition from neural stem cells (NSCs) to intermediate progenitors for the generation of deep layers cortical neurons.

Interestingly, maternal diabetes promotes alterations during corticogenesis, among which are the increase in: RH₁ expression, nuclear FoxP2 protein presumably in CTN, and in neurogenic markers at E1. In contrast the pharmacological blockade of RH₁ at E12 prevents the increased neurogenesis and nuclear FoxP2 in embryos of diabetic mothers. RH₁ is a G_{αq/11} protein coupled receptor, which through second messengers activates PKC, an enzyme that regulates the function of various proteins through phosphorylation. A bioinformatic analysis identified putative PKC phosphorylation sites in FoxP2 regions close to the nuclear localization sequences, this together with the effect of RH₁ blockade on the cellular localization of FoxP2 observed in the dorsal telencephalon of E14 embryos exposed to high glucose, suggests that FoxP2 nuclear translocation might be regulated through RH₁ activation.

Therefore, the aim of this work was to evaluate changes in the level of nuclear FoxP2, in the expression of classical PKC and PKC δ , changes in the active form of PKC α , and to evaluate the possible participation of RH₁ in PKC α activity through the systemic administration of chlorpheniramine to hyperglycemic rats in E12 embryos.

The results showed that in the cortical neuroepithelium of E12 embryos of diabetic rats showed increased expression of PKC α and PKC δ , an increase in the active form of PKC α that was partially prevented by chlorpheniramine, and an increase in Sox9 protein. The results suggest that hyperglycemia promotes increased PKC α activity due in part to increased RH₁ activity, a phenomenon that could be responsible for increased nuclear translocation of FoxP2 and consequently increased neurogenesis in diabetics.

VI. INTRODUCCIÓN

1. La corteza cerebral

La neocorteza en los mamíferos es una estructura compuesta por múltiples subtipos de células neuronales y gliales organizadas radialmente en seis láminas (I-VI) y tangencialmente en distintos dominios funcionales, una disposición que aumenta su eficiencia en funciones de alta complejidad como el pensamiento, la cognición y el comportamiento social (Lui *et al.*, 2011; Florio y Huttner, 2014). Las neuronas que integran la neocorteza poseen perfiles genéticos, morfológicos y funcionales únicos lo que evidencia la gran diversidad neuronal y funcional.

En general, alrededor del 80% de las neuronas de la corteza cerebral son excitadoras glutamatérgicas, que nacen durante el desarrollo a partir del prosencéfalo/telencéfalo dorsal. Los neuroblastos que dan origen a las neuronas glutamatérgicas migran de manera radial, para formar las láminas de la corteza cerebral, iniciando por la lámina (L) multiforme (L-VI), seguida por la piramidal interna (L-V), la granular interna (L-IV), la piramidal externa (L-III) y la granular externa (L-II). El 20% restante corresponde a interneuronas GABAérgicas (neuronas inhibitorias) que migran de manera tangencial desde dos protuberancias del telencéfalo ventral en desarrollo llamadas eminencias ganglionares media y caudal (Florio y Huttner, 2014; Lodato y Arlotta, 2015; Greig *et al.*, 2013).

1.1 Neurogénesis cortical

La neurogénesis cortical se da en la región más frontal-dorsal del tubo neural y es un proceso controlado de manera temporal y espacial que inicia durante el desarrollo temprano del embrión e incluye las etapas celulares de división, migración, diferenciación neuronal, formación de dendritas y axones, sinaptogénesis y el establecimiento de la conectividad neuronal. El proceso de neurogénesis inicia a partir de un epitelio simple conformado por células troncales neurales (CTN), un tipo celular multipotente que posee dos características principales, la autorrenovación a través de la división simétrica proliferativa y la capacidad de generar tipos celulares especializados del sistema nervioso central

(SNC) a través de las divisiones asimétricas o simétricas no proliferativas (Gage, 2000; He *et al.*, 2009).

En la rata, la corticogénesis inicia a partir del E10 cuando las CTN expanden su población a través de divisiones simétricas asincrónicas en la superficie de la zona ventricular (ZV) y que al migrar a lo largo del eje apical-basal forman un epitelio estratificado dando origen a otro tipo de CTN, la glía radial (GR), que se caracteriza por su morfología polarizada, mostrando uniones basales y apicales a la superficie ventricular y la superficie pial, respectivamente. El proceso apical funciona como andamio migratorio y el proceso basal participa en la autorrenovación de las CTN (Figura 1; Clancy *et al.*, 2001; Bergström y Forsberg-Nilsson, 2012; Taverna *et al.*, 2014; Fish *et al.*, 2008).

Durante el desarrollo embrionario, se han empleado como marcadores de GR a los factores de transcripción Sox9, Sox2 y Pax6, debido a su función sobre el mantenimiento de esta población y al patrón de división que promueven. De manera interesante, la orientación del huso mitótico con respecto al lumen ventricular determina el tipo de división, de tal manera que la orientación vertical dará lugar a divisiones simétricas, mientras que la orientación horizontal u oblicua dará lugar a divisiones asimétricas (Mora-Bermúdez *et al.*, 2014; Shitamukai *et al.*, 2011; Mora-Bermúdez y Huttner, 2015).

El primer tipo celular especializado en diferenciarse es el neuronal, generado de manera directa de la GR a través de divisiones asimétricas, o de manera indirecta a través de progenitores intermedios (PI), un tipo celular restringido al linaje neuronal. Los PI también tiene un ciclo celular activo que le permite amplificar el número de neuronas dentro de la corteza cerebral, y se distingue por la expresión de Tbr2, un factor de transcripción requerido para la diferenciación oportuna de las neuronas glutamatérgicas (Greig *et al.*, 2013; Mora-Bermúdez *et al.*, 2014; Mihalas *et al.*, 2016; Bergström y Forsberg-Nilsson, 2012; Hevner, 2019).

Para el E11 la GR dará origen a neuronas que formarán una estructura transitoria denominada preplaca que al estratificarse dará origen a la subplaca y a la zona

marginal. La subplaca es una estructura cortical transitoria que tiene un papel esencial en el establecimiento de circuitos intra y extracorticales; mientras que la zona marginal contiene una población celular de gran importancia para la migración de los neuroblastos, las células de Cajal-Retzius (CR), que se caracterizan por expresar Reelina, una glicoproteína de matriz extracelular que es una señal de alto para la migración de los neuroblastos (Kwan *et al.*, 2012; Gil-Sanz *et al.*, 2013).

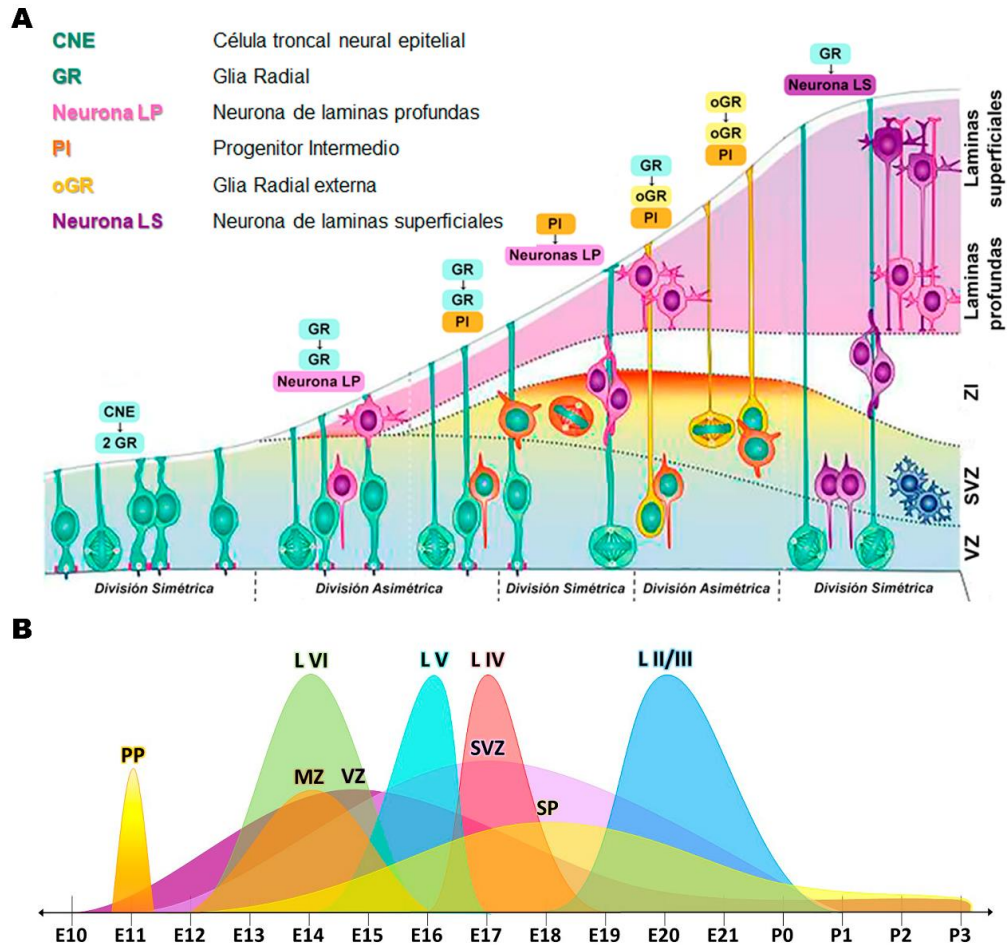


Figura 1. Corticogénesis en la rata. A) Línea temporal de los eventos que dan lugar a la corteza cerebral a partir del telencéfalo dorsal en embriones de rata. Se muestran los tipos celulares generados a partir de divisiones simétricas y asimétricas de las células progenitoras (verde). SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular. Modificado de Paridaen y Huttner, 2014. **B)** Curso temporal de la neurogénesis cortical. Las edades embrionarias (E) y postnatales (P) se indican en la parte inferior y corresponden al periodo de proliferación en la ZV y ZSV (morado y lila), y los momentos de diferenciación de cada lámina cortical. PP, preplaca; ZM, zona marginal; ZV, zona ventricular; ZSV, zona subventricular; SP, subplaca; L, lámina de la corteza cerebral. Construido a partir de Clancy *et al.*, 2001. *Translating developmental time across mammalian species*, en <http://translatingtime.org/>

La diferenciación neuronal inicia en E12 y sigue un patrón de laminación cortical de adentro hacia afuera, en donde las primeras neuronas en diferenciarse son las neuronas de proyección corticotalámica que integrarán a la L VI y pueden ser identificadas por la expresión de Tbr1 y FoxP2 quienes dan la identidad a este tipo celular. Posteriormente, la generación de las neuronas de proyección subcerebral conformarán la L V y está determinado por la expresión de Fezf2 y Ctip2. Para E16 la expresión de Cux1, Cux2 y Satb2 favorecen la generación de neuronas estrelladas espinosas y neuronas de proyección cortical que integrarán a las L IV y L II/III, respectivamente (Gaspard y Vanderhaeghen, 2011; Greig *et al.*, 2013; Martynoga *et al.*, 2012; Domínguez *et al.*, 2013).

Posterior a la diferenciación comienza la maduración neuronal, la cual puede ser identificada por la expresión de la proteína MAP2 que promueve el ensamblaje, la estabilidad y la inhibición de la polimerización de los microtúbulos, y participa en la generación de las neuritas (Goedert *et al.*, 1991).

En resumen, la relación de las subpoblaciones de CTN y PI con respecto a la polaridad celular, la orientación del huso mitótico, el patrón de división celular y los destinos neuronales adquiridos por las células hijas durante periodos específicos de la neurogénesis cortical están determinados por la expresión de factores de transcripción y por la acción de moléculas extracelulares que en conjunto, regulan vías específicas que permiten la correcta formación y funcionamiento de la corteza cerebral. La perturbación de las señales implicadas en la neurogénesis se ha relacionado con la patogenia de enfermedades del neurodesarrollo postnatal, sin embargo, los mecanismos implicados no han sido dilucidados en su totalidad.

2. La histamina en la corticogénesis

El sistema histaminérgico es de los primeros sistemas de neurotransmisores en ser detectado durante el desarrollo embrionario de la rata, donde las responsables de la síntesis de HA fetal es una población de neuronas positivas a histamina (HA) y serotonina que se localizan en el mesencéfalo y el rombencéfalo, denominado sistema histaminérgico transitorio. Para E18, estas neuronas mantendrán

únicamente el fenotipo celular serotoninérgico por lo que dejarán de producir HA y conformarán el núcleo del rafe en el cerebro adulto (Auvinen y Panula, 1988; Vanhala *et al.*, 1994).

En el prosencéfalo de rata, la mayor concentración de HA (cinco veces mayor a la reportada en el cerebro adulto) se da entre el E14-E16, y esta disminuye paulatinamente para el E20, donde alcanza la concentración reportada en el adulto. La alta concentración de HA embrionaria se le ha atribuido al sistema histaminérgico transitorio, al paso de la amina a través de la barrera materno-fetal, y a la síntesis por la placenta (Auvinen y Panula, 1988; Wada *et al.*, 1991; Vanhala *et al.*, 1994; Molina-Hernández *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2017).

La HA ejerce su función al activar a receptores acoplados a proteínas G (RH₁, RH₂, RH₃ y RH₄). Durante la corticogénesis se ha reportado la expresión de RH₁ y RH₂ desde el E12, mientras que el RH₃ a partir del E14. De manera interesante, la mayor expresión del RH₁ y la alta concentración de HA coinciden con el inicio y el pico neurogénico, respectivamente (Vanhala *et al.*, 1994; Solís *et al.*, 2017; Héron *et al.*, 2001). Lo anterior sugiere que esta amina biogénica participa en el neurodesarrollo como lo han planteado algunos estudios *in vivo* e *in vitro* (Molina-Hernández y Velasco, 2008; Molina Hernández *et al.*, 2013).

La HA estimula la proliferación de las CTN y la neurogénesis a través de la activación diferencial de RH₂ y RH₁, respectivamente. En particular el RH₁ en la rata es una proteína membranal de 486 aminoácidos y está organizado en un dominio amino terminal extracelular, siete dominios transmembranales y un dominio carboxilo terminal intracelular, acoplado a la proteína G $\alpha_{q/11}$, por lo que su activación por unión de su ligando endógeno o por actividad constitutiva, promueve la hidrólisis de la proteína G $\alpha_{q/11}$, la activación de la fosfolipasa C β (PLC β), y la consecuente hidrólisis de fosfolípidos de membrana para generar dos segundos mensajeros, el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). El IP₃ se une a receptores localizados en la membrana de retículo endoplásmico promoviendo la liberación de Ca²⁺ intracelular, mientras que el DAG activa a las proteínas cinasa C [PKC] (Haas *et al.*, 2008; Molina-Hernández *et al.*, 2012). Se ha reportado en otros sistemas que

tanto la PKC α como la PKC δ pueden activarse a través del RH₁ (Figura 2; Megson *et al.*, 2001; Mizuguchi *et al.*, 2021).

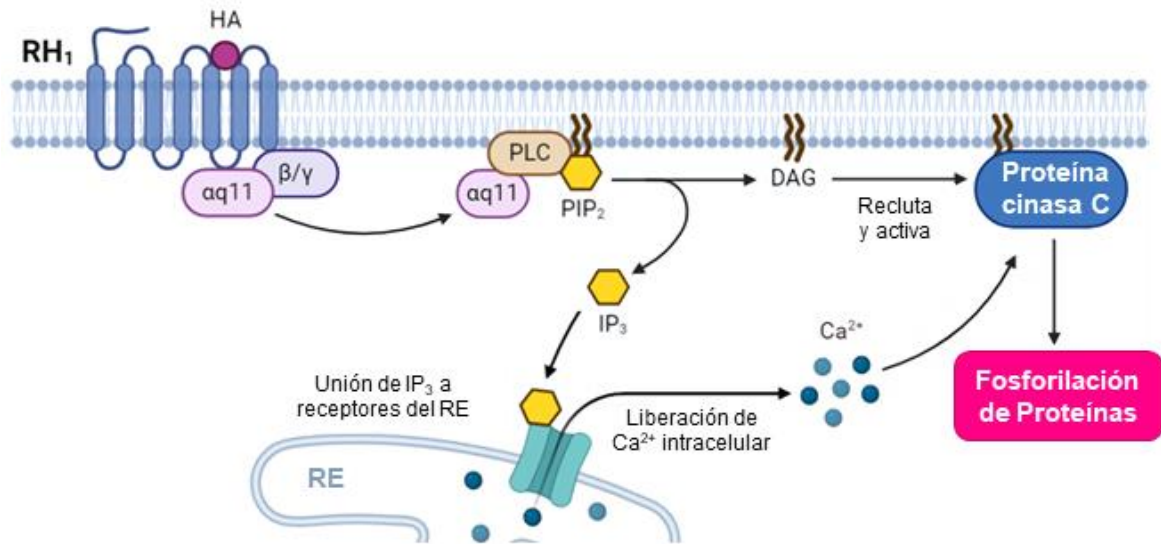


Figura 2. Vía de señalización del RH₁. HA, histamina; PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglicerol; IP₃, 1,4,5-trifosfato de inositol, RE, retículo endoplasmático.

De manera interesante, y como ya se mencionó, en la rata la mayor expresión y densidad reportada para el RH₁ coincide con el inicio de la corticogénesis (E12), lo que sugiere que el RH₁ tiene un papel importante en este proceso (Solís *et al.*, 2017; Márquez-Valadez *et al.*, 2019). Esto es apoyado por evidencia que muestra que la activación de RH₁ en CTN en proliferación aumenta la diferenciación neuronal del fenotipo de lámina profunda FoxP2 (Figura 3A), mientras que, la inyección intrauterina de clorfeniramina (antagonista/agonista inverso del RH₁) en el lumen ventricular de embriones de rata E12 disminuye tanto la diferenciación neuronal del fenotipo FoxP2 en el neuroepitelio cortical E14 (Figura 3B), y la administración sistémica a ratas diabéticas previene la neurogénesis incrementada en embriones de E14 (Molina-Hernández y Velasco, 2008; Molina-Hernández *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2017).

Al parecer, el RH₁ promueve el compromiso neuronal al aumentar la expresión de factores relacionados con la diferenciación glutamatérgica Ngn1, Prox1 y de los receptores al factor de crecimiento fibroblástico FGFR2-IIIC y FGFR3, y a un

aumento en las divisiones asimétricas de las CTN (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2012). Además, la funcionalidad de la vía del RH₁ se ha demostrado por los transitorios de Ca²⁺ intracelular generados por la activación del receptor en CTN (Molina-Hernández *et al.*, 2013).

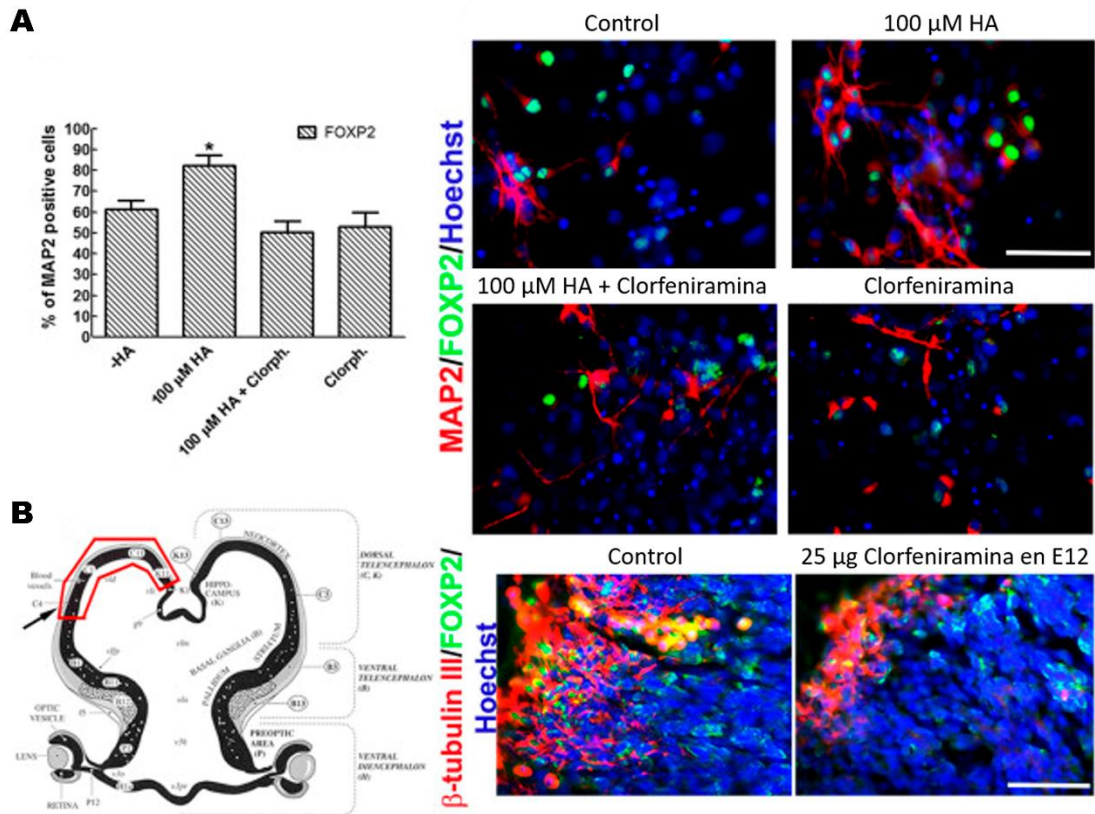


Figura 3. El RH₁ incrementa la diferenciación neuronal del fenotipo FoxP2 *in vitro* e *in vivo*. **A)** Izquierda, gráfica del porcentaje de neuronas positivas para FoxP2 a partir de CTN *in vitro* en condiciones control (-HA), 100 μM de histamin (HA), HA + Clorph (clorfeniramina) y solo Clorph. Derecha, micrografías de las inmunofluorescencias para FoxP2 (verde), MAP2 (rojo) y los núcleos contrateñidos con Hoechst (azul). **B)** Izquierda, nivel de corte coronal usado para realizar las inunofluorescencias en tejido E14 de rata, la zona enmarcada en rojo representa el área fotografiada. Derecha, micrografías de las inmunohistofluorescencias para FoxP2 (verde), βIII-tubulina (rojo) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul) en el neuroepitelio cortical de embriones de ratas control e inyectados de manera intrauterina con clorfeniramina (25 μg) en el lumen ventricular en E12. Tomado de Molina-Hernández *et al.*, 2013.

Por otro lado, estudios a largo plazo del efecto de la clorfeniramina durante el embarazo mostraron una citoarquitectura cortical aberrante, efectos adversos sobre la morfología dendrítica y la excitabilidad de las neuronas de la lámina profunda de la corteza motora primaria (Valle-Bautista *et al.*, 2022). Lo anterior es evidencia

contundente de que la HA a través de la activación del RH₁ participa en la diferenciación neuronal durante la corticogénesis temprana (E12-E14) y en el establecimiento de las láminas profundas de la corteza cerebral.

En conjunto los datos con relación al efecto del RH₁ a corto y largo plazo sugieren que un desequilibrio del sistema histaminérgico transitorio podría participar, con otros sistemas, en la programación fetal para trastornos cognitivos en la etapa postnatal, en este sentido, una patología materna asociada es la diabetes durante la gestación.

3. La diabetes materna y el desarrollo del sistema nervioso central

La diabetes durante el embarazo, una de las alteraciones metabólicas mayormente reportadas en el humano, tiene implicaciones significativas en la relación materno-fetal y se ha relacionado con deficiencia en funciones cognitivas como el movimiento fino, y el lenguaje en el producto (Ornoy *et al.*, 1998, 1999, 2001; Nelson *et al.*, 2000; Dionne *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2012; Bolaños *et al.*, 2015). No obstante, existen reportes en donde declaran que dicha relación no existe (Persson y Gentz, 1984; Rizzo *et al.*, 1995) o incluso reportan que un ambiente hipoglucémico puede ser benéfico (Veena *et al.*, 2010). Lo anterior podría depender del nivel de control glucémico o de otros aspectos relacionados con el nivel educativo familiar y la estimulación temprana (Nomura *et al.*, 2012). Dado el debate, y a que otras patologías neurológicas como el autismo y la esquizofrenia, se han relacionado con la diabetes gestacional, es de especial relevancia esclarecer esta discrepancia en sistemas controlados en mamíferos.

Estudios realizados en modelos murinos de diabetes materna, han reportado que la hiperglucemia promueve cambios en la expresión de genes relacionados con la proliferación y diferenciación celular, así como una neurogénesis incrementada en el cerebro en desarrollo (Jiang *et al.*, 2008; Pavlinkova *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2017; De La Merced-García, 2019). Sin embargo, la mayoría de los reportes usan embriones con defectos del tubo neural o hacen un pool de embriones con y sin estos defectos, lo que dificulta el establecimiento de

relaciones entre los cambios en la expresión génica durante el desarrollo embrionario y el deterioro posnatal de funciones cognitivas y motoras.

Con relación a lo anterior, se han reportado datos contradictorios del efecto de la hiperglucemia en la proliferación y diferenciación celular. Por un lado, se ha descrito un aumento de la proliferación celular sin afección sobre la muerte celular, que promueve el engrosamiento y la deformación del telencéfalo en embriones de ratones diabéticos (E11.5; Fu *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2004); mientras que otros, han reportado que no hay cambios en la proliferación celular y si un aumento en la muerte celular o incluso, reportan una disminución en la proliferación celular (Gäreskog *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2013). Lo anterior puede deberse a cambios sutiles en las ventanas de tiempo estudiadas o al uso indiscriminado de embriones con y sin defectos del tubo neural y al tipo de defecto que se desarrolle.

Aunque la corticogénesis, es el proceso más estudiado durante el desarrollo tanto en condiciones patológicas como sanas, pocos estudios han analizado el efecto de la hiperglucemia en embriones sin defectos del tubo neural. Fu y colaboradores (2006), mostraron *in vitro* que las CTN aisladas del telencéfalo dorsal de embriones de ratón E13 expuestas a alta glucosa (30 mM) y el neuroepitelio cortical de embriones E14 de ratón diabética presentan una reducción de la proliferación celular, y un aumento en la diferenciación neuronal y en la muerte celular, sin embargo, las imágenes reportadas sugieren que esto se da en embriones con defectos del tubo neural por la mayor presencia de pliegues en el neuroepitelio embrionario.

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo, al evaluar embriones en E14 sin defectos del tubo neural de rata diabética reportó un incremento en la diferenciación y maduración neuronal en el telencéfalo dorsal (Figura 4A-B). Lo anterior, en conjunto con datos del laboratorio no publicados, muestran un aumento en la expresión de FoxP2 y de la proteína nuclear, lo cual sugiere una mayor generación de neuronas de lámina profunda. Adicionalmente, ensayos de inmunofluorescencia muestran que el incremento en FoxP2 es más evidente en la ZV, región donde se localizan las CTN en proliferación, lo que sugiere una función activa de FoxP2 como factor

de transcripción en las CTN o una migración alterada de las neuronas FoxP2⁺ en el modelo de diabetes materna (Solís *et al.*, 2017; De La Merced-García, 2019).

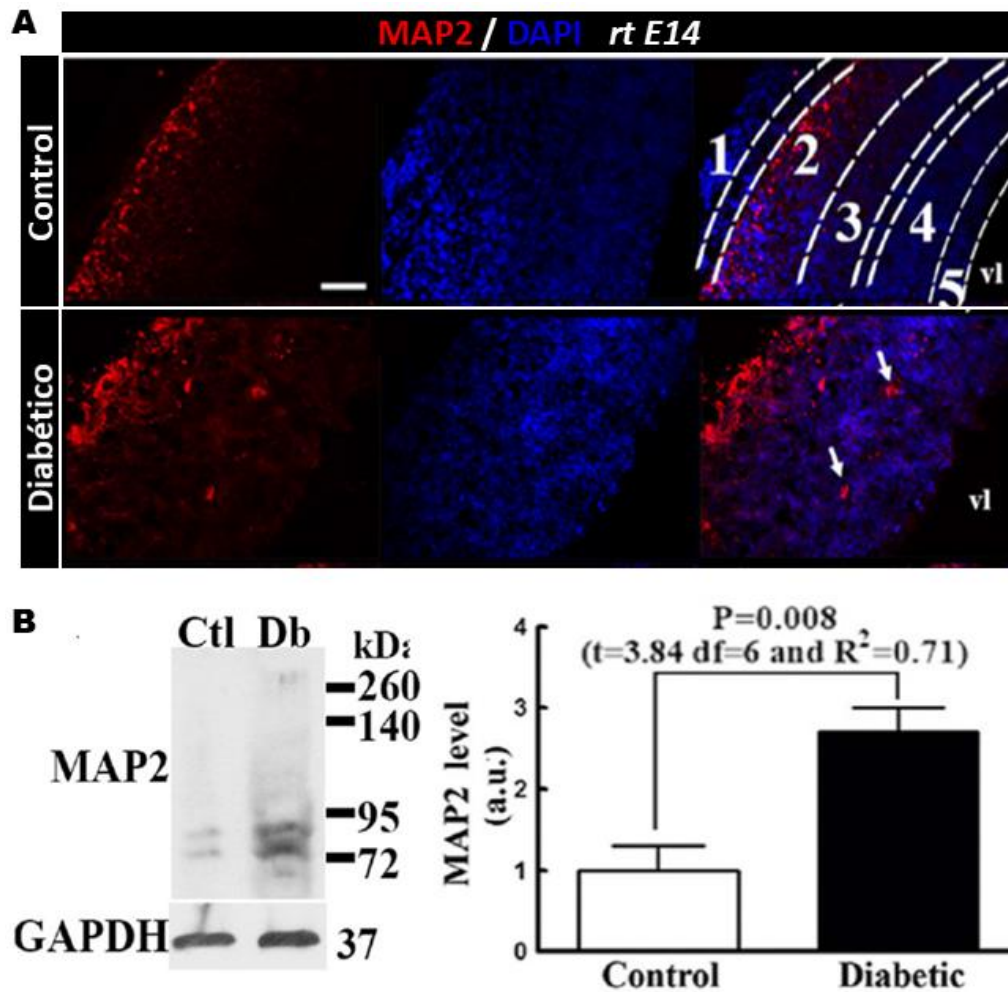


Figura 4. La diabetes materna incrementa la diferenciación y maduración neuronal. A) Micrografías de la Inmunodetección de MAP2 (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) en el neuroepitelio cortical de embriones E14 de rata control y diabética. **B)** Izquierda, *Western blot* para MAP2 (isoforma pequeña ~70 kDa e isoformas pesadas >260 kDa). Derecha, análisis de densitometría de la isoforma pequeña. Tomado de Solís *et al.*, 2017.

Una vez más, el incremento de la neurogénesis y el aumento de FoxP2 nuclear en la condición hiperglucémica son prevenidos por el bloqueo farmacológico del RH₁ a través de la inyección sistémica de clorfeniramina en E12 (De La Merced-García, 2019). De manera interesante, el prosencéfalo dorsal de embriones de rata diabética presenta una expresión incrementada del RH₁ (Figura 5A-B) lo que, en conjunto con el efecto de la clorfeniramina en este modelo, sugieren que la alta

expresión del RH₁ podría ser en parte responsable de la neurogénesis incrementada en la corteza de embriones expuestos a alta glucosa (Solís *et al.*, 2017), ya sea por su activación constitutiva o por ligando.

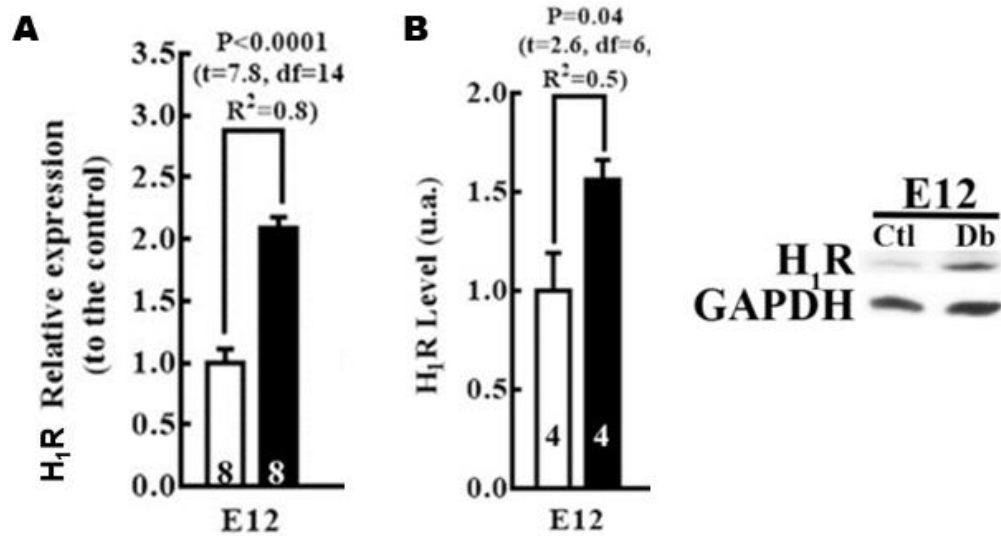


Figura 5. La diabetes materna incrementa la expresión y el nivel de proteína del RH₁ en el neuroepitelio cortical. A) Expresión relativa de RH₁ y **B)** Análisis de densitometría y transferencia de *Western blot* de la proteína correspondiente al RH₁ en el neuroepitelio cortical de embriones E12 control y provenientes de madres diabéticas. Tomado de Solís *et al.*, 2017.

Se ha reportado que, en sistemas de expresión heteróloga o en condiciones en las que hay un incremento en la expresión del receptor, como las alergias, el RH₁ presenta actividad constitutiva (Bakker *et al.*, 2000; Nijmeijer *et al.*, 2010). La alta expresión del RH₁ en el neuroepitelio cortical de embriones de rata diabética sugieren que durante la corticogénesis este receptor podría presentar actividad constitutiva y por consiguiente una mayor actividad en la vía de transducción de señales, la cual podría estar relacionada con una mayor translocación nuclear de FoxP2 en CTN, y consecuentemente una mayor neurogénesis. Una hipótesis que debe ser evaluada.

4. El factor de transcripción FoxP2

FoxP2 pertenece a la familia de factores de transcripción “*Forkhead box*” (Fox) que se caracterizan por conservar evolutivamente el dominio *Forkhead*, una región de ~100 aminoácidos organizados en forma de *winged helix* (hélice alada) que le permite unirse a la región promotora de sus blancos transcripcionales. Dentro de esta familia se encuentra la subfamilia “*Forkhead box P*” (*FoxP*), que se diferencia del resto por tener en el dominio *Forkhead* cerca del extremo C-terminal y presentar el ala 1 trunca y el ala 2 en forma de hélice en lugar de bucle (Kaestner *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2010).

En la rata, el gen que codifica a *Foxp2* se localiza en el cromosoma 4q21 (Gene ID: 500037, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/500037>) y codifica un mensajero que puede generar isoformas por *splicing* alternativo, siendo su isoforma principal una proteína de 710 aminoácidos. A nivel estructural se ha reportado que los factores de transcripción *FoxP* requiere de la formación de dímeros para ejercer su función, generando una variedad de combinaciones con distintas afinidades al DNA, lo que le permite tener una gran cantidad de blancos transcripcionales (Kaestner *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2010).

FoxP2 tiene un papel fundamental como regulador génico, un proceso que asegura que se expresen ciertos genes en momentos apropiados. Durante el desarrollo del SNC, FoxP2 funciona preferencialmente como un represor transcripcional y tiene como blancos genes que conducen al mantenimiento de las CTN, por lo tanto, su actividad favorece procesos celulares que van desde la diferenciación neuronal hasta el desarrollo de circuitos implicados en el lenguaje y la actividad motora. En el adulto, favorece la activación de genes implicados en el desarrollo dendrítico y la sinaptogénesis, lo que indica que FoxP2 actúa como un represor y un activador transcripcional dependiendo el contexto (Spiteri *et al.*, 2007; Vernes *et al.*, 2007; Vernes *et al.*, 2011).

4.1 Función de FoxP2 en la Corticogénesis

Una de las estructuras cerebrales donde FoxP2 está implicado en procesos ontogenéticos relevantes, es la corteza cerebral (Spiteri *et al.*, 2007; Vernes *et al.*, 2007, 2011; Hisaoka *et al.*, 2010; Tsui *et al.*, 2013; Chiu *et al.*, 2014; García-Calero *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016). En murinos, se ha reportado que FoxP2 se expresa a lo largo del neuroepitelio cortical, tanto en CTN (Pax6⁺) como en PI (Tbr2⁺; Figura 6A-B), sin embargo, difieren en su nivel de expresión (Tsui *et al.*, 2013; De La Merced-García, 2019). Conforme progresa el desarrollo su expresión se restringe a las láminas profundas V – VI de la corteza cerebral (Figura 6C), manteniendo su expresión en el adulto en las neuronas de proyección cortico-talámicas de L VI y en neuronas de proyección subcerebral de la LV de la corteza frontal, parietal y occipital (Ferland *et al.*, 2003).

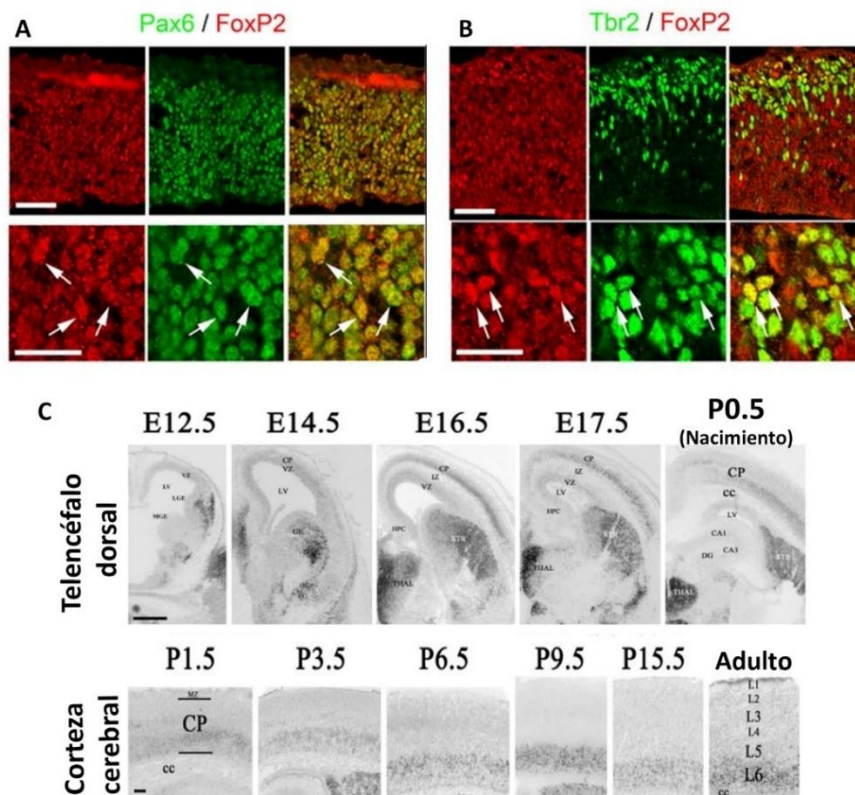


Figura 6. Expresión de FoxP2 en la corteza cerebral de ratón. A y B) Microfotografías de microscopia confocal de las inmunofluorescencias para FoxP2 (rojo) y Pax6 (verde en A) o Tbr2 (verde en B) en el neuroepitelio cortical de ratón E12.5. Tomada de Tsui *et al.*, 2013. **C)** Micrografías de hibridación *in situ* para el mRNA de FoxP2 que muestran la expresión espaciotemporal en diversas etapas del desarrollo cortical. E, día embrionario; P, día Postnatal; CP, placa cortical; L, lámina cortical. Tomada de Ferland *et al.*, 2003.

Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que FoxP2 durante la corticogénesis temprana promueve la transición de CTN a PI, y favorece la adquisición del compromiso neuronal para el establecimiento de las láminas profundas de la corteza cerebral (Tsui *et al.*, 2013; Chiu *et al.*, 2014). Aunque se desconocen los mecanismos a través de los cuales FoxP2 regula la neurogénesis, se ha sugerido que el efecto de su disminución durante la corticogénesis promueve un incremento de la expresión de *N-cadherina* y consecuentemente un aumento de las uniones adherentes de las CTN en la ZV, fenómeno que favorece la autorrenovación y la polaridad de estas células (Rouso *et al.*, 2012).

En la medula espinal, FoxP2 reprime la expresión de *N-cadherina*, lo que conlleva a la pérdida de las uniones adherentes (Rouso *et al.*, 2012; Kadowaki *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). Por otro lado, FoxP2 al promover la transcripción del gen de *Disc1* (una proteína que regula la neurogénesis embrionaria, ya que se requiere para la proliferación celular en la ZV y ZSV), disminuye la proliferación simétrica de las CTN y aumenta la población de PI, lo que conllevará a un aumento de la diferenciación neuronal (Walker *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017; Mao *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha reportado que FoxP2 participa en la diferenciación, maduración y migración radial de los neuroblastos, a través de la regulación positiva de sus blancos implicados en estos procesos, como son *MAP2*, *Dcx*, *Gap43*, *Nav2*, *Nedd9* y miR-9-2 (Clovis *et al.*, 2012; Devanna *et al.*, 2014). Lo anterior pone en evidencia que durante la corticogénesis temprana FoxP2 regula de manera directa o indirecta la neurogénesis, un proceso que, de verse afectado, perturbará el número y fenotipo neuronal cortical, y la formación de circuitos corticales, lo que podría ser la base de diversos trastornos del neurodesarrollo.

4.2 La fosforilación como regulador de la translocación nuclear

Una forma de regular dinámicamente la actividad de los factores de transcripción es a través de las modificaciones postraduccionales. En particular, la fosforilación afecta el transporte nuclear de las proteínas debido a cambios electrostáticos en los

aminoácidos que promueven un cambio conformacional de la proteína, favoreciendo la exposición de las secuencias de localización nuclear, su reconocimiento por importinas y su movilización al núcleo (Nardozzi *et al.*, 2010).

Hasta el momento se desconoce el mecanismo de translocación nuclear de FoxP2, sin embargo, se ha demostrado que la fosforilación promueve la localización nuclear de otros miembros de la familia Fox, por ejemplo: FoxO3A, FoxO4 y FoxM1. De tal manera que, la fosforilación en aminoácidos dentro de la secuencia de localización nuclear de FoxO3A promueve su ingreso al núcleo, mientras que su fosforilación en las secuencias de exportación nuclear lo transporta al citoplasma para su degradación. Por otro lado, la fosforilación por JNK en condiciones de estrés oxidativo de FoxO4 promueve su translocación nuclear (Coomans de Brachéne y Demoulin, 2015; Essaghir, *et al.*, 2009). Por último, la translocación nuclear de FoxM1, conocido por su función en la progresión del ciclo celular durante la mitosis, depende de la fosforilación por la vía de señalización Raf/MEK/MAPK, ya que la inhibición farmacológica de esta vía promueve un incremento de este factor de transcripción en extractos citoplasmáticos (Ma *et al.*, 2010).

FoxP2 presenta dos secuencias de localización nuclear, una antes y otra dentro del dominio *Forkhead* (Figura 7A). Dado que mutaciones o deleciones en el dominio *Forkhead* inhibe su translocación nuclear (Mizutani *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2011; Stroud *et al.*, 2006; Blane *et al.*, 2018), sugerimos que, en la rata, la fosforilación de la serina 580 que se localiza en la secuencia de localización nuclear (Figura 7B) podría ser esencial para la translocación nuclear de este factor de transcripción.

Lo anterior, en conjunto con el hecho de que la serina 580 es un sitio putativo de fosforilación por PKC, una enzima que es activada por la vía de transducción de señales del RH₁, sugiere que el incremento de FoxP2 nuclear en los embriones del modelo de diabetes materna, es debido a un aumento en su fosforilación y que este sea el mecanismo de regulación de este factor de transcripción (De La Merced–García, datos no publicados).

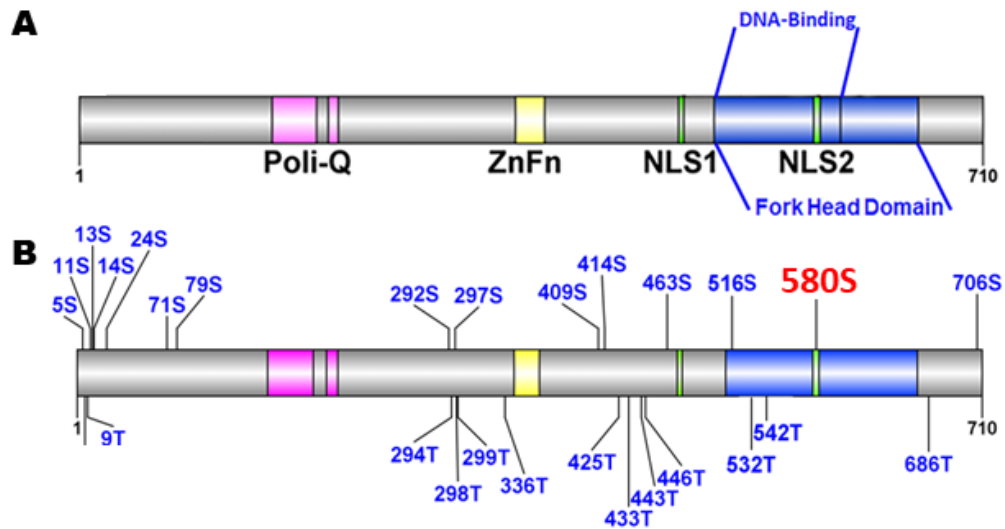


Figura 7. Sitios putativos de fosforilación por PKC. A) Representación gráfica de los principales dominios de FoxP2. **B)** Localización de los 29 sitios putativos de fosforilación por PKC obtenidos por un análisis bioinformático usando los programas NetSurfP y NetPhos. Poli-Q, cola de poliglutaminas; ZnFn, dedos de zinc; NLS, secuencia de localización nuclear. De La Merced-García, datos no publicados.

5. Proteínas Cinasas C (PKC)

La familia de las PKC comprende a un grupo de diez enzimas, producto de 9 genes en los mamíferos, con la capacidad de fosforilar de forma reversible residuos de serina y treonina en un gran número de proteínas, por lo que su actividad impacta en numerosas respuestas celulares (Mochly-Rosen *et al.*, 2012).

Las PKC son enzimas dependientes de lípidos, ya que requieren de la unión de fosfatidilserina para su actividad y como muchas proteínas cinasas, las PKC contienen una región reguladora y una región catalítica (Figura 8). De manera general, la estructura de las PKC consta de un pseudosustrato, compuesto por aminoácidos básicos que se asemejan a la secuencia de sustratos consenso, pero con una alanina en la posición del sitio fosfoceptor por lo que, en estado inactivo, el pseudosustrato ocupa el sitio activo de las PKC (Newton, 2018; Mochly-Rosen *et al.*, 2012; Geribaldi-Doldán *et al.*, 2019).

Las PKC cuentan con varios dominios: C1A-C1B y C2, una región reguladora no conservada, en los que se une el DAG y el Ca^{2+} respectivamente, el dominio C3 que es la región catalítica de unión a ATP que se localiza en el extremo C-terminal, y el dominio C4 donde se une el sustrato. Cabe señalar que C3 y C4 son dominios altamente conservados en la familia PKC. Finalmente, la cola C-terminal es una secuencia desordenada que tiene una propensión a adoptar una estructura helicoidal lo que permite que funcione como una estructura de acoplamiento durante el proceso de maduración de las PKC y media la localización subcelular de estas enzimas al interactuar con las proteínas adaptadoras (Figura 8; Newton, 2018; Yang e Igumenova, 2013; Yang *et al.*, 2018; Mochly-Rosen *et al.*, 2012; Geribaldi-Doldán *et al.*, 2019).

Las PKC se clasifican en tres subfamilias dependiendo de la estructura de sus dominios (Figura 8), lo que a su vez determina su sensibilidad a los segundos mensajeros y cofactores requeridos para su activación. Las clásicas (α , β I, β II y γ) requieren la unión de DAG y Ca^{2+} , las nuevas (δ , ϵ , θ y η) son activadas únicamente por DAG, y las atípicas (λ , ι) donde la activación es independiente de DAG y Ca^{2+} y tienen un dominio PB1 que regula su actividad a través de interacciones proteína-proteína (Black y Black, 2012; Mochly-Rosen *et al.*, 2012; Geribaldi-Doldán *et al.*, 2019).

5.1 Activación de PKC clásicas y nuevas

Todas las PKC se mantienen en su forma estable y autoinhibida en el citosol, hasta que se generan los segundos mensajeros DAG y Ca^{2+} , por la activación de receptores acoplados a proteínas Gq. En las clásicas la unión de estos segundos mensajeros en los dominios C1 y C2, provocan un cambio conformacional, dejando a la PKC en estado “abierto” lo que le permite la fosforilación ordenada de tres residuos. La cinasa dependiente de fosfoinositol (PDK-1) se une al extremo C-terminal de la PKC abierta para fosforilar una treonina en el bucle de activación desencadenando dos fosforilaciones fuertemente acopladas, una en una treonina presente en el motivo de giro, y otra en una serina del motivo hidrofóbico. Una vez

fosforiladas las PKC, se encuentran en su estado activo y pueden ejercer su función sobre sus proteínas blanco, dado que la activación es solo transitoria, las PKC pueden ser desfosforiladas para adoptar su estado autoinhibido o pueden ser ubiquitinadas para su posterior degradación (Newton, 2018; Callender y Newton, 2017).

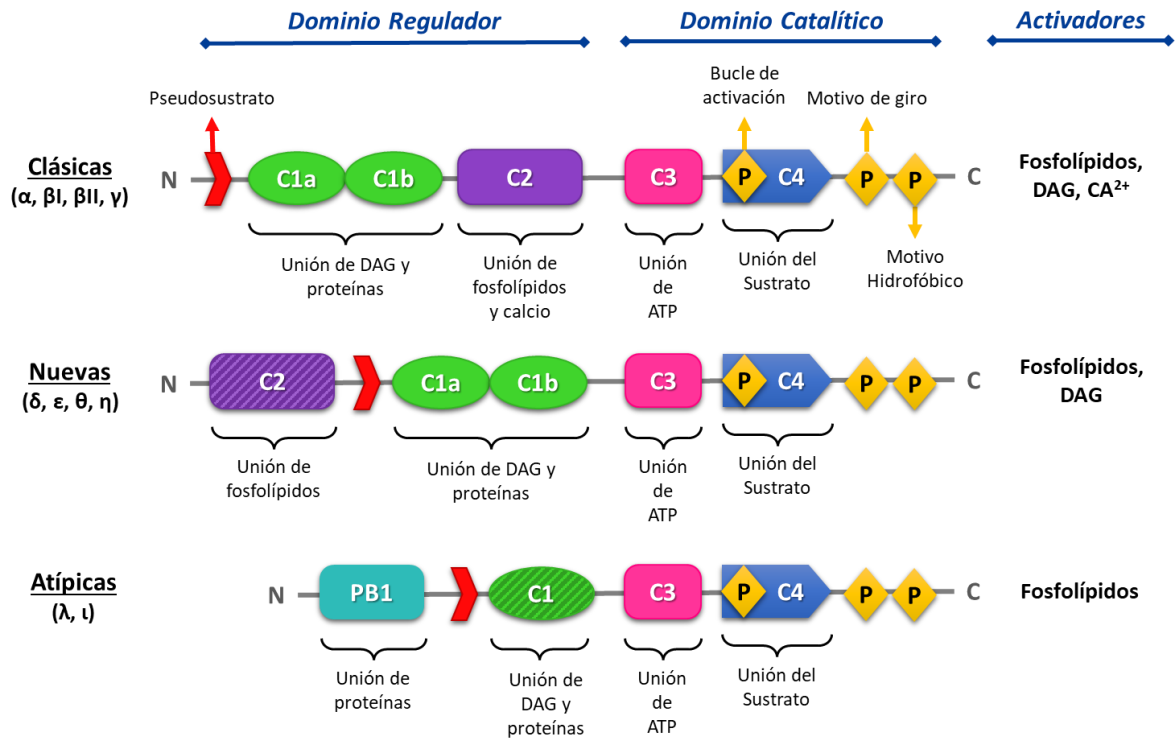


Figura 8. Estructura de las subfamilias de las PKC. Representación gráfica donde se muestran los dominios reguladores y catalíticos de las PKC clásicas, nuevas y atípicas, así como los cofactores requeridos para su activación. Modificada de Garg *et al.*, 2013.

Como se mencionó anteriormente, la vía de transducción de señales del RH_1 genera como segundos mensajeros DAG y Ca^{2+} , teniendo como blanco la activación de PKC clásicas y nuevas. La sobreexpresión del RH_1 en la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) promueve una mayor actividad de $PKC\alpha$ lo que favorece el envío de señales al núcleo a través de esta cinasa (Megson *et al.*, 2001). Por otra parte, en la línea celular U-373 MG de glioblastoma, la actividad del receptor inducida por HA promueve la regulación positiva de la expresión del RH_1 a través de la actividad de $PKC\delta$ (Mizuguchi *et al.*, 2021).

Lo anterior sugiere que, en el contexto diabético, podría estar ocurriendo una mayor actividad de PKC α y PKC δ o ambas, lo que podría tener como resultado el incremento en la neurogénesis a través de cambios en el patrón de división de las CTN. Sin embargo, dado lo mencionado con anterioridad sugerimos que la regulación de la fosforilación de FoxP2 es debido a PKC α .

De manera interesante, se ha reportado que las PKC pueden regular negativa y positivamente la progresión del ciclo celular dependiendo del contexto, lo que implica un alto grado de complejidad con efectos que involucran múltiples moléculas reguladoras del ciclo celular, incluidas ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas e inhibidores de ciclinas (Black y Black, 2012).

El papel de PKC α y PKC δ sobre el ciclo celular han sido abordados a través del uso de inhibidores farmacológicos selectivos, tecnología antisentido, o RNAs de interferencia. Lo anterior ha permitido identificar un papel antiproliferativo y de inducción de la diferenciación de la PKC α en múltiples tipos de células, por ejemplo, epiteliales intestinales, mamarias, queratinocitos y de melanoma (Black y Black, 2012). Se ha reportado que el efecto antiproliferativo de la PKC α implica al tránsito de G1 a S debido a una regulación a la baja de la ciclina D1 y la inducción de p21^{Cip1} y p27^{Kip1} (Hizli *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2007; Frey *et al.*, 1997; Detjen *et al.*, 2000; Tibudan *et al.*, 2002).

La disminución de la ciclina D1 es generado por la activación del represor de la traducción 4E-BP1 y por la regulación a la baja de los factores de transcripción de la familia Id, ambos regulados por la actividad de PKC α (Guan *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2011). Durante el desarrollo embrionario, las proteínas Id juegan un papel clave, ya que poseen la capacidad de inhibir la diferenciación y estimular la proliferación mediante la modulación de reguladores del ciclo celular tanto por mecanismos directos como indirectos (Yokota *et al.*, 2001). La inducción de p21^{Cip1} también está involucrada en la capacidad de PKC α de retrasar el tránsito de la fase S del ciclo celular e inducir el arresto en fase G2/M (Frey *et al.*, 1997; Oliva *et al.*, 2008). Además, los ratones *knockout* para PKC α muestran una mayor actividad proliferativa en las criptas intestinales (Oster y Leitges, 2006; Pysz *et al.*, 2009).

Por otro lado, la mayor proliferación debido a PKC α se ha observado en células de glioma, osteoblastos, hepatocitos de embrión de pollo, células de carcinoma hepático, y mioblastos (Black, 2000). Los efectos proliferativos de la PKC α sobre la maquinaria del ciclo celular incluyen mayores niveles de ciclina D1 y cdk4, y mayor actividad del complejo ciclina/cdk2 (Alisi *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2008;). La capacidad de PKC α para promover la proliferación se ha relacionado con la señalización a través de la vía ERK/MAPK (Schonwasser *et al.*, 1998; Shatos *et al.*, 2008).

Con relación al papel de PKC δ , en el ciclo celular, se ha reportado que también es capaz de inhibir la progresión del ciclo celular en G1 a través de la regulación a la baja de ciclina D1 en respuesta a agonistas farmacológicos y activadores fisiológicos como el ácido retinoico (Bowles *et al.*, 2007; Kambhampati *et al.*, 2003; Pysz *et al.*, 2009). De acuerdo con lo anterior, la pérdida de actividad de PKC δ resulta en un aumento en el nivel de ciclina D1 en células de cáncer de colon y células de músculo liso de las vías respiratorias del bovino (Cerdeira *et al.*, 2006; Page *et al.*, 2002).

A pesar de que la mayoría de los estudios reportan un papel inhibitorio de la PKC δ , otros han observado una regulación positiva del ciclo celular (Kitamura *et al.*, 2003; Jackson y Foster, 2004), al mejorar el tránsito de la fase G1 a S a través de una mayor expresión de ciclina D1, ciclina E, ciclina A, y/o cdk2, la desestabilización y la reducción de la localización nuclear de p21^{Cip1} (Kitamura *et al.*, 2003; Santiago-Walker *et al.*, 2005; Grossoni *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2006). Se ha sugerido que los efectos opuestos de PKC δ en la progresión del ciclo celular puede estar regulada de manera diferencial gracias a su fosforilación en Tyr155 (Acs *et al.*, 2000; Steinberg, 2004).

Dados los efectos opuestos de PKC α y δ en la proliferación será importante evaluar la expresión de ambas cinasas, sin embargo, los datos sobre el efecto del RH₁ en CTN sugieren que la PKC α podría ser mejor candidato en el contexto de desarrollo embrionario, por lo que nos concentraremos en evaluarla su forma activa.

VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hiperglucemia materna es una de las afectaciones metabólicas que puede afectar la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de las CTN, efectos que pueden, a su vez, conducir a defectos citoarquitectónicos que afectan el desarrollo neural y, en consecuencia, al deterioro de diversas funciones del SNC.

En murinos se ha reportado que la hiperglucemia durante el embarazo promueve una mayor neurogénesis cortical y una mayor expresión del RH₁, el cual al ser activado promueve la diferenciación neuronal, sin embargo, el mecanismo implicado en estas afecciones no ha sido esclarecida.

A partir de datos no publicados de nuestro laboratorio hemos observado un aumento de FoxP2 nuclear durante la corticogénesis temprana. FoxP2 es un factor de transcripción que promueve la transición de CTN a PIs, aumentando así la diferenciación neuronal y la especificación de las neuronas de proyección de láminas profundas de la corteza cerebral. Por otra parte, el incremento de FoxP2 nuclear es prevenido por el bloqueo del RH₁.

Por lo anterior, sugerimos que, como parte del mecanismo implicado en la neurogénesis incrementada en embriones de rata diabética, está la mayor expresión y actividad de PKC α , lo que incrementaría la translocación nuclear de FoxP2 por fosforilación, debido a una mayor actividad del RH₁.

Por lo tanto, la pregunta que quiere responder el presente trabajo es ¿Estará incrementada la actividad de PKC α en el neuroepitelio cortical de embriones de rata diabética? y ¿Estará implicada la actividad del receptor H₁ sobre la activación de PKC α ?

Los resultados de este trabajo podrían contribuir a explicar en parte, los mecanismos prenatales que proceden en bajos coeficientes intelectuales y verbales, déficits motores y del lenguaje, problemas en el desarrollo psicosocial y una mayor predisposición al autismo y la esquizofrenia, alteraciones que están relacionadas con la función de FoxP2 y que han sido reportadas en los hijos de

madres diabéticas, esto con el objetivo de aportar al establecimiento de mecanismos de prevención tempranos de enfermedades neurológicas en la infancia y el adulto.

VIII. HIPÓTESIS

La hiperglucemia materna incrementará la forma activa de PKC α en el neuroepitelio cortical de embriones de ratas de 12 días y será prevenido por la clorfeniramina, un antagonista/agonista inverso del RH₁.

IX. OBJETIVOS

❖ General

∞ Evaluar el nivel de expresión y activación de la PKC en el neuroepitelio cortical de embriones de expuestos a alta glucosa.

❖ Específicos

∞ Analizar la expresión y el nivel de FoxP2 nuclear en el neuroepitelio cortical de embriones de 12 días de ratas sanas y diabéticas.

∞ Analizar la expresión de PKC clásicas y PKC δ en el neuroepitelio cortical de embriones de 12 días de ratas sanas y diabéticas.

∞ Analizar el efecto del bloqueo farmacológico del RH₁ sobre la forma activa de PKC α en el neuroepitelio cortical de embriones de 12 días de ratas diabéticas.

∞ Determinar cambios en los marcadores de CTN y PI en el neuroepitelio cortical de embriones de 12 días de ratas sanas y diabéticas.

X. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

Todos los experimentos se realizaron bajo la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y la aprobación de los comités de investigación, ética, bioseguridad y del cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (número de registro: 2019-1-11). Los desechos biológicos generados en este proyecto fueron manejados bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico – infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo. Mientras que las características, el procedimiento de identificación, clasificación y listado de los residuos peligrosos se realizó de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005. Toda clase de residuos fue etiquetado y entregado a la Coordinación de Residuos Peligrosos-Biológico Infecciosos del INPer.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) hembras de 240-300 g, los animales fueron mantenidos en el bioterio del INPer con un régimen de luz/oscuridad de 12 horas, temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y con libre acceso a agua y comida (Purina 5001 LabDiet®, PicoLab® Products, EUA). Las ratas fueron colocadas con un macho fértil durante un ciclo de oscuridad y se verificó la cópula a través de la prueba de frotis vaginal, considerando como cópula positiva la presencia de espermatozoides (a este momento se determinó como E0.5). Las ratas preñadas se asignaron aleatoriamente a los grupos experimentales y se mantuvieron en cajas individuales hasta los 12 días de gestación.

2. Inducción a diabetes materna

La inducción a diabetes se realizó al quinto día de gestación mediante la administración vía intraperitoneal de una dosis única de 50 mg/kg de peso de estreptozotocina (STZ, por sus siglas en inglés *Streptozocin*; cat. S0130, Sigma-

Aldrich[®], EUA) disuelta en solución de citratos (0.1 M, pH 6.4) como vehículo, mientras que el grupo control se inyectó únicamente con el vehículo (Solís *et al.*, 2017; Salazar, 2015). Cuarenta y ocho horas después se obtuvo una gota de sangre obtenida por punción de la vena caudal para determinar la glucemia de ambos grupos con ayuda de un glucómetro (Accuchek-ROCHE, EUA). Dado que la glucemia en animales control es de 90-115 mg/dL, se consideraron diabéticas aquellas ratas inyectadas con STZ que presentaron niveles de glucosa ≥ 200 mg/dL, correspondiente a diabetes severa (Volpato *et al.*, 2008; Salazar *et al.*, 2015), descartando aquellos animales con niveles normales de glucemia.

3. Bloqueo farmacológico del RH₁

En el día 12 de gestación, las ratas preñadas del modelo diabético se asignaron de manera aleatoria a los grupos experimentales diabético y diabético + clorfeniramina. El grupo tratado con clorfeniramina (cat. C4915, Sigma-Aldrich, EUA) recibió por vía intraperitoneal una dosis única de 5 mg/kg del fármaco (Naranjo y Naranjo, 1968; *National Toxicology Report*, 1986; Solís *et al.*, 2017) utilizando agua inyectable como vehículo; mientras que el grupo control y diabético se inyectaron únicamente con el vehículo. Después de 30 minutos, momento en el que se alcanza el pico de concentración del fármaco en el plasma de las ratas, se obtuvieron los embriones para su disección (*National Toxicology Report*, 1986).

4. Obtención de embriones

Las hembras gestantes se sometieron a eutanasia por decapitación en el día 12 de gestación, y los embriones fueron recuperados por cesárea y colocados en medio DMEM:F-12 frío (cat. 30-2006, ATCC[®], EUA) suplementado con insulina-transferrina-selenio (cat. 41400045, Gibco[®], EUA), progesterona 20 nM (cat. P8783, Sigma-Aldrich[®], EUA), putresina 100 μ M (cat. P5780, Sigma-Aldrich[®], EUA). Con ayuda de un microscopio estereoscópico (Olympus Corporation SZX2-ILLT, Japón) se realizó la disección de embriones para obtener los prosencéfalos y fueron procesados dependiendo de la técnica usada.

5. Extracción de RNA

El RNA de 6 prosencéfalos fue obtenido a través del método modificado de fenol cloroformo, usando el reactivo TRIZOL® (cat. 15596026, Life Technologies, Bartlesville, EUA) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Brevemente, el tejido se disgregó vigorosamente en 1 ml de TRIZOL y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 200 µL de cloroformo y se homogenizó con ayuda de un vortex durante 15 segundos. Las muestras fueron incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10,000xg durante 15 minutos a 4°C, la fase acuosa fue transferida a un tubo de 1.5 mL nuevo.

El RNA se precipitó con 500 µL de isopropanol, se homogenizó por inversión, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con 1 ml de etanol al 100% seguido de etanol al 75%. Se centrifugó a 10,000xg durante 10 minutos a 4°C, la pastilla resultante de RNA se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 horas y se resuspendido en 20 µL de agua libre de RNAsas y se incubó durante 10 minutos a 60°C.

La integridad del RNA se evaluó por la presencia de los RNAs ribosomales 28S, 18S y 5S en un fotodocumentador MiniBis-Pro (Bio-Imaging Systems, México) después de la electroforesis de 1 µL de RNA en geles de agarosa al 2% TBE [TrisBase-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)] durante 40 minutos a 100 V y visualizando al usar GelRed® (cat. 41003 Biotium, EUA). La pureza del RNA, se determinó calculando la tasa de absorbancia obtenida a 230, 260 y 280 nm (valores permitidos 260/280 ~2; 260/230 ≥1.5) registrada en un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific™ EUA). El RNA fue almacenado a -70°C hasta su uso.

6. Reacción de Retrotranscripción (RT)

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó con el “*Kit Reverse Transcription System*” (cat. A3500 Promega, EUA). Para cada reacción se mezcló

1 µg de RNA con: 2 µL de solución amortiguadora de Retrotranscripción (10x), 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de desoxinucleótidos (dNTPs; 10 mM), 0.5 µL de inhibidor de ribonucleasas (40 U/ µL), 1 µL de oligo (dT; 500 µg/ml, y 0.5 µL de enzima AMV transcriptasa inversa (25 U) y agua libre de RNAsas y DNAsas para un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó por 15 minutos a 42°C, seguido de un periodo de inactivación de 5 minutos a 95°C y 10 minutos a 4°C. Una vez obtenido el cDNA se cuantificó y se determinó la pureza (se usaron muestras con valores de: 260/280 ~1.8 y 260/230 1.8-2.2). El cDNA fue almacenado a -70°C hasta su uso.

7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación se llevó a cabo usando el “*Kit Access PCR System*” (cat. A1250 Promega, EUA) utilizando los *primers* específicos (Tabla 1). La reacción de PCR se realizó usando: 500 ng de cDNA, 5 µL Buffer Gotaq Flexi 5x, 2 µL MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL dNTPs (10 mM), 0.5 µL de cada *primer* (sentido y antisentido 20 pmol) y 0.13 µL enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (25U) y agua libre de RNAsas y DNAsas para un volumen final de 25 µL.

La reacción se llevó a cabo por un periodo de desnaturalización inicial (95°C por 2 minutos), 35 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 95°C), alineación (30 segundos para *FoxP2*, *PKCα*, *PKCβ*, *PKCδ* y 15 segundos para *PKCγ* a la temperatura mostrada en la (Tabla 1) y extensión (30 segundos a 72°C), seguidos de una extensión final de 5 minutos a 72°C y una incubación de 15 minutos a 4°C. Como control interno se tomó la expresión de *GAPDH*.

Cinco microlitros de los productos de amplificación y 1.5 µL de un marcador de pares de bases (cat. G210A, Promega, EUA) fueron visualizados usando GelRed (cat. 41001 Biotium, Hayward, EUA) después de realizar la electroforesis en un gel de agarosa al 2%, durante 40 minutos a 100 V las imágenes fueron digitalizadas usando un fotodocumentador.

Para verificar que los productos amplificados correspondían a fragmentos de *PKCα*, *PKCβ*, *PKCγ* y *PKCδ* las bandas correspondientes fueron aisladas y purificadas

usando el “*Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery*” (cat. D4001, Zymo Research, EUA) y se enviaron a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para su secuenciación (Anexo 1).

Tabla 1. Secuencias de “*primers*” utilizadas en la RT-qPCR.

Gen	Secuencias	T° alineación	Producto esperado
<i>FoxP2</i>	F: 5´-GAA AGC GCG AGA CAC ATC G-3´ R: 5´-GAA GCC CCC GAA CAA CAC A-3´	63 °C (De La Merced-García, 2019)	222 pb
<i>PKCα</i>	F: 5´-GCC AAG TTC TGG GAG GTC ATC-3´ R: 5´-GTA GTA GAC ACT GAT GCG TTC CA-3´	60 °C	210 pb
<i>PKCβ</i>	F: 5´-GAG AAG GAG GCC CAA CAC AA-3´ R: 5´-TCT TCG AGG CTT CTT CCA GTG-3´	60 °C	203 pb
<i>PKCγ</i>	F: 5´-AAA AGG CCA GCT CGT GAT CC-3´ R: 5´-CTG CTT TCC AAT GCC CCA GA-3	61 °C	225 pb
<i>PKCδ</i>	F: 5´-GAT CGA CGA TGA CGT GGA GT-3´ R: 5´-TGC ATA AAA CGT AGC CCG GT-3	59 °C	205 pb
<i>GAPDH</i>	F: 5´-GGA CCT CAT GGC CTA CAT GG-3´ R: CCC CTC CTG TTG TTA TGG GG-3´	58 °C (De La Merced-García, 2019)	198 pb

8. PCR en tiempo real “cuantitativa” (qPCR)

Una vez verificada la identidad de los productos, se realizaron los rangos dinámicos para establecer la eficiencia de amplificación y el valor umbral de detección para cada producto (Tabla 2), usando un termociclador Rotor-Gene Series Software 2.1.0.9 (QIAGEN, Alemania).

Todas las qPCR se realizaron a partir de 2 µL de 100 ng de cDNA preamplificado por 15 ciclos, y se mezclaron con 5 µL de “*KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix 2x*” (cat. KM4100 KAPA Biosystems, EUA), 0.2 µL de cada *primer* (sentido y antisentido 20 pmol) y agua libre de RNAsas y DNAsas para un volumen final de 10 µL. La reacción se llevó a cabo con un periodo inicial de desnaturalización a 95°C

por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización (95°C por 10 segundos), alineación (15 segundos a la temperatura descrita en Tabla 1), y extensión (72°C por 20 segundos). Al finalizar la reacción se realizaron curvas de desnaturalización para asegurar la amplificación de un solo producto. Para evaluar si había cambios en la expresión de los transcritos entre los grupos experimentales, se usó el método de expresión relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 2. Resumen de los Rangos Dinamicos.

mRNA	Fluorescencia umbral	Pendiente	Eficiencia
FoxP2	0.360	-3.21	1.04
PKCα	0.10577	-3.14	1.07
PKCβ	0.167	-3.29	1.01
PKCγ	0.07242	-3.33	0.99
PKCδ	0.4	-2.807	1.2
GAPDH	0.79663	-3.27	1.01

9. Extracción y electroforesis de proteínas

Para la obtención de extractos totales de proteína, los prosencéfalos (E12) de 1-2 camadas se colocaron en una solución de lisis que contenía Tris-HCL 25 mM pH 7.4, IGEPAL (Octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol, branched) al 1%, NaCl 100 mM e inhibidor de proteasas y fosfatasas (cat. 97063-010, VWR Life Science, AMRESCO, EUA). El tejido se homogenizó a 15,000 rpm durante cinco segundos en frio con un POLYTRON® PT 2100 (KINEMATICA AG, Suiza). El homogenado se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 13,000xg y el sobrenadante fue alicuotado y almacenado a -70°C hasta su uso.

El kit de extracción Thermo Scientific NE-PER (cat. 78833, Thermo Fisher Scientific™ EUA) fue usado para la obtención de la proteína nuclear siguiendo las indicaciones del fabricante. El tejido de los prosencéfalos E12 de dos camadas (~25 mg de tejido) se lavó con 1 ml de PBS y se centrifugo a 500 xg durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 200 μ l de reactivo de extracción citoplasmática

en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas (cat. 97063-010, VWR Life Science, AMRESCO, EUA), se homogenizó a 15,000 rpm durante cinco segundos en frío con un POLYTRON® PT 2100 (KINEMATICA AG, Suiza), y se agitó durante 15 segundos con vórtex. La suspensión se incubó en hielo durante 10 minutos, se añadieron 11 µl del segundo reactivo de extracción citoplasmática, se agitó dos veces con vórtex durante 5 segundos y con una incubación intermedia de 1 minuto en hielo.

Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 16 000 ×g y el sobrenadante (extracto citoplasmático) se transfirió a un tubo de 1.5 mL frío. El pellet se dejó secar durante 2 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µl de reactivo de extracción nuclear en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se agitó con vórtex durante 15 segundos, se incubó en hielo durante 10 minutos 4 veces seguidas y finalmente las muestras fueron centrifugadas a 16,000 ×g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante (extracto nuclear) se transfirió a un tubo nuevo frío. La concentración de proteína de cada muestra fue cuantificada por el método de Bradford (cat. PB6916 Sigma-Aldrich®, EUA; Bradford, 1976).

Para la evaluación de FoxP2, Sox9, Pax6 y Tbr2 se usó 30 µg de proteína nuclear mientras que, para el análisis de PKCα se usaron 60 µg de proteína total. La proteína fue desnaturalizada por ebullición durante 5 minutos con una solución que contenía (Tris 2.5M pH 6.8, glicerol, SDS al 10%, β-mercaptoetanol y azul de bromofenol) en proporción 5:1. Las muestras fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 10% (gel separador) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) usando el sistema Mini-PROTEAN II System (Bio-Rad, EUA) durante 40 minutos a 70V en el gel concentrador (4% de acrilamida) y 3 horas 30 minutos a 100V en el gel separador.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (cat. 10600003, Amersham Protran Premium, GE Healthcare, EUA), con tamaño de poro de 0.45 µm usando una cámara semi-húmeda con solución de transferencia (Tris base 120 mM, glicina 40 mM e isopropanol al 10%) y el sistema Trans-Blot® Turbo™ (Bio-

Rad, EUA) a 1.3 A, 25 V durante 15 minutos. La transferencia fue confirmada por la tinción de las proteínas con rojo Ponceau.

10. Western Blot

La unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana fue bloqueada con una solución comercial de bloqueo en TBS (cat. 927-60001, LI-COR, EUA) durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios (Tabla 2) disueltos en TBS (Tris HCl 15mM, NaCl 137 mM y 0.1% pH 7.6) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 20 y se incubaron con los anticuerpos secundarios IRDye 680RD anti-conejo (cat. 926-68073, LI-COR, EUA. RRID: AB_10954442) y IRDye 800CW anti-ratón (cat. 926-32212, LI-COR, EUA. RRID: AB_621847) diluidos 1:10,000 en TBS durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Después de tres lavados las membranas fueron escaneadas y digitalizadas usando en el equipo ODYSSEY CLx (LI-COR, EUA).

Tabla 3. Anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Especie	Dilución WB	Marca (País)	Catalogo (RRID)
Sox9	Conejo	1:1000	Abcam (UK)	Ab185966 (AB_2728660)
Pax6	Conejo	1:500	GeneTex (EUA)	GTX113241 (AB_1951119)
Tbr2	Conejo	1:500	Abcam (UK)	Ab23345 (AB_778267)
FoxP2	Conejo	1:2000	Abcam (UK)	Ab58599 (AB_941649)
PKCα	Conejo	1:2500	Abcam (UK)	Ab32376 (AB_777294)
PKCα phS657	Conejo	1:1000	Abcam (UK)	Ab180848 (AB_2783796)
Tbp	Ratón	1:2000	Abcam (UK)	Ab51841 (AB_945758)
Actina	Ratón	1:2000	GeneTex (EUA)	GTX11003 (AB_384201)

El nivel de fluorescencia de las bandas correspondientes fue cuantificado usando el software Image Studio Ver. 4.0. La fluorescencia de cada muestra fue normalizada al control de carga (Gapdh ó Actina para proteína citoplasmática y Tbp para proteína nuclear). Para determinar el nivel de PKC α activa, el nivel de fluorescencia de PKC α fosforilada y PKC α total normalizada a actina fueron usadas para calcular la tasa de PKC α activa (PKC $\alpha^{\text{fosforilada}}/\text{PKC}\alpha^{\text{total}}$).

11. Análisis estadístico

Los datos se presentan como promedio \pm error estándar de la media (e. e. m.). Para la comparación entre los grupos control y diabético se realizó la prueba *t* de Student no pareada o la prueba *t* de Welch no pareada en caso de que el valor de *F* (Shapiro–Wilk) sea significativo ($P < 0.05$). Para el análisis de la actividad de PKC se usó la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba de comparación múltiple de *Tukey*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a los valores de $P < 0.05$. El análisis estadístico y la creación gráficas se realizó en el programa GraphPad Prism versión 7.04 (GraphPad Software, Inc., EUA).

XI. RESULTADOS

1. La corteza cerebral

Con el propósito de analizar si la hiperglucemia materna promueve cambios en la expresión de FoxP2 en el neuroepitelio cortical de embriones E12, se realizaron qRT-PCR. Los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa en la expresión relativa de *FoxP2* en el grupo diabético de 1.66 veces menos que lo encontrado en el grupo control (Figura 9).

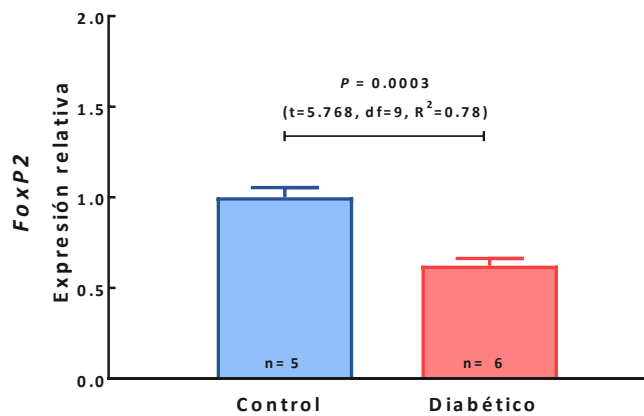


Figura 9. Análisis de la expresión de FoxP2 en el neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabética. La gráfica muestra el promedio \pm e.e.m de la expresión relativa al control de FoxP2 usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de 5-6 experimentos por triplicado. En la barra se muestra el valor de P obtenido de la prueba t de Student.

A nivel de proteína el análisis de *Western blot* a partir de extractos nucleares y citoplasmáticos del prosencéfalo de embriones E12 mostró un aumento estadísticamente significativo de (3.85 veces) más FoxP2 nuclear en el grupo diabético con relación al control (Figura 10A y B). De manera contrastante a lo encontrado en los extractos nucleares, no se encontraron cambios entre los grupos en la proteína a nivel citoplasmático (Figura 10C y D).

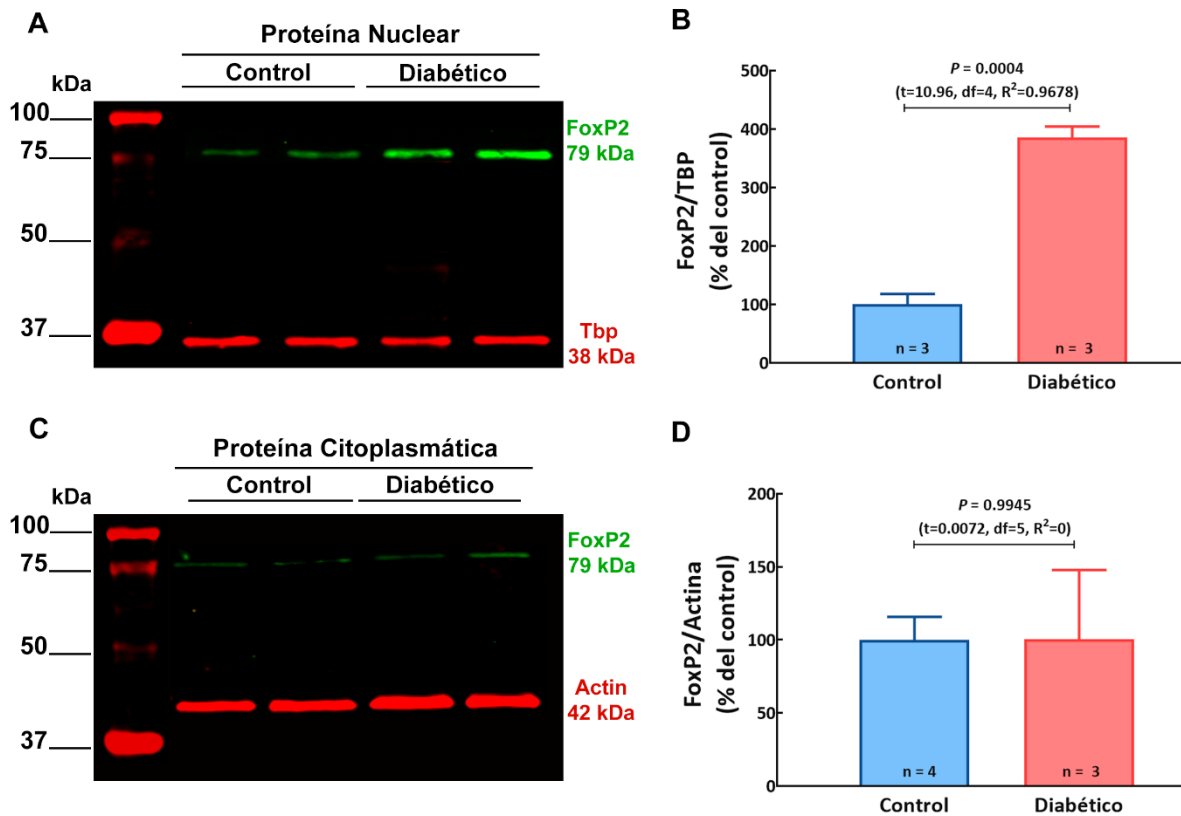


Figura 10. Análisis del contenido nuclear y citoplasmático de FoxP2 en el neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabética. A-C) Imágenes representativas de los *Western blot* para FoxP2 (verde) y los controles de carga Tbp o actina (rojo) a partir de proteína nuclear y citoplasmática, respectivamente **B y D)** Gráficas del promedio \pm e.e.m. de la tasa de fluorescencia entre FoxP2/Tbp y FoxP2/Actina obtenida de 3-4 experimentos expresado como porcentaje del control. En la barra se muestra el valor de *P* obtenido de la prueba *t* de Student.

2. Expresión de PKC en el neuroepitelio cortical de embriones E12

Dado que el análisis del aumento de FoxP2 nuclear sugiere una mayor translocación nuclear de la proteína y a que proponemos que esto puede ser debido a una mayor actividad de PKC río abajo del RH₁, se evaluó el nivel de expresión de PKC clásicas y PKC δ .

A nivel de mRNA los resultados mostraron un incremento estadísticamente significativo en la expresión relativa de PKC α y PKC δ de 2.3 ± 0.01 y 2.3 ± 0.006 veces más en el neuroepitelio cortical E12 del grupo diabético con relación al control (Figura 11A y D). De manera interesante, las PKC no relacionadas con la vía del

RH₁, *PKCβ* y *PKCγ*, mostraron por un lado una disminución estadísticamente significativa de 1.6 ± 0.002 veces menos y ningún cambio al mostrar un nivel de 1.15 ± 0.01 respectivamente, con relación al grupo control (Figura 11B y C).

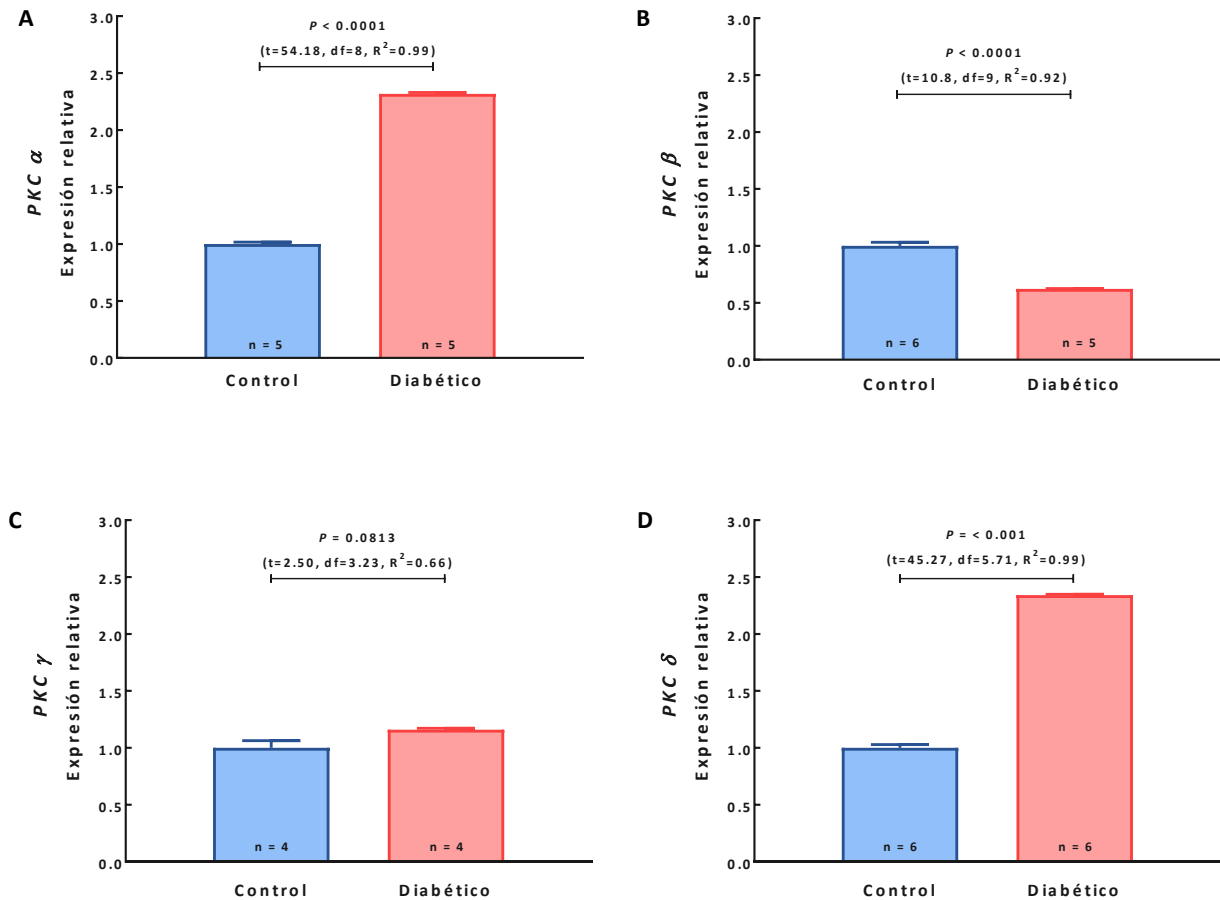


Figura 11. Análisis de la expresión de PKC en el neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabética. Las gráficas muestran el análisis de la expresión relativa al control de los mRNA para *PKCα* (A), *PKCβ* (B), *PKCγ* (C) y *PKCδ* (D) usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los valores son el promedio \pm e.e.m. de 4-6 experimentos por triplicado. En las barras se muestra el valor de *P* obtenido de la prueba *t* de Student para *PKCα* y de la prueba *t* de Welch para *PKCβ*, *PKCγ* y *PKCδ*.

3. Nivel de activación de PKC α en el neuroepitelio cortical de embriones E12.

Dado el papel de PKC α en la proliferación y diferenciación celular, se procedió a evaluar el nivel de activación de esta cinasa por *Western blot* en extractos de proteína total. De manera interesante, los resultados muestran que el prosencéfalo de embriones E12 del grupo diabético presentan un incremento estadísticamente significativo de 7 veces más en la forma activa de PKC α a lo encontrado en el grupo control (Figura 12A-B).

Con el propósito de evaluar si este incremento es debido a la activación del RH₁ en el grupo diabético, las ratas embarazadas fueron tratadas con clorfeniramina un antagonista/agonista inverso del RH₁ y 30 minutos después se evaluó el nivel de actividad de PKC α . De manera interesante, la clorfeniramina previno de manera parcial (~29%) el aumento en la forma activa de la PKC α en el grupo diabético. Es importante resaltar que la actividad en de la PKC α en el grupo diabético tratado con clorfeniramina es significativamente mayor en 5 veces más con relación al control (Figura 12A-B).

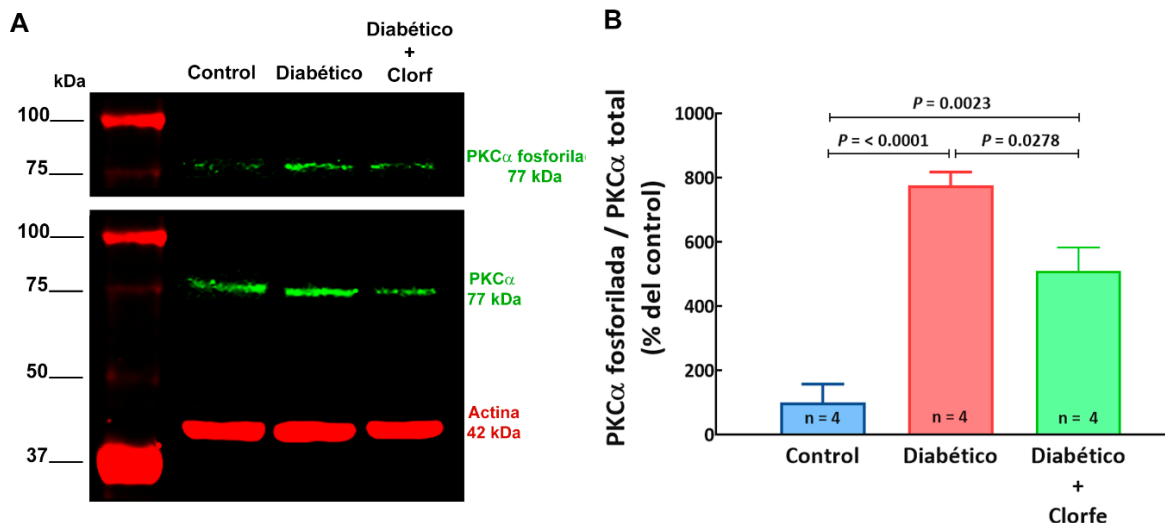


Figura 12. Análisis del nivel de PKC α activa en el neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabética. A) Imagen representativas de los *Western blot* de PKC α total (abajo en verde) y fosforilada (arriba en verde) y actina como control de carga (rojo) en extractos totales. **B)** Gráfica del promedio \pm e.e.m. de la tasa de fluorescencia de PKC α fosforilada / PKC α total normalizada de 4 experimentos. En las barras se muestran los valores de P obtenidos de ANOVA de una vía seguida de la prueba múltiple de Tukey.

4. Marcadores de CTN y PI en el neuroepitelio cortical de embriones E12.

Debido a que FoxP2 se expresa en CTN para promover la transición hacia PI, analizamos el nivel de proteína de dos marcadores de CTN, Sox9 y Pax6 (Figura 13) y Tbr2 como marcador de PI (Figura 14), con el propósito de explorar posibles cambios en estas poblaciones en la condición hiperglucémica.

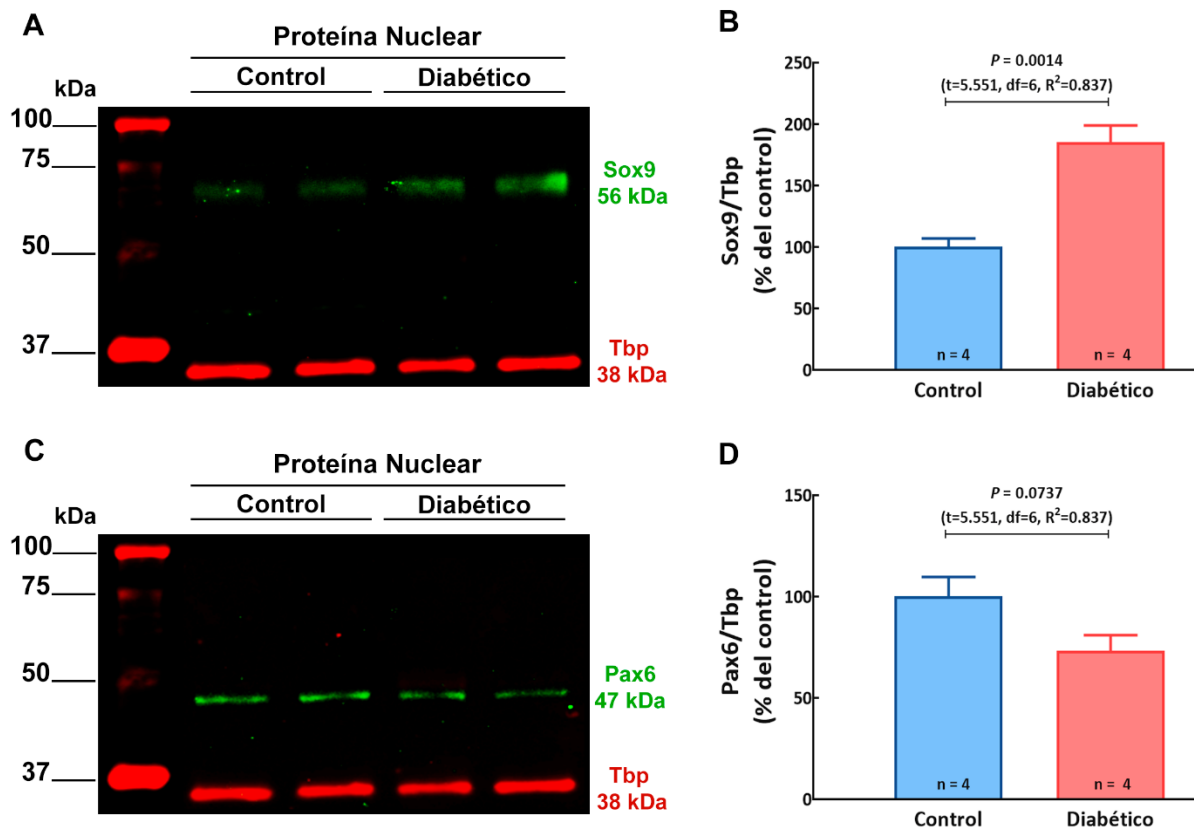


Figura 13. Análisis de marcadores de CTN Sox9 y Pax6 en extractos nucleares del neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabética. A-C) Imágenes representativas de los *Western blot* para Sox9 y Pax6 (verde), y Tbp (rojo) se usó como control interno. **B y D)** Gráficas del promedio \pm e.e.m. de la tasa de fluorescencia de Sox9/Tbp y Pax6/Tbp de 4 experimentos expresado como porcentaje del control. Se muestra el valor de P obtenido de la prueba t de Student.

Los resultados del nivel de proteína de Sox9 en extractos nucleares de prosencéfalo de embriones E12 muestra un incremento estadísticamente significativo de 1.85 veces en el grupo diabético respecto al grupo control (Figura 13A y B). Aunque para

Pax6, se observa una tendencia a disminuir en el grupo diabético, esta no es estadísticamente significativo con respecto al grupo control (Figura 13C y D).

En cuanto a Tbr2, el marcador de PI a pesar de que se encontró una tendencia a disminuir en el grupo diabético, esta no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control (Figuras 14A-B).

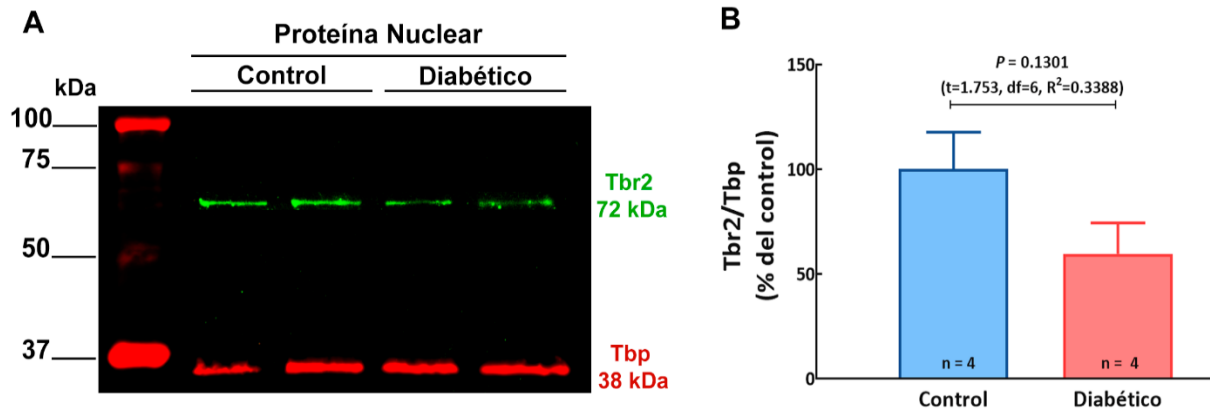


Figura 14. Análisis del nivel de proteína del marcador de PI Tbr2 en el neuroepitelio cortical de embriones E12 de ratas control y diabéticas. A) Imagen representativa de los *Western blot* para Tbr2 (verde) y Tbp (rojo) como control interno. **B)** Gráfica del promedio \pm e.e.m. de la tasa de fluorescencia de Tbr2/Tbp de 4 experimentos expresado en porcentaje del control. En la barra se muestra el valor de P obtenido de la prueba t de Student.

XII. DISCUSIÓN

La diabetes durante la gestación es un problema de salud que se presenta al menos en el 17 % de las mujeres embarazadas en México y puede o no remitirse posterior al parto. Como consecuencia, las mujeres y sus hijos se enfrentan a una serie de problemas que incluyen la muerte fetal, el aborto espontáneo, las malformaciones congénitas, las anomalías fetoplacentarias y la programación fetal (Dunne *et al.*, 2003; Nazer *et al.*, 2005; Salge *et al.*, 2012; Lehnen *et al.*, 2013; McIntyre *et al.*, 2019).

La programación fetal se define como los cambios estructurales, fisiológicos y metabólicos que suceden durante el desarrollo prenatal, que aumentan el riesgo de padecer patologías durante la infancia y la edad adulta (Entringer *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2017). En este sentido, la diabetes materna se ha relacionado con el desarrollo de obesidad, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, bajo coeficiente intelectual, alteraciones verbales, del lenguaje y motoras, déficit de atención con trastorno de hiperactividad, y problemas en el desarrollo psicosocial. No obstante, muchas de estas relaciones son controversiales o no han sido estudiadas y siguen sin ser esclarecidas. (Ornoy *et al.*, 1998, 1999, 2001; Dionne *et al.*, 2008; Nomura *et al.*, 2012; Bolaños *et al.*, 2015).

Debido a las limitantes éticas para el estudio de las alteraciones del neurodesarrollo ocasionadas por la diabetes materna en humanos y a la complejidad de las interacciones del desarrollo embrionario que son eliminadas en los sistemas *in vitro*, el uso de modelos animales es de gran utilidad. Sin embargo, es importante aclarar que estamos restringidos en algunas preguntas relacionadas con la función del SNC al ocupar modelos animales, debido a que hay funciones cerebrales donde su comprensión está limitada a la biología de cada especie, por lo que es importante seleccionar el modelo animal adecuado para poder comprender y explicar mecanismos fisiológicos y moleculares conservados evolutivamente, ya que son la base de la función del cerebro humano.

De manera particular, el modelo murino es el más ocupado, para comprender el desarrollo del cerebro humano y la disfunción en estados patológicos. En el

presente trabajo se usó un modelo de diabetes durante la gestación en rata para poder dilucidar los mecanismos implicados en el aumento de la neurogénesis y la maduración neuronal durante la corticogénesis temprana en modelos murinos expuestos a alta glucosa (Fu *et al.*, 2006; Solís *et al.*, 2017; De la Merced-García, 2019).

Uno de los factores que promueve una mayor neurogénesis fetal es la HA por activación del RH₁. Aún más, los embriones de ratas diabéticas muestran un incremento en la expresión de este receptor en E12 y su bloqueo disminuye la neurogénesis incrementada en el telencéfalo dorsal de embriones de rata diabética en E14 (Solís *et al.*, 2017). Lo anterior sugiere que la vía de transducción relacionada con el RH₁ podría estar involucrada en este fenómeno.

Por otro lado, la activación del RH₁ en CTN incrementa el fenotipo FoxP2, mientras que la clorfeniramina (antagonista/agonista inverso del RH₁) disminuye la expresión de marcadores neuronales y el fenotipo FoxP2 durante el desarrollo fetal *in vitro* e *in vivo* (Molina-Hernández *et al.*, 2008; Molina-Hernández *et al.*, 2013). Es importante señalar que FoxP2 es un factor de transcripción vital para la correcta formación de la corteza cerebral, ya que promueve la transición de CTN hacia PI así como la adquisición del compromiso neuronal y el establecimiento de las capas profundas de la corteza cerebral (Tsui *et al.*, 2013; Chiu *et al.*, 2014).

Datos no publicados de nuestro laboratorio muestran que en la zona ventricular el neuroepitelio cortical de embriones E14 de ratas diabéticas presenta una mayor expresión y translocación nuclear de FoxP2, y es prevenido por el bloqueo del RH₁ en E12 (De la Merced-García *et al.*, en proceso). Lo anterior sugiere que la vía de transducción de señales del RH₁ promueve una mayor translocación nuclear de FoxP2, lo cual puede ser el mecanismo de una neurogénesis incrementada en el modelo diabético.

El RH₁ está acoplado a proteínas G $\alpha_{q/11}$ por lo tanto, su activación genera DAG y Ca²⁺ como segundos mensajeros, dos moléculas que pueden activar a las PKC clásicas y nuevas. En este sentido, en el modelo diabético, la mayor expresión del

RH₁ en E12 sugiere una mayor actividad del RH₁ por ligando o por actividad constitutiva (Bakker *et al.*, 2000; Nijmeijer *et al.*, 2010) y consecuentemente una mayor actividad de PKC dependientes de Ca²⁺ y DAG, la cual podrían estar fosforilando a FoxP2 en sitios de las secuencias de localización nuclear, para promover su translocación nuclear.

Efectivamente, en este trabajo mostramos que los prosencéfalos E12 de embriones de rata diabética muestran un aumento nuclear de FoxP2. Por lo que se procedió a analizar la expresión de PKC clásicas (α , β y γ) y la PKC δ , que a pesar de requerir solo de DAG para su activación, se le ha relacionado no abajo de la actividad del RH₁ (Megson *et al.*, 2001; Mizuguchi *et al.*, 2021).

Los resultados con relación al análisis de expresión de PKC, muestran que tanto PKC α como PKC δ están sobreexpresadas en el modelo diabético, por lo tanto, podrían estar implicadas en la translocación nuclear de FoxP2. Dado que ambas PKC muestran efectos contrastantes sobre la proliferación y la diferenciación dependiendo el contexto (Black y Black, 2012), decidimos analizar la forma fosforilada de PKC α , ya que se ha mostrado que podría presentar efectos antagónicos en un mismo tipo celular (cáncer de mama), dependiendo del nivel de ácido retinoico. De manera interesante, se han reportado cambios en el nivel de ácido retinoico en embriones E9-E16 de ratas diabéticas (Guleria *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2017), lo que podría impactar la actividad y función de la PKC α . Además, se sabe que el ácido retinoico favorece la diferenciación neuronal (Tonge y Andrews, 2010; Janesick *et al.*, 2015).

En este estudio, encontramos que la hiperglucemia promueve un aumento de la actividad de PKC α en el neuroepitelio cortical en E12, sin embargo, la administración de la clorfeniramina en el mismo día no lleva el nivel de PKC α activa a los del control. Motivo por el cual, es importante considerar en próximos estudios el tiempo de exposición del fármaco sobre la actividad de esta cinasa y determinar si con esta aproximación previene en su totalidad la mayor actividad de PKC α observada en el grupo diabético.

Por otro lado, es importante evaluar si con el protocolo empleado, la forma activa de PKC δ esta aumentada en el modelo diabético y si es prevenido por la clorfeniramina, ya que es una cinasa que se ha visto esta implicada rio abajo del RH₁ y que nosotros encontramos sobreexpresada, de ser asi, es de vital importancia ocupar activadores específicos de estas cinasas y determinar si tienen efectos similares sobre la mayor translocación nuclear de FoxP2.

Un dato importate a mencionar y que abre nuevas preguntas sobre la propia regulación de la expresión de FoxP2 en el modelo diabético es la discrepancia entre su nivel de mRNA y su proteína, lo que podría explicarse a través de una retroalimentación negativa de sí mismo (Pan *et al.*, 2006; Singh, 2011) u otros procesos que tengan que ver con la estabilidad del mRNA y con el número de proteínas que son sintetizadas a partir de un mismo RNAm (Kraushar *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2021).

Por último, los cambios en el contenido de la proteína de Sox9 (marcador de CTN) sugiere un aumento de esta población en el neuroepitelio cortical de embriones E12 de rata diabética, lo anterior en conjunto con las tendencias observadas en Pax6 y Tbr2 sugieren un posible cambio en la población de CTN y de PI. Sin embargo, la evaluación de estos marcadores no es suficiente para proponer variaciones en las poblaciones celulares mencionadas y explicar la neurogénesis incrementada en este modelo. De esta forma, es necesario cuantificar los subtipos celulares presentes en el tejido, así como el patrón de división en este momento del desarrollo. Por otro lado, dadas las funciones de Sox9 para promover el estado indiferenciado de las CTN podemos especular que el aumento reportado en este trabajo podría estar promoviendo un estado quiescente (Fabra-Beser *et al.*, 2021).

Dado que FoxP2 favorece el tránsito de CTN a PI es probable que el aumento de dicho factor de transcripción tenga como consecuencia una mayor neurogénesis a través de cambios en sus blancos transcripcionales en embriones E12 de ratas diabéticas. La mayor translocación nuclear de FoxP2 en la neurogénesis temprana en embriones sin defectos del tubo neural, pueden dar origen a la programación de enfermedades relacionadas con la diabetes materna, ya que, este factor de

transcripción tiene como blancos diversos genes relacionados con trastornos del neurodesarrollo entre los que se encuentran el síndrome de Gilles de la Tourette, esquizofrenia, epilepsia, trastornos del espectro autista, trastorno de déficit de atención con hiperactividad y discapacidad intelectual (Walker *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2019; Peñagarikano y Geschwind, 2011; Chen *et al.*, 2016; Vernes *et al.*, 2011; Estruch *et al.*, 2016), así como moduladores de los procesos de fosforilación, de la división celular, la neurogénesis y la migración (Vernes *et al.*, 2011; Hisaoka *et al.*, 2010).

En resumen, nuestros datos muestran que en el prosencéfalo en desarrollo de embriones E12 de ratas diabéticas presentan: 1) un incremento en la translocación nuclear de FoxP2, 2) la sobreexpresión de PKC α y PKC δ , 3) un aumento en la actividad de PKC α , que es prevenido parcialmente por el bloque del RH₁ y 4) un aumento en el factor de transcripción Sox9. Por lo que podemos concluir que, en el modelo de diabetes materna el incremento de la actividad del RH1 favorece la actividad de PKC α , la cual puede estar relacionada con una mayor translocación nuclear de FoxP2, lo que promovería cambios en el patrón de división de las CTN, favoreciendo el incremento de la neurogénesis.

XIII. CONCLUSIONES

La hiperglucemia promueve en el neuroepitelio cortical de embriones de 12 días:

- Una baja en el RNAm y un incremento en el contenido de proteína nuclear de FoxP2.
- La sobreexpresión de *PKCα* y *PKCδ*.
- Un aumento de la forma activa de *PKCα*, que se previene parcialmente por el bloqueo farmacológico del RH₁.
- Un aumento del nivel de proteína de Sox9.

XIV. LITERATURA CITADA

- Acs, P., Beheshti, M., Szállási, Z., Li, L., *et al.*, (2000). Effect of a tyrosine 155 to phenylalanine mutation of protein kinase C delta on the proliferative and tumorigenic properties of NIH 3T3 fibroblasts. *Carcinogenesis*. 21(5):887–891. doi:10.1093/carcin/21.5.887.
- Alisi, A., Spagnuolo, S., Napoletano, S., Spaziani, A., *et al.*, (2004). Thyroid hormones regulate DNA-synthesis and cell-cycle proteins by activation of PKC β and p42/44 MAPK in chick embryo hepatocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 201(2):259–265. doi:10.1002/jcp.20060.
- Auvinen, S. y Panula, P. (1988). Development of histamine-immunoreactive neurons in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 276:289-303. doi: 10.1002/cne.902760211.
- Bakker, R. A., Wieland, K., Timmerman, H., y Leurs, R. (2000). Constitutive activity of the histamine H1 receptor reveals inverse agonism of histamine H1 receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology*. 387(1):R5–R7. doi:10.1016/s0014-2999(99)00803-1.
- Bergström, T. y Forsberg-Nilsson, K. (2012). Neural stem cells: brain building blocks and beyond. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 117: 132–142. doi: 10.3109/03009734.2012.665096.
- Black, A. R., y Black, J. D. (2012). Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. *Frontiers in Immunology*. 3:423. doi: 10.3389/fimmu.2012.00423.
- Black, J., D. (2000). Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Frontiers in Bioscience*. 5(1):d406. doi:10.2741/black.
- Blane, A., Dirr, H. W y Fanucchi, S. (2018). A Phosphomimetic Study Implicates Ser557 in Regulation of FOXP2 DNA Binding. *The Protein Journal*. 37(4):311-323. doi: 10.1007/s10930-018-9777-7.

- Bolaños L., Matute E., Ramírez-Duenas M de L., y Zarabozo D. (2015). Neuropsychological impairment in school-aged children born to mothers with gestational diabetes. *Journal of Child Neurology*. 30(12):1616–1624. doi: 10.1177/0883073815575574.
- Bowles, D. K., Maddali, K. K., Dhulipala, V. C., y Korzick, D. H. (2007). PKC δ mediates anti-proliferative, pro-apoptotic effects of testosterone on coronary smooth muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 293(2):C805–C813. doi:10.1152/ajpcell.00127.2007.
- Bradford, M. M. A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Callender, J. A., y Newton, A. C. (2017). Conventional protein kinase C in the brain: 40 years later. *Neuronal Signaling*. 1(2):NS20160005. doi:10.1042/ns20160005.
- Castro, X. H., Moltó, M. D., Morales, M., Flores, J., González, *et al.*, (2019). FOXP2 and language alterations in psychiatric pathology. *Salud mental*. 42(6):297-308. doi: 10.17711/sm.0185-3325.2019.039.
- Cerda, S. R., Mustafi, R., Little, H., Cohen, G., *et al.*, Bissonnette, M. (2006). Protein kinase C delta inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. *Oncogene*. 25(22): 3123–3138. doi:10.1038/sj.onc.1209360.
- Chen, Yi-Chuan., Hsiao-Ying, K, Ulrich, B., *et al.*, (2016). Foxp2 controls synaptic wiring of corticostriatal circuits and vocal communication by opposing Mef2c. *Nature neuroscience*. 19(11):1513-1522. doi: 10.1038/nn.4380.
- Chiu, Yi-Chi, Ming-Yang Li, Yuan-Hsuan Liu, Jing-Ya Ding, *et al.*, (2014). Foxp2 regulates neuronal differentiation and neuronal subtype specification. *Developmental Neurobiology*. 74(7):723-38. doi: 10.1002/dneu.22166.

- Chu, Y. P., Chang, C. H., Shiu, J. H., Chang, Y. T., *et al.*, (2011) Solution structure and backbone dynamics of the DNA-binding domain of FOXP1: insight into its domain swapping and DNA binding. *Protein Science*. 20(5) 908–24. doi: 10.1002/pro.626.
- Clancy B., Darlington R.B. y Finlay B.L. (2001). Translating developmental time across mammalian species. New York, EUA. Recuperado de <http://translatingtime.org/>
- Clovis, Y. M., Enard, W., Marinaro, F., Huttner. W B. *et al.*, (2012). Convergent repression of FoxP2 3'UTR by miR-9 and miR-132 in embryonic mouse neocortex: implications for radial migration of neurons. *Development*. 139:3332-3342. doi: 10.1242/dev.078063.
- Coomans de Brachène, A., y Demoulin, J. B. (2015). FOXO transcription factors in cancer development and therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 73(6):1159–1172.
- De La Merced-García, D. S. (2019). Participación del receptor H1 en la expresión de FoxP2 en el neuroepitelio cortical de embriones de ratas sanas e hiperglucémicas. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Detjen K. M., Brembeck F. H., Welzel M., Kaiser A., Haller H., *et al.*, (2000). Activation of protein kinase Calpha inhibits growth of pancreatic cancer cells via p21(cip)-mediated G(1) arrest. *Journal of Cell Science*. 113(17):3025–3035. doi: 10.1242/jcs.113.17.3025.
- Devanna, P., Middelbeek, J. y Vernes, S. C. (2014). FOXP2 drives neuronal differentiation by interacting with retinoic acid signaling pathways. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 8(305):1-13. doi: 10.3389/fncel.2014.00305.

- Dionne, G., Boivin, M., Séguin, J. R., Pérusse, D. *et al.*, (2008). Gestational diabetes hinders language development in offspring. *Pediatrics*. 122(5):e1073-e1079. doi: 10.1542/peds.2007-3028.
- Domínguez, M. H., Ayoub, A. E. y Rakic, P. (2013). POU-III transcription factors (Brn1, Brn2, and Oct6) influence neurogenesis, molecular identity, and migratory destination of upper-layer cells of the cerebral cortex. *Cerebral Cortex*. 23:2632-2643. doi: 10.1093/cercor/bhs252.
- Dunne, F., Brydon, P., Smith, K. y Gee, H. (2003). Pregnancy in women with Type 2 diabetes: 12 years outcome data 1990-2002. *Diabetic Medicine*. 20:734–8. doi: 10.1046/j.1464-5491.2003.01017.x.
- Entringer, S., Buss, C., Swanson, J. M., Cooper, D. M., *et al.*, (2012). Fetal programming of body composition, obesity, and metabolic function: the role of intrauterine stress and stress biology. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012:632548. doi: 10.1155/2012/632548.
- Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C. Y., Coffey, P. J., *et al.*, (2009). The Transcription of FOXO Genes Is Stimulated by FOXO3 and Repressed by Growth Factors. *Journal of Biological Chemistry*. 284(16):10334–10342. doi:10.1074/jbc.m808848200.
- Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C. Y., Coffey, P. J., *et al.*, (2009). The Transcription of FOXO Genes Is Stimulated by FOXO3 and Repressed by Growth Factors. *Journal of Biological Chemistry*. 284(16):10334–10342.
- Estruch, S. B., Graham, S. A., Chinnappa, S. M., Deriziotis, P. *et al.*, (2016). Functional characterization of rare FOXP2 variants in neurodevelopmental disorder. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 8:44. doi: 10.1186/s11689-016-9177-2.
- Fabra-Beser, J., Alves-Medeiros de Araujo, J., Marques-Coelho, D., Goff, L. A., *et al.*, (2021) Differential Expression Levels of Sox9 in Early Neocortical Radial

- Glial Cells Regulate the Decision between Stem Cell Maintenance and Differentiation. *The Journal of Neuroscience*. 41(33):6969-6986. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2905-20.2021.
- Ferland, R. J., Cherry, T. J., Preware, P. O., Morrissey, E. E. *et al.*, (2003). Characterization of FoxP2 and FoxP1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 460:266–279. doi: 10.1002/cne.10654.
- Fish, J. L., Dehay, C., Kennedy, H. y Huttner, W. B. (2008). Making bigger brains- the evolution of neural-progenitor-cell division. *Journal of Cell Science*. 121:2783-2793. doi: 10.1242/jcs.023465.
- Florio M. y Huttner W. B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development*. 141:2182-2194. doi: 10.1242/dev.090571.
- Fraser, A., Nelson, S. M., Macdonald-Wallis, C., y Lawlor, D. A. (2012). Associations of Existing Diabetes, Gestational Diabetes, and Glycosuria with Offspring IQ and Educational Attainment: The Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Experimental Diabetes Research*. 35(1):63-71. doi: 10.2337/dc11-1633.
- Frey, M. R., Saxon, M. L., Zhao, X., Rollins, A., *et al.*, (1997). Protein Kinase C Isozyme-mediated Cell Cycle Arrest Involves Induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and Hypophosphorylation of the Retinoblastoma Protein in Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 272(14):9424–9435. doi:10.1074/jbc.272.14.9424.
- Fu, J., Tay, S. S. W., Ling, E. A. y Dheen, S. T. (2006). High glucose alters the expression of genes involved in proliferation and cell-fate specification of embryonic neural stem cells. *Diabetologia* 49:1027–1038. doi: 10.1007/s00125-006-0153-3.

- Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*. 287:1433-1438. doi: 10.1126/science.287.5457.1433.
- Garcia-Calero, E., Botella-Lopez, A., Bahamonde, O., Perez-Balaguer, A. *et al.*, (2016). FoxP2 protein levels regulate cell morphology changes and migration patterns in the vertebrate developing telencephalon. *Brain Structure and Function*. 221(6):2905-17. doi: 10.1007/s00429-015-1079-7.
- Gäreskog, M., Cederberg, J., Eriksson, U. J., y Wentzel, P. (2007). Maternal diabetes in vivo and high glucose concentration in vitro increases apoptosis in rat embryos. *Reproductive Toxicology*. 23(1):63–74. doi: 10.1016/j.reprotox.2006.08.009.
- Garg, R., Benedetti, L. G., Abera, M. B., Wang, H., *et al.*, (2013). Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene*. 33(45):5225–5237. doi:10.1038/onc.2013.524.
- Gaspard, N., y Vanderhaeghen, P. (2011). From stem cells to neural networks: recent advances and perspectives for neurodevelopmental disorders. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 53(1):13–17. doi: 10.1111/j.1469-8749.2010.03827.x.
- Geribaldi-Doldán N., Gómez-Oliva R., Domínguez-García S., Nunez-Abades P. *et al.*, (2019). Protein Kinase C: Targets to Regenerate Brain Injuries? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 7:39. doi: 10.3389/fcell.2019.00039.
- Gil-Sanz, C., Franco, S. J., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., *et al.*, (2013). Cajal-Retzius cells instruct neuronal migration by coincidence signaling between secreted and contact-dependent guidance cues. *Neuron*. 79(3):461-477. doi: 10.1016/j.neuron.2013.06.040.
- Goedert, M., Crowther, R. A. y Garner, C. C. (1991). Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends in Neurosciences*. 14(5):193-199. doi: 10.1016/0166-2236(91)90105-4.

- Greig, L. F. C., Woodworth, N. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H. *et al.*, (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature Reviews Neuroscience*. 14(11):1-29. doi: 10.1038/nrn3586.
- Grossoni, V. C., Falbo, K. B., Kazanietz, M. G., de Kier Joffé, E. D. B., *et al.*, (2007). Protein kinase C δ enhances proliferation and survival of murine mammary cells. *Molecular Carcinogenesis*. 46(5):381–390. doi:10.1002/mc.20287.
- Guan, L., Song, K., Pysz, M. A., Curry, K. J., *et al.*, (2007). Protein Kinase C-mediated Down-regulation of Cyclin D1 Involves Activation of the Translational Repressor 4E-BP1 via a Phosphoinositide 3-Kinase/Akt-independent, Protein Phosphatase 2A-dependent Mechanism in Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 282(19):14213–14225. doi:10.1074/jbc.m610513200.
- Guleria, R. S., Pan, J., DiPette, D., y Singh, U. S. (2006). Hyperglycemia Inhibits Retinoic Acid-Induced Activation of Rac1, Prevents Differentiation of Cortical Neurons, and Causes Oxidative Stress in a Rat Model of Diabetic Pregnancy. *Diabetes*. 55(12):3326–3334. doi:10.2337/db06-0169.
- Haas, H. L., Sergeeva, O. A. y Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiological Reviews*. 88:1183-1241. doi: 10.1152/physrev.00043.2007.
- Hao, F., Pysz, M. A., Curry, K. J., Haas, K. N., *et al.*, (2011). Protein Kinase C α Signaling Regulates Inhibitor of DNA Binding 1 in the Intestinal Epithelium. *Journal of Biological Chemistry*. 286(20):18104–18117. doi:10.1074/jbc.m110.208488.
- He, S., Nakada, D. y Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 25:16.1–16.30. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113248.
- Héron, A., Rouleau, A., Cochois, V., Pillot, C., *et al.*, (2001). Expression analysis of the histamine H3 receptor in developing rat tissues. *Mechanisms of Development*. 105(1-2):167-73. doi: 10.1016/s0925-4773(01)00389-6.

- Hevner, R. F. (2019). Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *Journal of Anatomy*. 235(3):616-625. doi: 10.1111/joa.12939.
- Hisaoka, T., Nakamura, Y., Senba, E. y Morikawa, Y. (2010). The forkhead transcription factors, Foxp1 and Foxp2, identify different subpopulations of projection neurons in the mouse cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*. 166(2):551-63. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.12.055.
- Hizli, A. A., Black, A. R., Pysz, M. A., y Black, J. D. (2006). Protein Kinase C α Signaling Inhibits Cyclin D1 Translation in Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 281(21):14596–14603. doi:10.1074/jbc.m601959200.
- Jackson, B. C., Carpenter, C., Nebert, D. W. y Vasiliou, V. (2010). Update of human and mouse forkhead box (FOX) gene families. *Human Genomics*. 4(5):345–352. doi: 10.1186/1479-7364-4-5-345.
- Jackson, D. N., y Foster, D. A. (2004). The enigmatic protein kinase C δ : complex roles in cell proliferation and survival. *The FASEB Journal*. 18(6):627–636. doi:10.1096/fj.03-0979rev.
- Janesick, A., Wu, S. C., y Blumberg, B. (2015). Retinoic acid signaling and neuronal differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 72(8):1559–1576. doi:10.1007/s00018-014-1815-9.
- Jiang, B., Kumar, S. D., Loh, W. T., Manikandan, J., *et al.*, (2008). Global gene expression analysis of cranial neural tubes in embryos of diabetic mice. *Journal of Neuroscience Research*. 86(16):3481–3493. doi:10.1002/jnr.21800.
- Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., *et al.*, (2007). N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Developmental Biology*. 304:22–33. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.12.014.
- Kaestner, K., Knöchel, W., Martínez, D. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & Development*. 14(2):142-6.

- Kambhampati, S., Li, Y., Verma, A., Sassano, A., *et al.*, (2003). Activation of Protein Kinase C δ by All-trans-retinoic Acid. *Journal of Biological Chemistry*. 278(35): 32544–32551. doi:10.1074/jbc.m301523200.
- Kitamura, K., Mizuno, K., Etoh, A., Akita, Y., *et al.*, (2003). The second phase activation of protein kinase C delta at late G1 is required for DNA synthesis in serum-induced cell cycle progression. *Genes to Cells*. 8(4):311–324. doi:10.1046/j.1365-2443.2003.00635.x.
- Kraushar, M. L., Viljetic, B., Wijeratne, H. R. S., Thompson, K., *et al.*, (2015). Thalamic WNT3 Secretion Spatiotemporally Regulates the Neocortical Ribosome Signature and mRNA Translation to Specify Neocortical Cell Subtypes. *Journal of Neuroscience*. 35(31):10911–10926. doi:10.1523/jneurosci.0601-15.2015.
- Kwan, K. Y., Sestan, N. y Anton, E. S. (2012). Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development*. 139:1535-1546. doi: 10.1242/dev.069963.
- Kwon, Y., Kim, H. J., Park, S., Park, Y.-G., *et al.*, (2017). Body Mass Index-Related Mortality in Patients with Type 2 Diabetes and Heterogeneity in Obesity Paradox Studies: A Dose-Response Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 12(1):e0168247. doi:10.1371/journal.pone.0168247.
- Lee, L. M. Y., Leung, M. B. W., Kwok, R. C. Y., Leung, Y. C., *et al.*, (2017). Perturbation of Retinoid Homeostasis Increases Malformation Risk in Embryos Exposed to Pregestational Diabetes. *Diabetes*. 66(4):1041–1051. doi:10.2337/db15-1570.
- Lehnen H, Zechner U. y Haaf T. (2013). Epigenetics of gestational diabetes mellitus and offspring health: the time for action is in early stages of life. *Molecular Human Reproduction*. 19:415–22. doi: 10.1093/molehr/gat020.

- Liao, D. M., Ng, Y. K., Tay, S. S. W., Ling, E. A. *et al.*, (2004). Altered gene expression with abnormal patterning of the telencephalon in embryos of diabetic albino swiss mice. *Diabetologia*. 47:523–531. doi: 10.1007/s00125-004-1351-5.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods: a companion to methods in enzymology*. 25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lodato S. y Arlotta P. (2015). Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. *Cell & Developmental Biology*. 31:11.1–11.22. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125353.
- Lui J. H., Hansen D. V. y Kriegstein A. R. (2011). Development and evolution of the human neocortex. *Cell*. 146(1):18–36. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.030.
- Ma, R. Y., Tong, T. H., Cheung, A. M., Tsang, A. C., *et al.*, (2010). Raf/MEK/MAPK signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of FOXM1c. *Methods in molecular biology*. 647:113-23. doi: 10.1007/978-1-60761-738-9_6.
- Mao, Y., Ge, X., Frank, C. L., Madison, J. M., *et al.*, (2009). DISC1 regulates neural progenitor proliferation via modulation of GSK3 β / β -catenin signaling. *Cell*. 36(6):1017-1931. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.044.
- Márquez-Valadez, B., Aquino-Miranda, G., Quintero-Romero, M.-O., Papacostas-Quintanilla, H., *et al.*, (2019). The Systemic Administration of the Histamine H1 Receptor Antagonist/Inverse Agonist Chlorpheniramine to Pregnant Rats Impairs the Development of Nigro-Striatal Dopaminergic Neurons. *Frontiers in Neuroscience*. 13:360. doi: 10.3389/fnins.2019.00360.

- Martynoga, B., Drechsel, D. y Guillemot, F. (2012). Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 4(a):008359. doi: 10.1101/cshperspect.a008359.
- McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., *et al.*, (2019). Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*. 5(1):47. doi:10.1038/s41572-019-0098-8.
- Megson, A. C., Walker, E. M., y Hill, S. J. (2001). Role of Protein Kinase C α in Signaling from the Histamine H1 Receptor to the Nucleus. *Molecular Pharmacology*. 59(5):1012–1021. doi:10.1124/mol.59.5.1012.
- Mihalas, A. B., Elsen, G. E., Bedogni, F., Daza, R. A. M., *et al.*, (2016). Intermediate Progenitor Cohorts Differentially Generate Cortical Layers and Require Tbr2 for Timely Acquisition of Neuronal Subtype Identity. *Cell Reports*. 16(1):92–105. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.072.
- Mizuguchi, H., Miyamoto, Y., Terao, T., Yoshida, H., *et al.*, (2021). Signaling Pathway of Histamine H1 Receptor-Mediated Histamine H1 Receptor Gene Upregulation Induced by Histamine in U-373 MG Cells. *Current Issues in Molecular Biology*. 43(3):1243-1254. doi: 10.3390/cimb43030088.
- Mizutani, A., Matsuzaki, A., Momoi, M. Y., Fujita, E., *et al.*, (2006). Intracellular distribution of a speech/language disorder associated FOXP2 mutant. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 353:869–874. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.130.
- Mochly-Rosen, D., Das, K., y Grimes, K. V. (2012). Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature Reviews Drug Discovery*. 11(12):937–957. doi:10.1038/nrd3871.
- Molina-Hernández A., Rodríguez-Martínez G., Escobedo-Ávila I. y Velasco, I. (2013). Histamine up-regulates fibroblast growth factor receptor 1 and increases FOXP2 neurons in cultured neural precursors by histamine type 1

receptor activation: conceivable role of histamine in neurogenesis during cortical development in vivo. *Neural Development*. 8(4):1-14. doi: 10.1186/1749-8104-8-4.

Molina-Hernández, A. y Velasco, I. (2008). Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors. *Journal of Neurochemistry*. 106: 706-717. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05424.x.

Molina-Hernández, A., Díaz, N. F. y Arias-Montaña, J. A. (2012). Histamine in brain development. *Journal of Neurochememistry*. 125:872-882. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07863.x.

Mora-Bermúdez, F. y Huttner, W. B. (2015). Novel insights into mammalian embryonic neural stem cell division: focus on microtubules. *Molecular Biology of the Cell*. 26:4302-4306. doi: 10.1091/mbc.E15-03-0152.

Mora-Bermúdez, F., Matsuzaki, F. y Huttner, W. B. (2014). Specific polar subpopulations of astral microtubules control spindle orientation and symmetric neural stem cell división. *eLifescience*. 3:e02875. doi: 10.7554/eLife.02875.

Naranjo, P. y Naranjo, E. (1968). Embryotoxic effects of antihistamines. *Arzneimittelforschung*. 18:188-195.

Nardozi, J. D., Lott, K. y Cingolani, G. (2010). Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Communication and Signaling*. 8(1):32. doi:10.1186/1478-811x-8-32

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2016. FoxP2 forkhead box P2 [*Rattus norvegicus* (Norway rat)] (Gene ID: 500037) Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=500037>

National Toxicology Report. (1986). Toxicology and carcinogénesis studies of clorpheniramine maleate (CAS No. 113-92-8) I F344/N rats and B6C3F1 mice

(Gavage studies). *National Toxicology Program, Technical Report Series*. National Institutes of Health. 1-59.

Nazer, H, Garcia, H. y Cifuentes L. (2005). Congenital malformations among offspring of diabetic women. *Revista Médica de Chile*. 133:547–54. doi: 10.4067/s0034-98872005000500006.

Nelson, C. A., Wewerka, S., Thomas, K. M., deRegnier, R., *et al.*, (2000). Neurocognitive sequelae of infants of diabetic mothers. *Behavioral Neuroscience*. 114(5):950–956. doi:10.1037/0735-7044.114.5.950.

Newton, A. C. (2018). Protein kinase C: perfectly balanced. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 53(2):208–230. doi:10.1080/10409238.2018.144240.

Nijmeijer, S., Leurs, R. y Vischer, H. F. (2010). Constitutive Activity of the Histamine H₁ Receptor. *Constitutive Activity in Receptors and Other Proteins, Part A*, 127–147. doi:10.1016/b978-0-12-381298-8.00007-1.

Nomura Y., Marks D. J., Grossman B., Yoon M., *et al.*, (2012). Exposure to gestational diabetes mellitus and low socioeconomic status: effects on neurocognitive development and risk of attention deficit/hyperactivity disorder in offspring. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*. 166(4):337-43. doi: 10.1001/archpediatrics.2011.784.

Norma Oficial Mexicana. Características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. (NOM-052-SEMARNAT-2005). En: Diario Oficial de la Federación, México. 23 de junio de 2006.

Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). En: Diario Oficial de la Federación, México. 6 de diciembre de 1999.

- Norma Oficial Mexicana. Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico – infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo. (NOM–087–SEMARNAT–SSA1–2002). En: Diario Oficial de la Federación, México. 17 de febrero de 2003.
- Oliva, J. L., Caino, M. C., Senderowicz, A. M., y Kazanietz, M. G. (2007). S-Phase-specific Activation of PKC α Induces Senescence in Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 283(9):5466–5476. doi:10.1074/jbc.m707576200.
- Ornoy A., Wolf A., Ratzon N., Greenbaum C., *et al.*, (1999). Neurodevelopmental outcome at early school age of children born to mothers with gestational diabetes. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. 81:F10–14. doi: 10.1136/fn.81.1.f10.
- Ornoy A., Ratzon N., Greenbaum C., Wolf A., *et al.*, (2001). 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. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 14(Suppl. 1):681–689. doi: 10.1515/jpem.2001.14.s1.681.
- Ornoy, A., Ratzon, N., Greenbaum, C., Peretz, E., *et al.*, (1998). Neurobehaviour of school age children born to diabetic mothers. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 79:F94–99. doi: 10.1136/fn.79.2.f94.
- Oster, H. y Leitges, M. (2006). Protein Kinase C α but not PKC ζ Suppresses Intestinal Tumor Formation in ApcMin/+ Mice. *Cancer Research*. 66(14):6955–6963. doi:10.1158/0008-5472.can-06-0268.
- Page, K., Li, J., Corbit, K. C., Rumilla, K. M., Soh, J.-W., *et al.*, (2002). Regulation of Airway Smooth Muscle Cyclin D1 Transcription by Protein Kinase C- δ . *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 27(2): 204–213. doi:10.1165/ajrcmb.27.2.20010016oc.

- Pan, G., Li, J., Zhou, Y., Zheng, H., *et al.*, (2006). A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 20(10): 1730-1732. doi: 10.1096/fj.05-5543fje.
- Paridaen, J. T. y Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Reports*. 15(4):351-64. doi: 10.1002/embr.201438447.
- Park, C. Y., Zhou, J., Wong, A. K., Chen, K. M., *et al.*, (2021). Genome-wide landscape of RNA-binding protein target site dysregulation reveals a major impact on psychiatric disorder risk. *Nature Genetics*. 53(2):166–173. doi:10.1038/s41588-020-00761-3
- Pavlikova G., Salbaum J.M. y Kappen C. (2009). Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *BMC genomics*. 10:274. doi: 10.1186/1471-2164-10-274.
- Peñagarikano, O., Abrahams, B. S., Herman, E. I., Winden, K. D., *et al.*, (2011). Absence of CNTNAP2 Leads to Epilepsy, Neuronal Migration Abnormalities, and Core Autism-Related Deficits. *Cell*. 147(1):235–246. doi:10.1016/j.cell.2011.08.040.
- Persson, B. y Gentz, J. (1984). Follow-up of Children of Insulin-dependent and Gestational Diabetic Mothers: Neuropsychological Outcome. *Acta Paediatrica*. 73(3):349–358. doi:10.1111/j.1651-2227.1994.tb17747.x.
- Pysz, M. A., Leontieva, O. V., Bateman, N. W., Uronis, J. M., *et al.*, (2009). PKC α tumor suppression in the intestine is associated with transcriptional and translational inhibition of cyclin D1. *Experimental Cell Research*. 315(8):1415–1428. doi:10.1016/j.yexcr.2009.02.002.
- Rizzo, T. A., Dooley, S. L., Metzger, B. E., Cho, N. H., *et al.*, (1995). Prenatal and perinatal influences on long-term psychomotor development in offspring of

- diabetic mothers. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 173(6):1753–1758. doi:10.1016/0002-9378(95)90422-0.
- Rodríguez-Martínez, G., Velasco, I., García-López, G., Solís, K. H., *et al.*, (2012). Histamine is required during neural stem cell proliferation to increase neuron differentiation. *Neuroscience*. 216:10-17. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.049.
- Rosse C., Linch M., Kermorgant S., Cameron A. J. M., *et al.*, (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11 103–112.
- Rouso, D. L., Pearson, C. A., Gaber, Z. B., Miquelajauregui, A., *et al.*, (2012). FoxP-mediated suppression of N-Cadherin regulates neuroepithelial character and progenitor maintenance in the CNS. *Neuron*. 74(2):314–330. doi: 10.1016/j.neuron.2012.02.024.
- Salazar, M., Reyes, E., Revilla, M., Villavicencio, L., *et al.*, (2015). Importance of maternal diabetes on the chronological deregulation of the intrauterine development: an experimental study in rat. *Journal of Diabetes Research*. 2015:1-11. doi: 10.1155/2015/354265.
- Salge, A. K., Rocha, K. M., Xavier, R. M., Ramalho, W. S., *et al.*, (2012). Macroscopic placental changes associated with fetal and maternal events in diabetes mellitus. *Clinics* 67:1203–8. doi: 10.6061/clinics/2012(10)13.
- Santiago-Walker, A. E., Fikaris, A. J., Kao, G. D., Brown, E. J., *et al.*, (2005). Protein Kinase C δ Stimulates Apoptosis by Initiating G1 Phase Cell Cycle Progression and S Phase Arrest. *Journal of Biological Chemistry*. 280(37):32107–32114. doi:10.1074/jbc.m504432200.
- Schönwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J. y Parker, P. J. (1998). Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase

- Pathway by Conventional, Novel, and Atypical Protein Kinase C Isotypes. *Molecular and Cellular Biology*. 18(2):790–798. doi:10.1128/mcb.18.2.790.
- Shatos, M. A., Hodges, R. R., Bair, J. A., Lashkari, K. *et al.*, (2009). Stimulatory Role of PKC α in Extracellular Regulated Kinase 1/2 Pathway in Conjunctival Goblet Cell Proliferation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 50(4):1619. doi:10.1167/iovs.08-2930.
- Shitamukai, A., Konno, D. y Matsuzaki, F. (2011). Oblique Radial Glial Divisions in the Developing Mouse Neocortex Induce Self-Renewing Progenitors outside the Germinal Zone That Resemble Primate Outer Subventricular Zone Progenitors. *Journal of Neuroscience*. 31(10):3683–3695. doi:10.1523/jneurosci.4773-10.2011.
- Singh, A. (2011). Negative Feedback Through mRNA Provides the Best Control of Gene-Expression Noise. *IEEE Transactions on Nanobioscience*. 10(3):194-200. doi: 10.1109/TNB.2011.2168826.
- Solís, K. H., Méndez, LI., García-López, G., Díaz, N. F., *et al.*, (2017). The histamine H1 receptor participates in the increased dorsal telencephalic neurogenesis in embryos from diabetic rats. *Frontiers in Neuroscience*. 11:1-14. doi: 10.3389/fnins.2017.00676.
- Spiteri, E., Konopka, G., Coppola, G., Bomar, J., *et al.*, (2007). Identification of the transcriptional targets of FOXP2, a gene linked to speech and language, in developing human brain. *The American Journal of Human Genetics*. 81:1144-1157. doi: 10.1086/522237.
- Steinberg, S. F. (2004). Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase C δ . *Biochemical Journal*. 384(3):449–459. doi:10.1042/bj20040704.
- Stroud, J. C., Wu, Y., Bates, D. L., Han, A., *et al.*, (2006). Structure of the Forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure*. 14:159-166. doi: 10.1016/j.str.2005.10.005.

- Taverna, E., Gótz, M. y Huttner, W. B. (2014). The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annual Review of Neuroscience*. 30:465-502. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155801.
- Tibudan, S. S., Wang, Y. y Denning, M. F. (2002). Activation of Protein Kinase C Triggers Irreversible Cell Cycle Withdrawal In Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 119(6):1282–1289. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.19625.x.
- Tonge, P. D. y Andrews, P. W. (2010). Retinoic acid directs neuronal differentiation of human pluripotent stem cell lines in a non-cell-autonomous manner. *Differentiation*. 80(1):20–30. doi:10.1016/j.diff.2010.04.001.
- Tsui, D., Vessey, J., Tomita, H., Kaplan, D. *et al.*, (2013). FoxP2 regulates neurogenesis during embryonic cortical development. *The Journal of Neuroscience*. 33(1):244 –258. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1665-12.2013.
- Valle-Bautista R, Márquez-Valadez B, Herrera-López G, Griego E, *et al.*, (2022) Long-Term Functional and Cytoarchitectonic Effects of the Systemic Administration of the Histamine H1 Receptor Antagonist/Inverse Agonist Chlorpheniramine During Gestation in the Rat Offspring Primary Motor Cortex. *Frontiers in Neuroscience*. 15:740282. doi: 10.3389/fnins.2021.740282.
- Valle-Bautista, R., Márquez-Valadez, B., Fragoso-Cabrera, A. D., García-López, G., *et al.*, (2020). Impaired Cortical Cytoarchitecture and Reduced Excitability of Deep-Layer Neurons in the Offspring of Diabetic Rats. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 8: 564561. doi:10.3389/fcell.2020.564561.
- Vanhala, A., Yamatodani, A. y Panula, P. (1994). Distribution of histamine, 5-Hydroxytryptamine and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and nerve fibers in developing rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 347:101-114. doi: 10.1002/cne.903470108.

- Veena, S. R., Krishnaveni, G. V., Srinivasan, K., Kurpad, A. V., *et al.*, (2010). Childhood cognitive ability: relationship to gestational diabetes mellitus in India. *Diabetologia*, 53(10):2134–2138. doi: 10.1007/s00125-010-1847-0.
- Vernes, S. C., Oliver, P. L., Spiteri, E., Lockstone, H. L., *et al.*, (2011). Foxp2 regulates gene networks implicated in neurite outgrowth in the developing brain. *Public Library of Science Genetics*. 7(7): e1002145. doi: 10.1371/journal.pgen.1002145.
- Vernes, S. C., Spiteri, E., Nicod, J., Groszer, M., *et al.*, (2007). High-throughput analysis of promoter occupancy reveals direct neural targets of FOXP2, a gene mutated in speech and language disorders. *The American Journal of Human Genetics*. 81:1232-1250. doi: 10.1086/522238.
- Volpato, G. T., Damasceno, D. C., Rudge, M. V. C., Padovani, C. R. *et al.*, (2008). Effect of Bauhinia forficata aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*. 116(1):131-7. doi: 10.1016/j.jep.2007.11.013.
- Wada, H., Inagaki, N., Yamatodani, A. y Watanabe T. (1991). Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity? *Trends in neurosciences*. 14(9):415-418. doi: 10.1016/0166-2236(91)90034-r.
- Walker, J. L., Castagnino, P., Chung, B. M., Kazanietz, M. G., *et al.*, (2006). Post-transcriptional Destabilization of p21cip1 by Protein Kinase C in Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 281(50):38127–38132. doi:10.1074/jbc.m609622200.
- Walker, R. M., Hill, A. E., Newman, A. C., Hamilton, G., *et al.*, (2012). The DISC1 promoter: characterization and regulation by FOXP2. *Human Molecular Genetics*. 21(13):2862–2872. doi: 10.1093/hmg/dds111.
- Wu, Q., Tang, W., Luo, Z., Li, Y., *et al.*, (2017). DISC1 Regulates the Proliferation and Migration of Mouse Neural Stem/Progenitor Cells through Pax5, Sox2, Dll1

and Neurog2. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. doi: 10.3389/fncel.2017.00261

Wu, T.-T., Hsieh, Y.-H., Hsieh, Y.-S. y Liu, J.-Y. (2007). Reduction of PKC α decreases cell proliferation, migration, and invasion of human malignant hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry*. 103(1):9–20. doi:10.1002/jcb.21378.

Xu, C., Li, X., Wang, F., Weng, H., *et al.*, (2013). Trehalose prevents neural tube defects by correcting maternal diabetes-suppressed autophagy and neurogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 305(5):E667–E678. doi: 10.1152/ajpendo.00185.2013.

Yang, Y., Shu, C., Li, P. y Igumenova, T. I. (2018). Structural Basis of Protein Kinase C α Regulation by the C-Terminal Tail. *Biophysical Journal*. 114(7):1590–1603. doi:10.1016/j.bpj.2017.12.030.

Yang, Y. y Igumenova, T. I. (2013). The C-Terminal V5 Domain of Protein Kinase C α Is Intrinsically Disordered, with Propensity to Associate with a Membrane Mimetic. *PLoS ONE*. 8(6):e65699. doi:10.1371/journal.pone.0065699.

Yokota, Y. (2001). Id and development. *Oncogene*. 20(58):8290–8298. doi:10.1038/sj.onc.1205090.

Zhang, J., Woodhead, G. J., Swaminathan, S. K., Noles, S. R., *et al.*, (2010). Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-Cadherin maintenance of β -Catenin signaling. *Developmental Cell*. 18:472–479. doi: 10.1016/j.devcel.2009.12.025.

ANEXO 1. Secuenciación de los productos de PCR

Una vez que se identificaron los productos de PKC α , PKC β , PKC γ y PKC δ por PCR, se mandaron a secuenciar las bandas observadas a la Unidad de Biología Molecular en el Instituto de Fisiología Celular-UNAM, para corroborar que los productos de amplificación corresponden a los productos esperados (Figura Suplementaria 1-6).

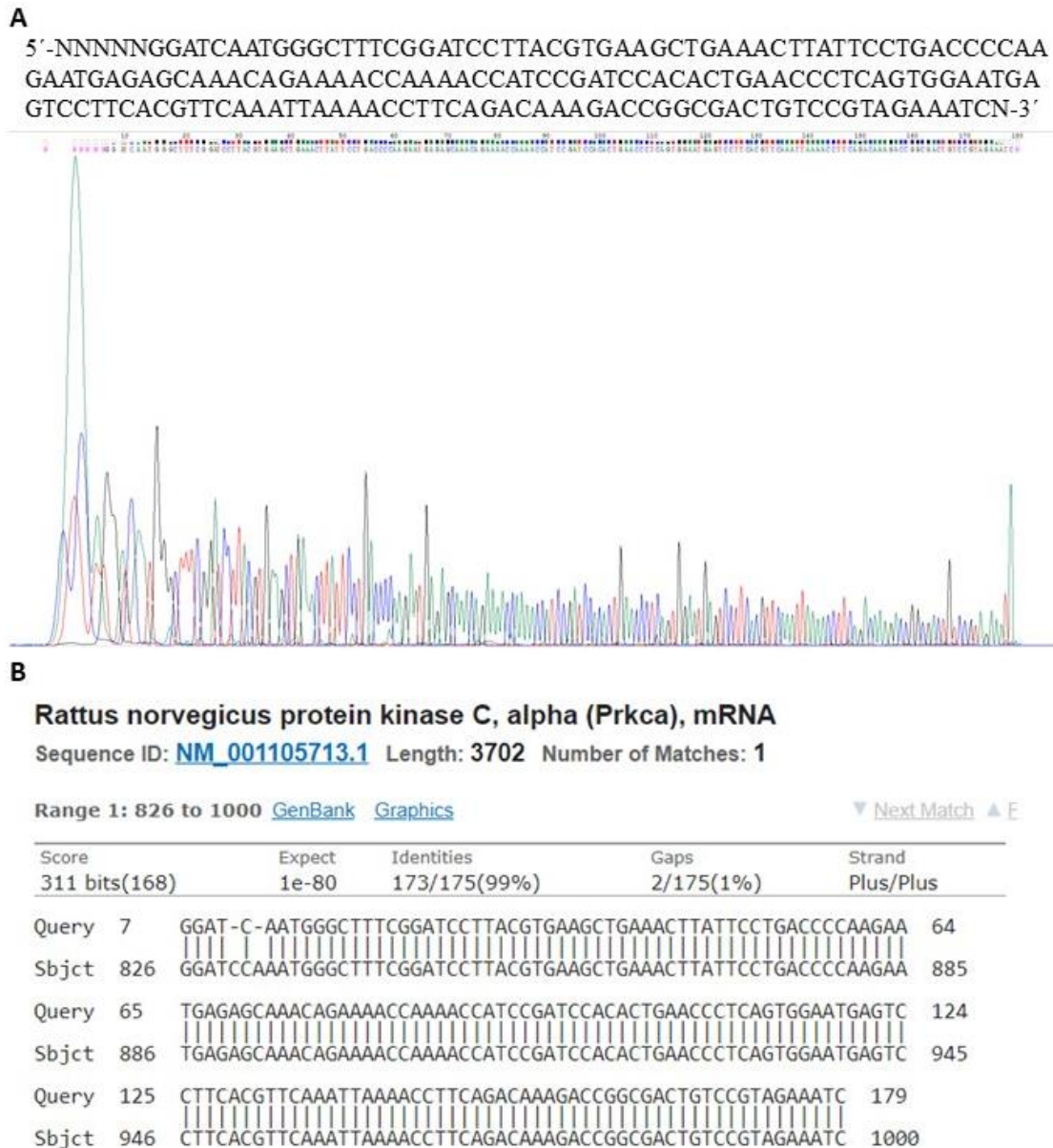


Figura Suplementaria 1. Secuenciación PKC α F. A) Electroferograma obtenido en la secuenciación del producto de PCR. **B)** Comparación de la secuencia de los productos de PCR (Query) con la secuencia del mRNA de PKC α *Rattus Norvegicus* (Sbjct) en BLAST.



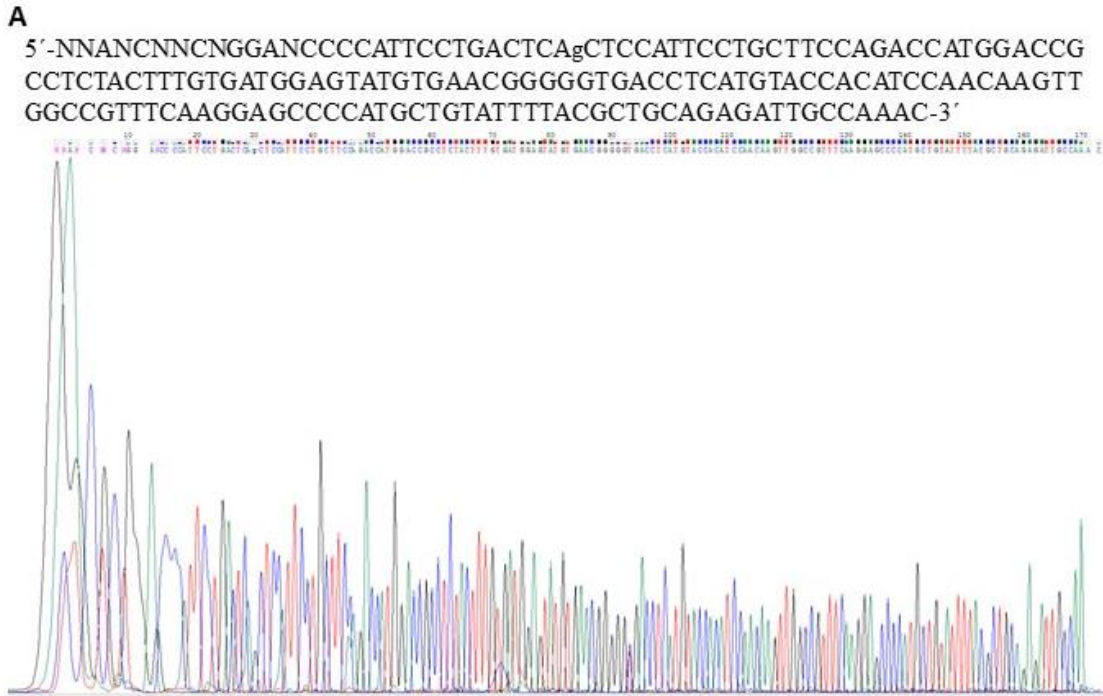
B

Rattus norvegicus protein kinase C, alpha (Prkca), mRNA
 Sequence ID: [NM_001105713.1](#) Length: 3702 Number of Matches: 1

Range 1: 790 to 958 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [P](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
300 bits(162)	3e-77	167/169(99%)	2/169(1%)	Plus/Minus
Query 9	TTTG-ACGTG-AGGACTCATTCCACTGAGGGTTCAGTGTGGATCGGATGGTTTTGGTTTT	66		
Sbjct 958	TTTGAACGTGAAGGACTCATTCCACTGAGGGTTCAGTGTGGATCGGATGGTTTTGGTTTT	899		
Query 67	CTGTTTGCTCTCATTCTTGGGGTCAGGAATAAGTTTCAGCTTCACGTAAGGATCCGAAAG	126		
Sbjct 898	CTGTTTGCTCTCATTCTTGGGGTCAGGAATAAGTTTCAGCTTCACGTAAGGATCCGAAAG	839		
Query 127	CCCATTTGGATCCATAGGGATTAGATTTTTTGCATCTCGTACGGTGACG	175		
Sbjct 838	CCCATTTGGATCCATAGGGATTAGATTTTTTGCATCTCGTACGGTGACG	790		

Figura Suplementaria 2. Secuenciación PKC α R. A) Electroferograma obtenido en la secuenciación del producto de PCR. **B)** Comparación de la secuencia de los productos de PCR (Query) con la secuencia del mRNA de PKC α *Rattus Norvegicus* (Sbjct) en BLAST.



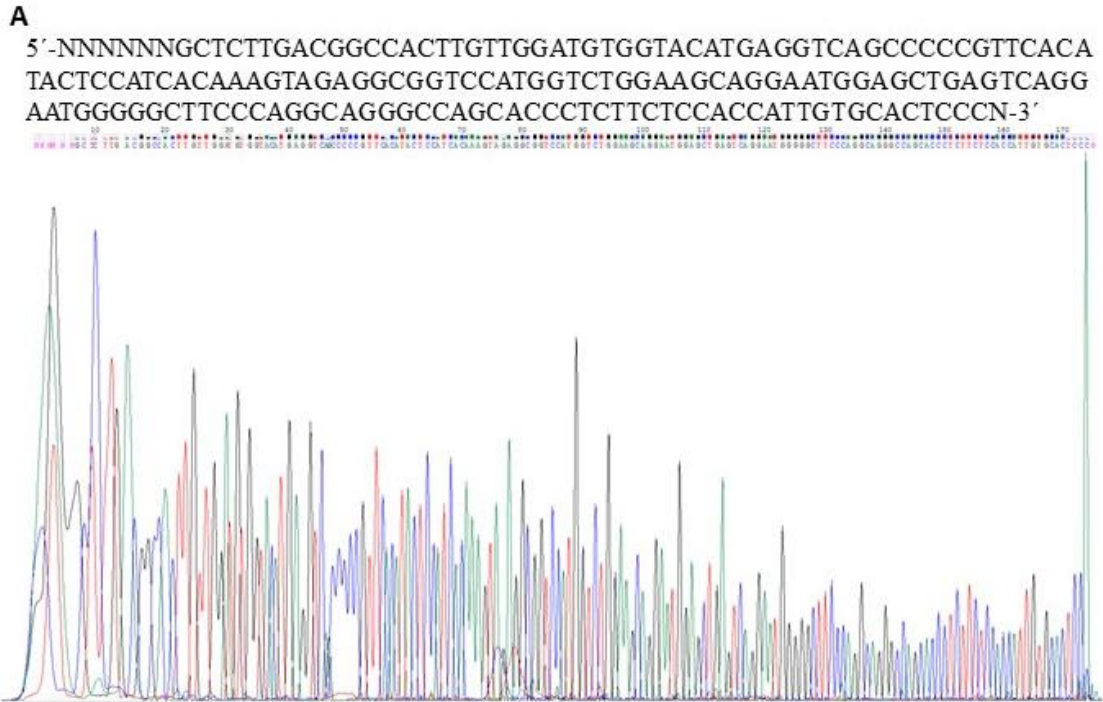
B

Rattus norvegicus protein kinase C, beta (Prkcb), transcript variant 1, mRNA
 Sequence ID: [NM_012713.4](#) Length: 3010 Number of Matches: 1

Range 1: 1329 to 1484 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Print](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
283 bits(153)	3e-72	155/156(99%)	0/156(0%)	Plus/Plus
Query 14	CCCCATTCTGACTCAGCTCCATTCTGCTTCCAGACCATGGACCGCCTCTACTTTGTGA	73		
Sbjct 1329	CCCCATTCTGACTCAGCTCCATTCTGCTTCCAGACCATGGACCGCCTCTACTTTGTGA	1388		
Query 74	TGGAGTATGTGAACGGGGGTGACCTCATGTACCACATCCAACAAGTTGGCCGTTTCAAGG	133		
Sbjct 1389	TGGAGTATGTGAACGGGGGCGACCTCATGTACCACATCCAACAAGTTGGCCGTTTCAAGG	1448		
Query 134	AGCCCCATGCTGTATTTTACGCTGCAGAGATTGCCA	169		
Sbjct 1449	AGCCCCATGCTGTATTTTACGCTGCAGAGATTGCCA	1484		

Figura Suplementaria 3. Secuenciación PKC β F. A) Electroferograma obtenido en la secuenciación del producto de PCR. **B)** Comparación de la secuencia de los productos de PCR (Query) con la secuencia del mRNA de PKC β *Rattus Norvegicus* (Sbjct) en BLAST.



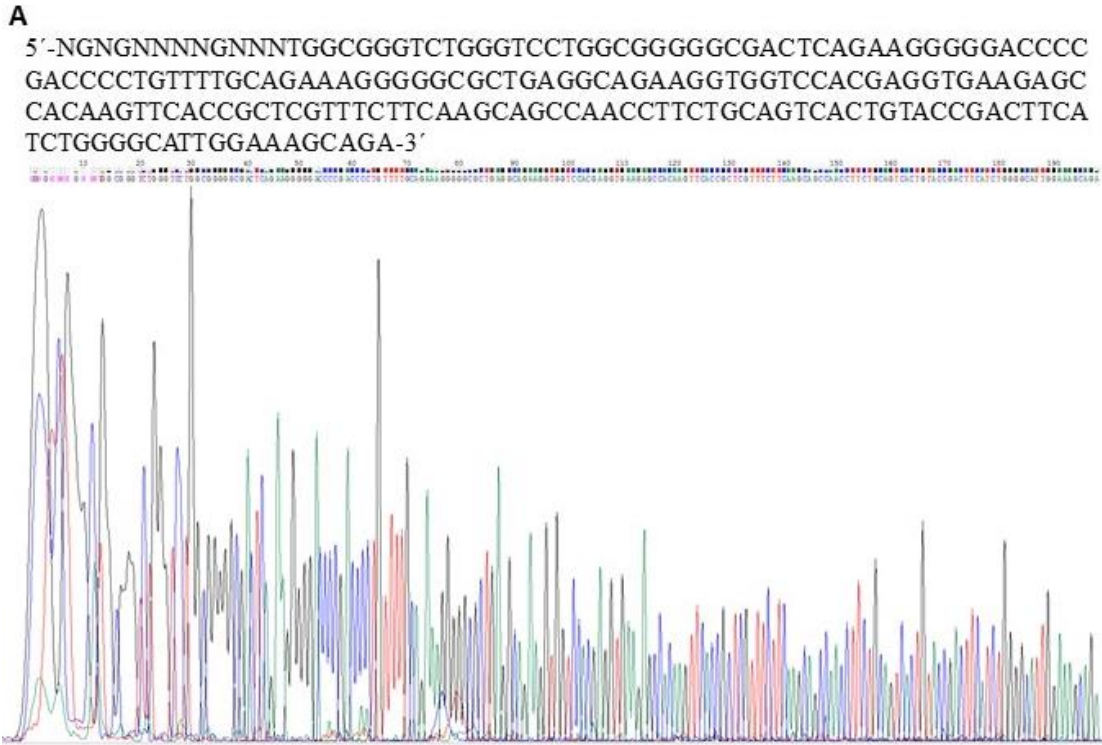
B

Rattus norvegicus protein kinase C, beta (Prkcb), transcript variant 1, mRNA
Sequence ID: [NM_012713.4](#) Length: 3010 Number of Matches: 1

Range 1: 1282 to 1441 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Pre

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
285 bits(154)	7e-73	159/161(99%)	2/161(1%)	Plus/Minus
Query 14	ACGGCC-ACCTGTTGGATGTGGTACATGAGGTCAGCCCCGTTTCACATACTCCATCACAA	72		
Sbjct 1441	ACGGCCAACCTTGTGGATGTGGTACATGAGGTC-GCCCCGTTTCACATACTCCATCACAA	1383		
Query 73	AGTAGAGGCGGTCCATGGTCTGGAAGCAGGAATGGAGCTGAGTCAGGAATGGGGGCTTCC	132		
Sbjct 1382	AGTAGAGGCGGTCCATGGTCTGGAAGCAGGAATGGAGCTGAGTCAGGAATGGGGGCTTCC	1323		
Query 133	CAGGCAGGGCCAGCACCTCTTCTCCACCATTGTGCACTCC	173		
Sbjct 1322	CAGGCAGGGCCAGCACCTCTTCTCCACCATTGTGCACTCC	1282		

Figura Suplementaria 4. Secuenciación PKC β R. A) Electroferograma obtenido en la secuenciación del producto de PCR. **B)** Comparación de la secuencia de los productos de PCR (Query) con la secuencia del mRNA de PKC β *Rattus Norvegicus* (Sbjct) en BLAST.



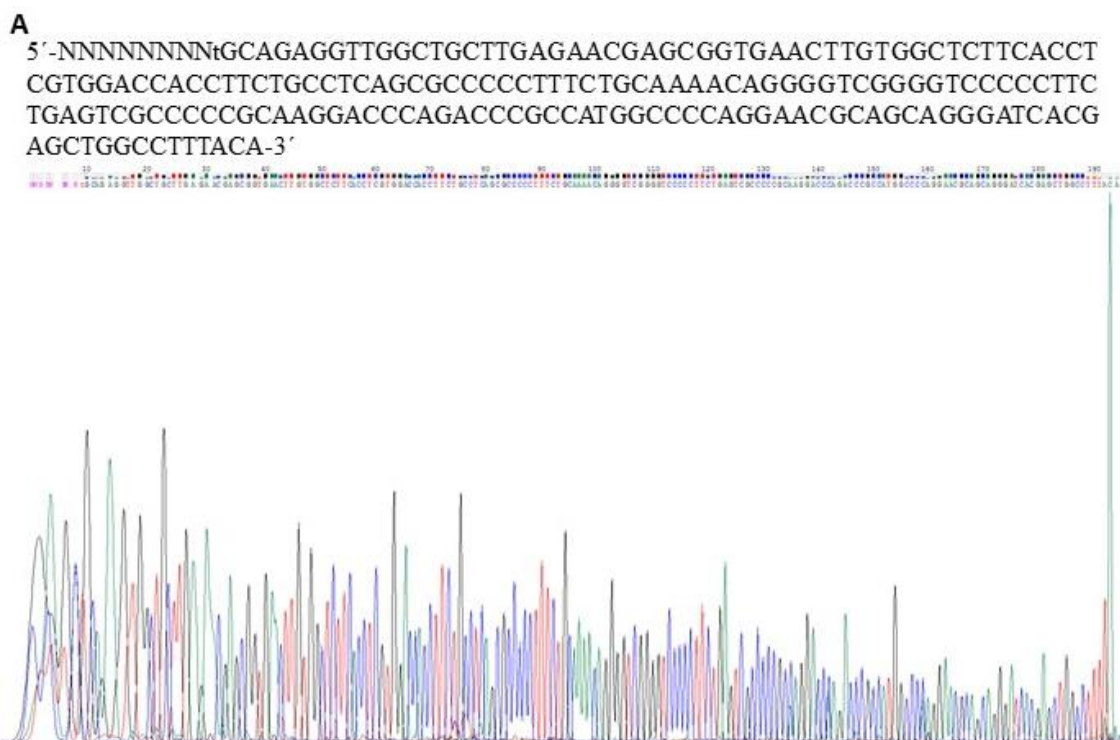
B

Rattus norvegicus protein kinase C, gamma (Prkcg), mRNA
 Sequence ID: [NM_012628.2](#) Length: 3152 Number of Matches: 1

Range 1: 254 to 438 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ [Next Match](#) ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
342 bits(185)	5e-90	185/185(100%)	0/185(0%)	Plus/Plus
Query 13	TGGCGGGTCTGGGTCTGGCGGGGGCGACTCAGAAGGGGGACCCC	GACCCCTGTTTTGCA	72	
Sbjct 254	TGGCGGGTCTGGGTCTGGCGGGGGCGACTCAGAAGGGGGACCCC	GACCCCTGTTTTGCA	313	
Query 73	GAAAGGGGGCGCTGAGGCAGAAGGTGGTCCACGAGGTGAAGAGCCACAAGTTCACCGCTC		132	
Sbjct 314	GAAAGGGGGCGCTGAGGCAGAAGGTGGTCCACGAGGTGAAGAGCCACAAGTTCACCGCTC		373	
Query 133	GTTTCTTCAAGCAGCCAACCTTCTGCAGTCACTGTACCGACTTCATCTGGGGCATTGGAA		192	
Sbjct 374	GTTTCTTCAAGCAGCCAACCTTCTGCAGTCACTGTACCGACTTCATCTGGGGCATTGGAA		433	
Query 193	AGCAG	197		
Sbjct 434	AGCAG	438		

Figura Suplementaria 5. Secuenciación PKCγ F. A) Electroferograma obtenido en la secuenciación del producto de PCR. **B)** Comparación de la secuencia de los productos de PCR (Query) con la secuencia del mRNA de PKCγ *Rattus Norvegicus* (Sbjct) en BLAST.



B

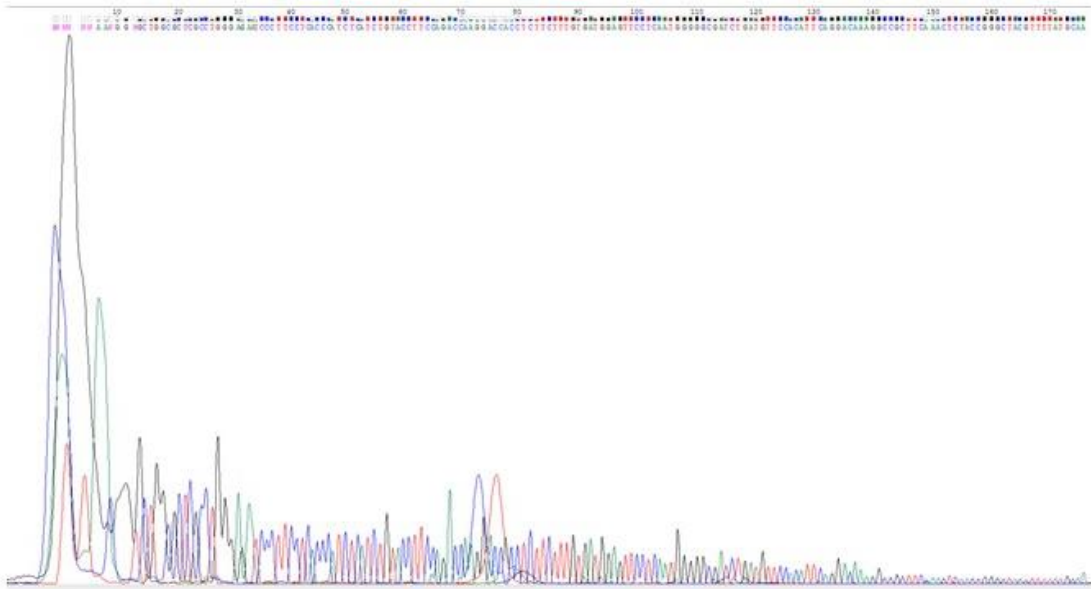
Rattus norvegicus protein kinase C, gamma (Prkcg), mRNA
 Sequence ID: [NM_012628.2](#) Length: 3152 Number of Matches: 1

Range 1: 215 to 400 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ [Next Match](#) ▲ E

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
318 bits(172)	8e-83	182/186(98%)	3/186(1%)	Plus/Minus
Query 9	TGCAG-AGGTTGGCTGCTTGA-G-AACGAGCGGTGAACTTGTGGCTCTTCACCTCGTGGA	65		
Sbjct 400	TGCAGAAGGTTGGCTGCTTGAAGAAACGAGCGGTGAACTTGTGGCTCTTCACCTCGTGGA	341		
Query 66	CCACCTTCTGCCTCAGCGCCCCCTTCTGCAAACAGGGGTCTGGGGTCCCCCTTCTGAGT	125		
Sbjct 340	CCACCTTCTGCCTCAGCGCCCCCTTCTGCAAACAGGGGTCTGGGGTCCCCCTTCTGAGT	281		
Query 126	CGCCCCGCAAGGACCCAGACCCGCCATGGCCCCAGGAACGCAGCAGGGATCACGAGCTG	185		
Sbjct 280	CGCCCCGCCAGGACCCAGACCCGCCATGGCCCCAGGAACGCAGCAGGGATCACGAGCTG	221		
Query 186	GCCTTT 191			
Sbjct 220	GCCTTT 215			

Figura Suplementaria 6. Secuenciación PKCγ R. A) Electroferograma obtenido en la secuenciación del producto de PCR. **B)** Comparación de la secuencia de los productos de PCR (Query) con la secuencia del mRNA de PKCγ *Rattus Norvegicus* (Sbjct) en BLAST.

A
 5'-NNNNNAANGGNGCTGGCGCTCGCCTGGGAGAATCCCTTCTCACCCATCTCATCTGTACC
 TTCCAGACCAAGGACCACCTCTTCTTTGTGATGGAGTTCCTCAATGGGGGCGATCTGATGTT
 CCACATT CAGGACAAAGGCCGCTTCAAAC TCTACCGGGCTACGTTTTATGCAA-3'



B
Rattus norvegicus protein kinase C, delta (Prkcd), mRNA

Sequence ID: [NM_133307.2](#) Length: 2942 Number of Matches: 1

Range 1: 1574 to 1739 [GenBank](#) [Graphics](#)

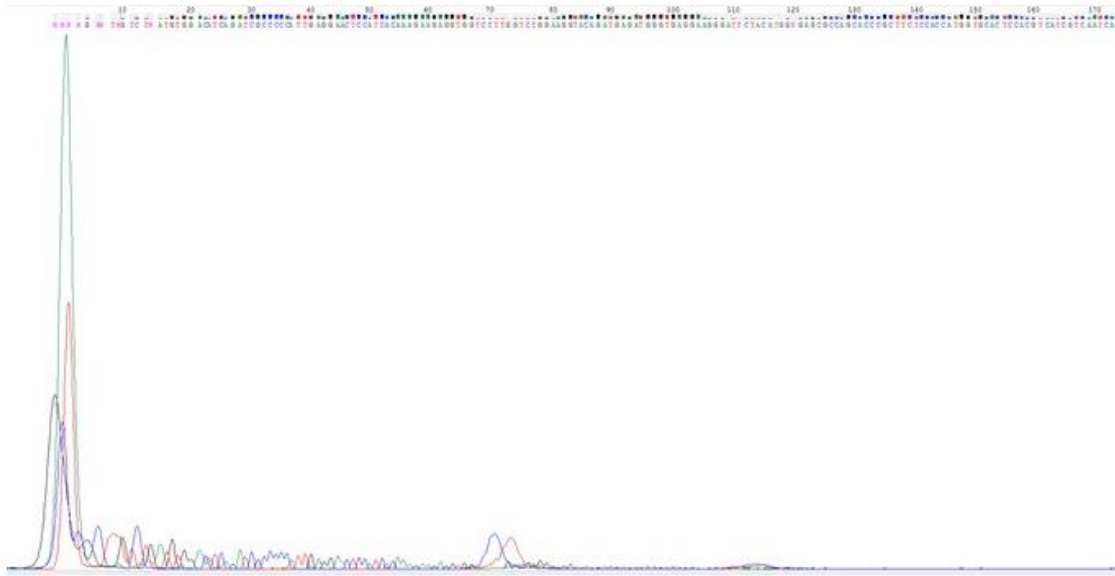
[▼ Next Match](#) [▲ Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
292 bits(158)	7e-78	163/166(98%)	0/166(0%)	Plus/Plus
Query 10	GGNGCTGGCGCTCGCCTGGGAGAATCCCTTCTCACCCATCTCATCTGTACCTTCCAGAC	69		
Sbjct 1574	GGTGCTGGCGCTCGCCTGGGAGAATCCCTTCTCACCCATCTCATCTGTACCTTCCAGAC	1633		
Query 70	CAAGGACCACCTCTTCTTTGTGATGGAGTTCCTCAATGGGGGCGATCTGATGTTCCACAT	129		
Sbjct 1634	CAAGGACCACCTCTTCTTTGTGATGGAGTTCCTCAATGGGGGTGATCTGATGTTCCACAT	1693		
Query 130	TCAGGACAAAGGCCGCTTCAAAC TCTACCGGGCTACGTTTTATGCA	175		
Sbjct 1694	TCAGGACAAAGGCCGCTTCAAAC TCTACCGGGCTACGTTTTATGCA	1739		

Figura Suplementaria 7. Secuenciación PKCδ F. A) Electroferograma obtenido en la secuenciación del producto de PCR. **B)** Comparación de la secuencia de los productos de PCR (Query) con la secuencia del mRNA de PKCδ *Rattus Norvegicus* (Sbjct) en BLAST.

A

5'-NNNNGNNTNGTCTNATGTGGACATCAGATCGCCCCATTGAGGAACTCCATCACAAAGAAGAGGTGGTCCTTG
GTCTGGAAGGTACAGATGAGATGGGTGAGGAAGGGATTCTACATGGNGAGCGCCAGCACCCGCTTCTCCACCATG
GTGCACTCCACGTCATCGTCAATCAACNCGNGTNNAAANNTCNNCACACNACCTN-3'



B

Rattus norvegicus protein kinase C, delta (Prkcd), mRNA

Sequence ID: [NM_133307.2](#) Length: 2942 Number of Matches: 1

Range 1: 1532 to 1693 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Mat](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
261 bits(141)	2e-68	155/162(96%)	1/162(0%)	Plus/Minus

Query 15	ATGTGG-ACATCAGATCGCCCCATTGAGGAACTCCATCACAAAGAAGAGGTGGTCCTTG	73
Sbjct 1693	ATGTGGAACATCAGATCACCCCCATTGAGGAACTCCATCACAAAGAAGAGGTGGTCCTTG	1634
Query 74	GTCTGGAAGGTACAGATGAGATGGGTGAGGAAGGGATTCTACATGGNGAGCGCCAGCACC	133
Sbjct 1633	GTCTGGAAGGTACAGATGAGATGGGTGAGGAAGGGATTCTCCAGGCGAGCGCCAGCACC	1574
Query 134	CGTTTCTCCACCATGGTGCCTCCACGTCATCGTCAATCAAC	175
Sbjct 1573	CGTTTCTCCACCATGGTGCCTCCACGTCATCGTCAATCAAC	1532

Figura Suplementaria 8. Secuenciación PKC δ R. A) Electroferograma obtenido en la secuenciación del producto de PCR. **B)** Comparación de la secuencia de los productos de PCR (Query) con la secuencia del mRNA de PKC δ *Rattus Norvegicus* (Sbjct) en BLAST.