



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas
Opción en Biología Experimental

**“Efectos de la diabetes gestacional en el desempeño cognoscitivo y el
estrés oxidante en el hipocampo y la corteza cerebral de la
descendencia juvenil y adulta de ratas”**

T E S I S

Que para obtener el título de:
Doctora en Ciencias Biológicas opción Biología Experimental

P r e s e n t a:
M.C. Maribel Huerta Cervantes

Directores de tesis:
D.C. Alfredo Saavedra Molina

Co-Directora de tesis:
D.C. María Esther Olvera Cortés



Morelia, Michoacán. Agosto 2020

A mi padre y madre

Ad Astra per aspera

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
1. RESUMEN GENERAL.....	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
3.1 Diabetes gestacional.....	3
3.1.1 Fisiopatología y diagnóstico de la diabetes gestacional	3
3.2 Efecto de la diabetes gestacional en su descendencia.....	8
3.3 Programación fetal	10
3.4 Diabetes gestacional y el cerebro de su descendencia.....	11
3.4.1 El hipocampo.....	12
3.4.2 La corteza cerebral.....	13
3.5 Estrés oxidante	14
4. JUSTIFICACIÓN.....	18
5. HIPÓTESIS.....	19
6. OBJETIVOS.....	20
6.1 Objetivo general	20
6.2 Objetivos específicos	20
7. RESULTADOS	21
7.1 Capítulo 1.....	22
7.2 Capítulo 2.....	42
8. DISCUSIÓN GENERAL.....	65
9. CONCLUSIÓN GENERAL.....	73
10. PERSPECTIVAS	74
11. REFERENCIAS	75
12. ANEXOS.....	84
Artículo de divulgación en la Revista Saber Más, revista de divulgación científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hormonas asociadas con la modificación en la acción y secreción de insulina	5
Tabla 2. Criterios para el diagnóstico de diabetes gestacional (DG)	7

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Sensibilidad de las células β , la glucosa en sangre y la insulina durante el embarazo normal y la diabetes gestacional	6
Figura 2. Programación fetal de la diabetes gestacional	9

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas principalmente al Laboratorio de Bioquímica.

Al Centro de Investigación Biomédica de Michoacán-IMSS en particular al Laboratorio de Neurofisiología Experimental y al Laboratorio de Neuroplasticidad.

Agradecimientos personales

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional, principalmente a mi madre, gracias por todo.

Al Dr. Alfredo Saavedra Molina por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por la confianza que tuvo en mi para la realización de este proyecto y por la asesoría brindada durante este tiempo, siempre le estaré agradecida.

A la Dra. Esther Olvera Cortés por brindarme la confianza para la realización de este trabajo, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo, por la asesoría y amistad brindada.

Al Dr. Miguel Ángel López Vázquez por su apoyo brindado en la realización de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Rocío Montoya Pérez, Dr. Salvador Manzo Ávalos y el Dr. Rafael Salgado Garciglia por las contribuciones realizadas a lo largo del desarrollo de esta tesis y el tiempo brindado.

A Mónica Clemente Guerrero, por sus consejos y apoyo durante el trabajo experimental.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica: Claudita, Eri y Marina por su amistad y compañía.

A mis compañeros del Laboratorio de Neurofisiología Experimental: Aldo, Rosy, Pedro, Javi y Monse por la ayuda en el trabajo experimental y la amistad brindada.

Y, por último, pero no menos importante a mi mejor amigo, el M.C. Donovan J. Peña Montes por su invaluable colaboración en la realización de este trabajo.

“Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro”

Santiago Ramón y Cajal

1. RESUMEN GENERAL

La diabetes gestacional (DG) es una alteración del metabolismo de la glucosa durante el embarazo. Cualquier alteración en el medio intrauterino puede repercutir en la salud de la descendencia durante la vida adulta mediante la “programación fetal”, efecto que puede afectar a la descendencia de varias generaciones. Los hijos de madres con diabetes gestacional presentan problemas de aprendizaje en edad escolar y en la edad adulta una mayor predisposición para desarrollar diabetes o síndrome metabólico, así como alteraciones neurológicas. La exposición a la diabetes gestacional produce en su descendencia estrés oxidante en diversos órganos, el cual ha sido implicado tanto en enfermedades metabólicas como en alteraciones neurodegenerativas. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la diabetes gestacional sobre el desempeño cognoscitivo y el estrés oxidante del hipocampo y corteza cerebral de la descendencia de machos y hembras en edad juvenil y adulta. La diabetes gestacional se indujo mediante una dosis única de estreptozotocina (38mg/kg de peso) a la mitad de la gestación y se obtuvo a la descendencia de primera generación (F1). Hembras F1 fueron apareadas con machos control para obtener a la descendencia de segunda generación (F2). Se utilizaron machos y hembras de 2 (jóvenes) y 6 meses (adultos) de edad de primera y segunda generación. Se evaluó la conducta de ansiedad, el aprendizaje espacial y la memoria a corto plazo. Posteriormente, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se determinaron biomarcadores de estrés oxidante en el hipocampo y la corteza cerebral, así como marcadores metabólicos en suero sanguíneo. Se observó que los machos descendientes de la primera generación de ratas con DG, mostraron un menor nivel de ansiedad en edad juvenil, que permaneció en edad adulta, además presentaron una deficiencia en la memoria a corto plazo en edad adulta. Las hembras descendientes de ratas con DG mostraron un menor nivel de ansiedad en edad adulta y deficiencias en el aprendizaje espacial en edad juvenil. Los machos y las hembras descendientes de ratas con DG mostraron un incremento significativo en las especies reactivas de oxígeno, en la peroxidación lipídica, una alteración en los niveles de glutatión, una menor actividad de la catalasa y la superóxido dismutasa en la corteza cerebral e hipocampo en edad juvenil y adulta. En cuanto a los indicadores metabólicos, las hembras mostraron resistencia a la insulina. Y tanto machos como hembras mostraron una alteración en el metabolismo de lípidos. En la descendencia de la segunda generación de ratas con DG, los machos mostraron una conducta más ansiosa en edad juvenil y no mostraron alteraciones en el aprendizaje espacial o en la memoria a corto plazo. Por otro lado, las hembras mostraron una conducta menos ansiosa en edad juvenil y una deficiencia en la memoria a corto plazo en edad adulta. Al evaluar los biomarcadores de estrés oxidante, las hembras jóvenes y adultas presentaron una mayor peroxidación de lípidos y una mayor concentración de glutatión oxidado, éste último en sólo en edad adulta. Así mismo, la descendencia de ratas con DG machos y hembras presentaron alteraciones en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. En resumen, estos resultados sugieren que la DG modifica el estado metabólico y la capacidad cognoscitiva de su descendencia lo que podría estar relacionado a la generación de estrés oxidante de primera y segunda generación. Los efectos de la diabetes gestacional son dependientes de la edad y el sexo.

Palabras clave: diabetes gestacional; ansiedad; memoria; aprendizaje; corteza cerebral; hipocampo; estrés oxidante; metabolismo

2. SUMMARY

Gestational diabetes (GD) is a temporary alteration of glucose metabolism during pregnancy characterized by glucose intolerance that after delivery can disappear or progress to type 2 diabetes. 16% of births worldwide are affected by some type of hyperglycemia in pregnancy, of which 84% correspond to gestational diabetes. Gestational diabetes affects the health of mother and her offspring who receive the elevated glucose level. Any disruption in the intrauterine milieu can affect the health of the offspring during adult life through “fetal programming”, an effect that can affect the offspring of several generations. Children of mothers with gestational diabetes exhibit learning disruptions in school age and in adulthood enhance the risk to develop diabetes or metabolic syndrome, as well as neurological disorders. Exposure to gestational diabetes produces oxidative stress in various organs in their offspring, oxidative stress has been implicated in both metabolic diseases and neurodegenerative disorders. Therefore, the aim of this work was determinate the short and long-term effect of gestational diabetes on cognitive performance and oxidative stress of hippocampus and cerebral cortex of first- and second-generation male and female offspring. Gestational diabetes was induced by a single dose of streptozotocin in mid-gestation, the first-generation offspring (F1) were obtained, then F1 females were mated with control males to obtain second generation offspring (F2). We use two-month-old rats (young) and six-month-old rats (adult) male and female offspring of first and second generation. We evaluated anxiety like behavior, spatial learning and short-term memory, later the rats were sacrificed by decapitation and oxidative stress biomarkers were determined in hippocampus and cerebral cortex, as well as metabolic markers in serum. We observed that the male offspring of first generation of rats with GD showed a low level of anxiety like behavior in young age and remains in adulthood, they also have a deficiency in short-term memory in adulthood. Female offspring of rats with GD show a low level of anxiety like behavior in adulthood and impairment in spatial learning at young age. Male and female offspring of rats with GD show a significant increase in ROS and lipid peroxidation and an impairment in glutathione status and a low activity of catalase and superoxide dismutase in the cerebral cortex and hippocampus in young and adult ages. Regarding metabolic indicators, females have insulin resistance and females and males show modifications in lipid metabolism. In the second-generation offspring of rats with GD, males show a high level of anxiety like behavior in young age and not show alterations in spatial learning or short-term memory. On the other hand, females show low level of anxiety like behavior at young age and a deficiency in short-term memory in adulthood. When evaluated an oxidative stress, female offspring in young and adult age show high level of lipid peroxidation in cerebral cortex and a high level of oxidized glutathione only in adult age. Likewise, male and female show a disrupt in glucose and lipid metabolism. In summary these results suggest that gestational diabetes modifies the metabolic profile and cognitive behavior in offspring related to oxidative stress in offspring of first and second generation. Effects of gestational diabetes affects more than one generation in a sex and age dependent manner.

Keywords: gestational diabetes; anxiety; memory; learning; cerebral cortex; hippocampus; oxidative stress; metabolism

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1 Diabetes gestacional

La diabetes gestacional (DG) es una alteración del metabolismo de los carbohidratos, que inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo y se caracteriza por la intolerancia a la glucosa que resulta en hiperglucemia con diversos grados de severidad [1]. Se considera un estado transitorio que posterior al parto desaparece, o puede evolucionar a diabetes tipo 2. Actualmente uno de cada seis nacimientos es afectado por la diabetes gestacional. Se estima que 21.3 millones o 16.2% de nacimientos vivos a nivel mundial son afectados por algún tipo de hiperglucemia durante el embarazo, de los cuales el 84% son debidos a la diabetes gestacional [2]. En México, la prevalencia de la DG se reporta entre el 8.7 y el 17.7 %. [3].

Las mujeres con diabetes gestacional tienen mayor riesgo de presentar complicaciones del embarazo como trabajo de parto prolongado, cesárea, preclamsia, hemorragia postparto y mortalidad materna [4]. Además, aproximadamente el 50% de mujeres con un historial clínico de diabetes gestacional desarrolla diabetes tipo 2 dentro de los 5 a 10 años posteriores al parto. La diabetes gestacional ha cobrado relevancia debido a que afecta tanto a la salud de la madre como la de su descendencia. Se ha descrito que los hijos de madres que tuvieron diabetes gestacional tienen una mayor predisposición de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, obesidad o síndrome metabólico durante la vida adulta [5].

3.1.1 Fisiopatología y diagnóstico de la diabetes gestacional

Durante la gestación se producen diversas alteraciones fisiológicas en el metabolismo materno, de manera que se favorece una reserva nutricional al inicio de la gestación para satisfacer el incremento de las demandas materno fetales de etapas más avanzadas del embarazo, así como de la lactancia. La gestación se caracteriza por ser un estado “diabetogénico”, debido a la producción y secreción de varias hormonas necesarias para el desarrollo fetal. De esta manera durante la gestación temprana, la sensibilidad a la insulina incrementa y se promueve la

absorción de glucosa en las reservas de tejido adiposo para prepararse para las demandas energéticas del embarazo posterior [6]. A medida que avanza la gestación se presenta un aumento en la concentración de diversas hormonas locales y placentarias, incluidos el estrógeno, la progesterona, la leptina, el cortisol, el lactógeno placentario y el glucagón, promoviendo un estado de resistencia a la insulina (Tabla 1).

Se ha reportado que la principal hormona responsable de la resistencia a la insulina es el lactógeno placentario, que empieza su síntesis desde la quinta semana de gestación; esta hormona antagoniza la acción de la insulina, induciendo intolerancia materna a la glucosa, lipólisis y proteólisis [7]. Estos cambios fisiológicos llevan a un incremento de la concentración de glucosa sanguínea de la madre, la cual se transporta a través de la placenta hacia el feto. Se ha sugerido que para mantener la homeostasis de la glucosa se produce una hipertrofia e hiperplasia de las células β pancreáticas de la madre, así como un aumento de la secreción de insulina [7]. Posterior al parto la sensibilidad a la insulina materna regresa a los valores previos al embarazo, cuando no hay una adaptación adecuada de las células β del páncreas al incremento del estado hormonal, se desarrolla diabetes gestacional lo que evidencía la importante influencia de la hormonas locales y placentarias en la fisiopatología de la DG (Figura 1) [6, 7].

Tabla 1. Hormonas asociadas con la modificación en la acción y secreción de insulina. ↑ (incremento), ↓ (disminución). Tomada y modificada de G. Di Cianni et al., 2003

Hormona	Efecto
Estrógenos	↑Concentración de insulina ↑Unión a la insulina
Progesterona	↓Transporte de glucosa ↓Unión a la insulina ↓Supresión de la neoglucogénesis hepática inducida por insulina
Cortisol	↑Resistencia a la insulina ↑Fosforilación del receptor de insulina
Lactógeno placentario	↓Sensibilidad de la insulina ↑Secreción de insulina ↑Síntesis de insulina ↑Utilización y oxidación de glucosa ↑Número de células β ↑Masa de células β
Leptina	↑Resistencia a la insulina
Glucagón	↑Resistencia a la insulina

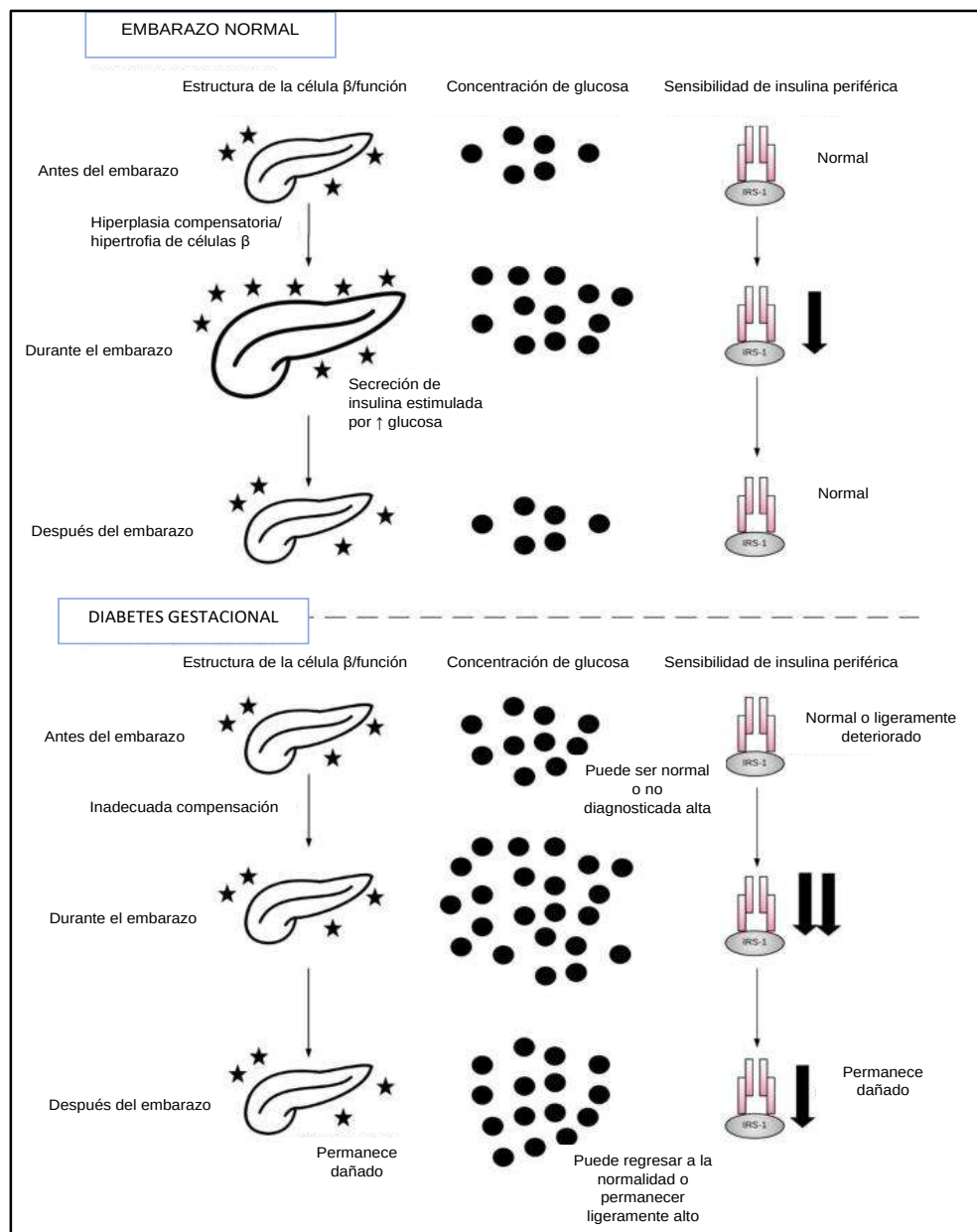


Figura 1 Sensibilidad de las células β , la glucosa en sangre y la insulina durante el embarazo normal y la diabetes gestacional. Durante embarazo normal, las células β pancreáticas sufren hiperplasia e hipertrofia para cumplir con las demandas metabólicas del embarazo. La glucosa en sangre aumenta a medida que disminuye la sensibilidad a la insulina. Después del embarazo las células β , la glucosa en sangre y la sensibilidad a la insulina vuelven a la normalidad. Durante la diabetes gestacional las células β no pueden compensar las demandas del embarazo y cuando se combina con una sensibilidad reducida a la insulina da como resultado hiperglucemia. Después del embarazo, las células β , la glucosa en sangre y la sensibilidad a la insulina pueden volver a la normalidad o puede permanecer alteradas y posteriormente desarrollar diabetes tipo 2. IRS-1, Sustrato 1 del receptor de insulina. Tomada y modificada de Plows et al., 2018.

El diagnóstico de la DG se realiza mediante diversos protocolos basados en la prueba de tolerancia a la glucosa. El diagnóstico puede hacerse en uno o dos pasos; se le denomina en un paso cuando se da una carga de glucosa oral de 100 g, o en dos pasos cuando va precedida por una carga oral de 50 g (Tabla 2). En 1964 de O'Sullivan desarrolló un método de dos pasos para la detección de la diabetes gestacional, se realiza una prueba de tolerancia a la glucosa con una carga de 50 gramos, posteriormente si la prueba es positiva, se realiza la prueba diagnóstica con una carga de 75 o 100 g. El criterio más utilizado en la actualidad es el propuesto por la Asociación Americana de Diabetes.

Debido a las inconsistencias en los criterios utilizados para la detección de la diabetes gestacional, es difícil realizar una estimación de la prevalencia real a nivel mundial. Hasta la fecha no existe un consenso sobre la utilización de un criterio único para el diagnóstico de diabetes gestacional, la guía más recomendada es el criterio de la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo (IADPSG) que es el utilizado por la Federación Internacional de Diabetes [8].

Tabla 2. Criterios para el diagnóstico de diabetes gestacional (DG). Diagnóstico realizado mediante la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO). IADPSG: Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo. Tomada y modificada de Plows et al., 2019.

Criterio	Embarazo	Semanas de embarazo	Pasos	Carga de glucosa (g)	Umbral de glucosa (mg/dL)		
					Ayuno	1h	2h
O'Sullivan, 1964	Todos	24-28	2	100	90.1	165.7	145.9
OMS, 1999	Todos	24-28	1	75	126.1	-	140.5
Asociación Americana de Diabetes (ADA), 2004	Medio y alto riesgo	Riesgo medio 28-32 Riesgo alto 14-18	2	100	95.5	180.1	154.9
Instituto Nacional de Excelencia en Salud y Atención (NICE), 2015	Alto riesgo	Lo más pronto posible	1	75	100.9	-	140.5
IADPSG, 2010 OMS, 2013 ADA, 2016	Todos	24-28	1	75	91.9	180.1	153.1

3.2 Efecto de la diabetes gestacional en su descendencia

Estudios epidemiológicos descritos en 1935 por Fischer y en 1943 por White y Hunt, mostraron que mujeres diabéticas daban a luz a neonatos grandes en peso y talla (macrosomía neonatal) en comparación con los hijos de madres sanas. Pedersen propuso que la concentración alta de glucosa materna cruza la placenta lo que resultaba en hiperinsulinemia y excesivo crecimiento fetal [9]. Posteriormente Freinkel expandió la hipótesis de Pedersen proponiendo que el exceso de energía, incluyendo glucosa, aminoácidos, lípidos, cetonas y posiblemente concentraciones alteradas de otros nutrientes inducen alteraciones morfológicas, bioquímicas o funcionales en diversos órganos [10]. En respuesta a la elevada concentración de glucosa en el medio intrauterino, se produce una sobre estimulación de las células β pancreáticas del feto y de esta manera una mayor síntesis de insulina dando lugar a hiperinsulinemia fetal, que en edad neonatal temprana o adulta puede manifestarse como intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina [11].

La DG afecta a la descendencia en diferentes periodos críticos del desarrollo durante etapas fetales y la vida postnatal temprana, estas alteraciones aumentan el riesgo de padecer síndrome metabólico, obesidad y diabetes tipo 2 en la edad adulta [11, 12]. Un ejemplo de ello son los indios Pima de Arizona, descendientes de mujeres diabéticas, una población ubicada al suroeste de Estados Unidos; el 58% de ellos desarrolló obesidad cuando llegaron a la edad entre 15 y 19 años, este efecto lo presentaron independientemente de su peso al nacer [13]. La gravedad de las complicaciones depende de la etapa de desarrollo en la que se encuentra el feto cuando se produce la hiperglucemia, así como del tiempo y severidad de la diabetes materna.

Diversos estudios han reportado que la descendencia de ratas con DG presenta macrosomía neonatal cuando la diabetes es moderada (glucosa menor a 200 mg/dL) y, por otro lado, se presenta microsomía neonatal (bajo peso y talla) cuando la diabetes es severa (glucosa mayor a 200 mg/dL) [11, 14]. La descendencia de ratas con diabetes gestacional presenta alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos y se ha observado que su páncreas muestra

cambios morfológicos, así como una alteración en la función de las células β pancreáticas en edad fetal y neonatal temprana [15, 16] hiperglucemia o intolerancia a la glucosa, además, concentraciones altas de lípidos séricos y hepáticos durante la vida postnatal temprana y adulta, siendo la resistencia a la insulina el mecanismo subyacente de estas alteraciones dando lugar a hiperinsulinemia [17, 18]. Interesantemente esas alteraciones también se han observado en crías que al nacer parecían estar sanas con un peso al nacimiento similar al grupo control [19]. Aerts *et al.* (1990) [20] demostraron que la diabetes gestacional puede modificar la morfología del páncreas, el metabolismo de la glucosa y los lípidos de más de una generación, aun cuando ya no está expuesta al medio intrauterino adverso mediante un proceso de programación fetal (Figura 2).

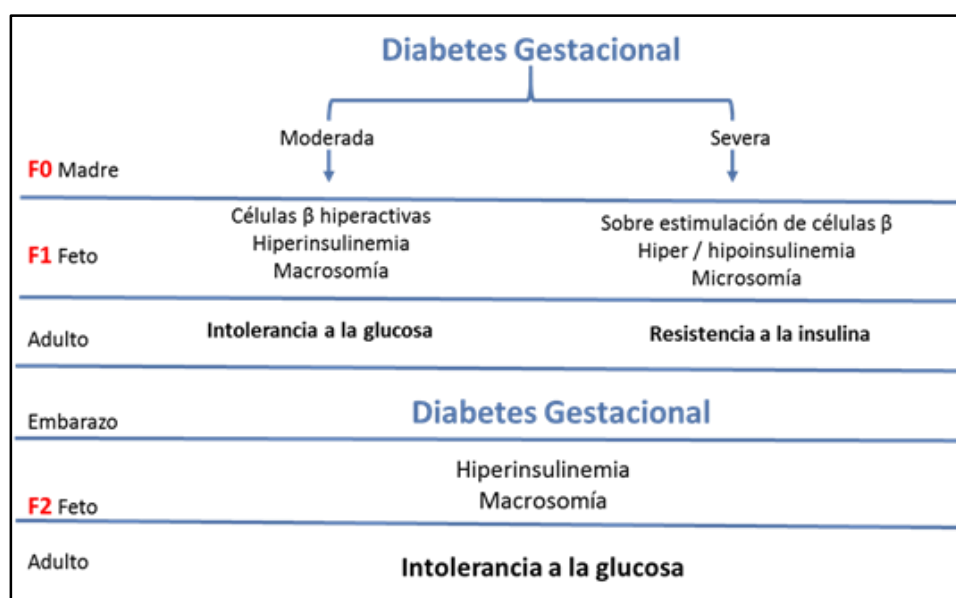


Figura 2. Programación fetal de la diabetes gestación. Tomada y modificada de Aerts y Van Assche, 2006.

3.3 Programación fetal

Durante la gestación, el producto es completamente dependiente de los nutrientes suministrados por su madre y es susceptible de padecer alteraciones con consecuencias a corto y a largo plazo. Durante la etapa fetal y la lactancia se lleva a cabo un rápido crecimiento de todos los órganos y tejidos que requieren de procesos de la proliferación, migración y organización celular, además se establece la regulación metabólica. El desarrollo estructural de los órganos puede ser estimulado o inhibido durante esos periodos críticos del desarrollo por lo que las alteraciones en el medio intrauterino o fetal pueden “programar” la función de diversos órganos a largo plazo [11]. Por ello se propuso la hipótesis conocida como la “hipótesis de Barker”, la cual establece que tales cambios programados durante un período crítico, predisponen al feto a ciertas enfermedades postnatales. Esta hipótesis también es conocida como “origen fetal de la enfermedad del adulto” (FOAD) o más generalmente como “origen del desarrollo de la salud y la enfermedad” (DOHaD) [21]. Este concepto se ha centrado principalmente en la desnutrición materna y en la restricción del crecimiento intrauterino; sin embargo, otras afecciones maternas incluida la diabetes gestacional producen un entorno adverso para el feto en desarrollo, lo que aumenta el riesgo de obesidad, hipertensión, resistencia a la insulina y dislipidemia en la descendencia (Figura 2).

El estado de salud a lo largo de toda la vida es el resultado de una combinación de predisposición genética e influencias ambientales; mientras que el genotipo es determinado en la concepción, el fenotipo es permanentemente modulado por factores externos como los nutrimentales [11]. En modelos de malnutrición deficiente en proteínas durante la etapa prenatal se ha reportado en su descendencia que en la vida posnatal consumió una dieta balanceada, presentan una alteración del metabolismo, tienen concentraciones altas de glucosa e insulina que persisten hasta la tercera generación, aunque en ésta última las modificaciones son menos evidentes.

Evidencia experimental sugiere que el posible mecanismo subyacente de la programación del desarrollo son las alteraciones epigenéticas, las cuales también han sido asociadas con enfermedades como la diabetes y la obesidad. Los mecanismos epigenéticos incluyen modificaciones postraduccionales (PTM) de aminoácidos específicos en las colas de las subunidades de las histonas y las regiones metiladas diferencialmente (DMR) del ADN. Estas modificaciones alteran el empaquetamiento de la cromatina lo que resulta en estados "abierto" o "cerrado" y por lo tanto afecta la expresión génica. Algunas histonas con PTM, como la acetilación son lábiles y están asociadas con la activación génica, otras como la metilación son estables y están asociadas con la inactivación génica [22].

Varios estudios han identificado cambios epigenéticos específicos asociados con perturbaciones del medio intrauterino en los órganos clave del metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina, además, se sugiere que estos cambios pueden transmitirse a través de múltiples generaciones. Recientemente se ha proporcionado evidencia de cambios en la metilación del ADN que afectan la expresión de genes involucrados en la función endocrina, el metabolismo de glucosa y la señalización de insulina en la placenta e hígados de descendientes de ratas con diabetes materna [23]. Estos datos ayudan a dilucidar el mecanismo subyacente de la programación, la participación de mecanismos epigenéticos podría mediar los efectos a través de generaciones.

3.4 Diabetes gestacional y el cerebro de su descendencia

La DG altera la trayectoria normal del desarrollo cerebral predisponiendo a la descendencia a anomalías en el neurodesarrollo como en la función motora, la atención y en la capacidad de aprendizaje [24, 25]. El ambiente adverso asociado con el embarazo de las madres diabéticas involucra múltiples factores de riesgo neurológico que incluyen: hipoxia crónica [26], hiperglucemia, hipoglucemia reactiva, deficiencia de hierro [27], además se ha demostrado que estos factores actúan selectivamente en regiones del cerebro fetal que están involucradas en la memoria explícita como el hipocampo [28, 29]. Aunque no hay datos del efecto de

la hiperglucemia, hipoglucemia o la hipoxia crónica en la corteza cerebral durante el desarrollo fetal, se han reportado alteraciones en dicha región en pacientes con diabetes tipo 1 y 2 [30-33].

3.4.1 El hipocampo

El hipocampo es una estructura subcortical constituida por el cuerno de Ammon (cornu Ammonis, CA) y el giro dentado (GD). El cuerno de Ammon incluye tres principales sub-regiones CA1, CA2 y CA3 formadas por neuronas piramidales glutamatérgicas. Las diferentes sub-regiones se distinguen por el tamaño y la apariencia de sus neuronas, el patrón de sus conexiones y por la posición con respecto al giro dentado [34].

En los diferentes estratos del hipocampo se encuentran interneuronas gabaérgicas inhibitorias como parte de los circuitos locales [35]. El giro dentado está formado por una capa de células granulares monopolares, glutamatérgicas sobre ella una gran capa molecular acelular y una capa difusa de células polimórficas localizada debajo de la capa de células granulares. Entre la capa de células granulares y la capa de células polimórficas se pueden encontrar interneuronas [34]. La corteza entorrinal (CE) es la principal entrada de información al hipocampo, la información arriba a las células granulares del GD a través de la vía perforante y a las células piramidales de CA3. A su vez las células del GD hacen contacto con las células de la región de CA3 por medio de las fibras musgosas, que envían información a la región de CA1 a través de las colaterales de Schaffer. La región de CA1 recibe aferentes de la CE como parte de la vía directa (monosináptica). Esta región proyecta a CE y al subiculum, siendo esta la vía de salida de información procesada en el hipocampo [34, 36].

Experimentalmente se ha demostrado que la lesión hipocampal selectiva produce deficiencias en la adquisición de información espacial tanto en la memoria de referencia como en la de trabajo, deficiencias moderadas en la retención de información espacial aprendida pre-operativamente, extinción facilitada de la información espacial y deficiencias en el aprendizaje contextual; además, animales

con lesión selectiva del campo CA1 o CA3 del hipocampo muestran deficiencias en el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris [37]. El hipocampo es una de las estructuras cerebrales más vulnerables a las alteraciones causadas por el estrés oxidativo, isquemia, alteraciones del desarrollo, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. Lesiones o alteraciones de la función hipocampal producen perturbaciones en el establecimiento de la memoria a largo plazo, memoria de referencia y aprendizaje espacial tanto en seres humanos como en animales de experimentación.

3.4.2 La corteza cerebral

La corteza cerebral prefrontal es una de las regiones cerebrales más vulnerables al estrés y en respuesta puede sufrir modificaciones morfológicas dramáticas. Existe una homología anatómica entre la corteza prefrontal de la rata y los primates, las conexiones tálamo-corticales en la rata son similares en a las conexiones de la corteza prefrontal de primates ya que presenta una invasión densa y recíproca del núcleo dorsomedial del tálamo [38]. La corteza prefrontal de la rata consiste en dos áreas separadas, las regiones medial y lateral. La corteza prefrontal medial (CPFm) consiste de tres diferentes subáreas; la región del cíngulo anterior, el área prelímbica y la región infralímbica, (Cg1, PL e IL, respectivamente) [39]. El área PL (también denominada Cg3) recibe proyecciones masivas del núcleo dorsomedial del tálamo y entradas aferentes de estructuras sensoriales y motoras, además de estructuras límbicas como la amígdala [40] y además una conexión directa con el hipocampo [41]. Consistentemente con las consideraciones anatómicas gruesas, experimentos conductuales tempranos sugirieron que la CPFm de la rata estaba involucrada en la memoria de trabajo [42]. Johnston et al. [43] demostraron que la lesión bilateral de la parte medial de la corteza frontal produjo severo daño en las tareas de la memoria de trabajo tipo ejecución/no ejecución, sugiriendo una capacidad alterada para organizar eventos temporales de manera coherente que puede ser resultado de una alteración general en la memoria de trabajo debido a que esta capacidad requiere del mantenimiento de información y de la organización

temporal de eventos [44]. Diversos trabajos muestran la dependencia de los procesos de la memoria de trabajo sobre la actividad de la corteza prefrontal, así como la interacción hipocampo-corteza prefrontal en el manejo flexible de la información espacial [45-49].

En conjunto con la corteza prefrontal el hipocampo participa en el establecimiento de la habilidad de memoria de trabajo espacial, que proporciona a los individuos los métodos y herramientas para realizar una búsqueda orientada, organización de lugares visitados y por visitar, así como el manejo flexible de la información espacial para localizar metas específicas [42, 48,51]

3.5 Estrés oxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas del nitrógeno (ERN) son productos del metabolismo celular normal. Las ERO y ERN a concentraciones bajas o moderadas participan en diversos procesos celulares fisiológicos y a concentraciones altas producen modificaciones adversas a componentes celulares como lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN lo que resulta en cambios estructurales en las respectivas macromoléculas y llevan a su disfunción o pérdida de la actividad [52]. Las ERO se puede dividir en 2 grupos: radicales libres y no radicales. Las moléculas que contienen uno o más electrones no apareados y que le confieren una alta reactividad se llaman radicales libres, cuando 2 radicales libres comparten sus electrones no apareados, se crean formas no radicales. Las especies reactivas de oxígeno principales son el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Otros radicales libres derivados del oxígeno son los radicales peroxilo ($ROO^{\bullet}$), la forma más simple de estos radicales es el radical hidroperoxilo ($HOO^{\bullet}$) y tiene un papel en la peroxidación de ácidos grasos [53]. Dentro de las ERN se encuentra el óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), el dióxido de nitrógeno ($NO_2^{\bullet}$) y el peroxinitrito ($ONOO^-$). Las especies reactivas son contrarrestadas eficientemente por sistemas antioxidantes, cuando existe un desequilibrio entre especies reactivas y antioxidantes a favor de las especies reactivas se denomina "estrés oxidante" [54]. La mitocondria es el sitio principal de

generación de radicales libres. La cadena de transporte de electrones localizada en la membrana interna de las mitocondrias es una fuente importante de superóxido en las células debido a las reacciones secundarias de los portadores de electrones a lo largo de la cadena con el oxígeno molecular (especialmente los complejos I y III). La membrana mitocondrial externa, por otro lado, produce una cantidad considerable de peróxido de hidrógeno a partir de la enzima monoamina oxidasa de la membrana durante la catálisis de la desaminación oxidativa de las monoaminas (como las catecolaminas). Esto representa una de las principales fuentes para la generación de peróxido de hidrógeno tanto en la matriz mitocondrial como en el citosol. El superóxido y el peróxido de hidrógeno generados por las mitocondrias pueden reaccionar para producir otras ERO, como el radical hidroxilo y el peroxinitrito, lo que explica la estrecha relación entre la actividad mitocondrial y el estrés oxidante celular [55, 56].

Los mecanismos de defensa antioxidantes incluyen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD) que transforman el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, la catalasa (CAT) que descompone al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno y a la enzima glutatión peroxidasa (GPx) que oxida el glutatión y reduce de esta manera el peróxido de hidrógeno. Los antioxidantes no enzimáticos son el ácido ascórbico (vitamina C), el α -tocoferol (vitamina E) y el glutatión (GSH). El glutatión como antioxidante, está constituido por el glutatión reducido (GSH) y por la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) que se encarga de reducir el glutatión oxidado [54].

El estrés oxidante ha sido implicado en varias condiciones patológicas como en la enfermedad cardiovascular, el cáncer, la diabetes, desordenes neurológicos, así como en el envejecimiento [55-60]. En la descendencia de ratas con diabetes gestacional al día posnatal 1 (edad neonatal temprana), se ha observado un incremento de las especies reactivas del oxígeno en diferentes tejidos (páncreas, riñón, cerebro y piel) asociado a una alteración de la actividad de las enzimas antioxidantes [61]. Kamel et al. [62] reportó que la descendencia de ratas con diabetes materna durante edad fetal presenta una alteración del estatus redox que resulta en estrés oxidante y daño al sistema antioxidante que induce vías de la

apoptosis en el páncreas fetal lo que lleva a presentar en edad adulta intolerancia a la glucosa y cuando se combina con una dieta hipercalórica desencadena hiperglucemia.

A nivel cerebral, las ERO en cantidades moderadas o bajas se consideran esenciales para el desarrollo y la función neuronal. El óxido nítrico (ON) y el monóxido de carbono (CO) promueven funciones fisiológicas importantes, como la potenciación a largo plazo (LTP). Se ha propuesto que al activarse la neurona postsináptica se generan en ella moléculas como ON o el CO los cuáles fluyen a la neurona presináptica y actúan como mensajeros retrógrados. Estos mensajeros provocarían en la neurona presináptica la activación de proteínas cinasas que mantendrían aumentada la liberación del neurotransmisor estimulando la potenciación a través de mecanismos dependientes de glutamato [63]. El cerebro posee gran vulnerabilidad a daños oxidativos debido a su alta tasa metabólica y a la elevada concentración de lípidos poliinsaturados que son el blanco de la peroxidación de lípidos que perturba la integridad de las membranas celulares, además una alta concentración de ERO disminuyen la potenciación a largo plazo, la señalización sináptica y los mecanismos de plasticidad cerebral [64-67].

Elevadas concentraciones de ERO desencadenan una gran variedad de cascadas moleculares que aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y alteran la morfología cerebral, causando neuro inflamación y muerte neuronal [68]. Se ha reportado que el hipocampo, la amígdala y las células granulares cerebelosas son los más susceptibles al estrés oxidante [69] y, en consecuencia, son las primeras áreas cerebrales en sufrir un deterioro funcional en la memoria y aprendizaje, en la ansiedad y el control motor respectivamente. El estrés oxidante ha sido implicado en el desarrollo de diversas patologías del sistema nervioso central principalmente las enfermedades neurodegenerativas, incluidas entre ellas la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica, trastornos cerebrovasculares, enfermedades desmielinizantes y trastornos psiquiátricos [70]. Se ha reportado que la alta concentración de glucosa *in vitro*, así como durante la diabetes materna, induce daño al ADN, activación de la

respuesta al daño en el ADN y acumulación de P53 en la etapa de neurulación de células madre neurales y embriones respectivamente [71]. Estas modificaciones disminuyen cuando se les administra un antioxidante como el tempol que imita la actividad de la enzima SOD, por lo que se sugiere que el daño al ADN mediado por estrés oxidante podría participar en la apoptosis inducida por la diabetes materna en el embrión en desarrollo. Los mecanismos que subyacen el efecto de la hiperglucemia materna en su descendencia podrían involucrar al estrés oxidante, la hipoxia, la apoptosis, así como modificaciones epigenéticas [72].

4. JUSTIFICACIÓN

La DG es una enfermedad que afecta a la madre y a su producto en desarrollo y de no ser controlada la enfermedad en la madre puede evolucionar a diabetes mellitus tipo 2. La DG cobra relevancia en la actualidad debido a que datos de la Federación Internacional de la Diabetes reporta que uno de cada seis nacimientos es afectado por esta enfermedad. Existen evidencias de que las modificaciones en el medio intrauterino pueden afectar la salud de la descendencia directa, y se ha propuesto que también puede afectar a las generaciones subsecuentes incluso sin haber estado expuesta a la hiperglucemia intrauterina a través de la programación intrauterina. Dentro de estas modificaciones se han descrito afectaciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos como la intolerancia a la glucosa y dislipidemias, respectivamente, siendo las modificaciones en las acciones en la insulina el factor subyacente. Adicionalmente las enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 se han asociado con alteraciones en la conducta cognoscitiva y en la morfología neuronal de áreas cerebrales asociadas a estas funciones como el hipocampo y la corteza cerebral.

Diversos estudios han reportado que, en animales de experimentación con DG, así como su descendencia están expuestos a estrés oxidante, uno de los principales factores asociados a la neurodegeneración. Sin embargo, existe poca información acerca del efecto de la diabetes gestacional sobre procesos cognoscitivos, así como del estrés oxidante como posible factor subyacente en áreas cerebrales involucradas a la cognición de su descendencia.

5. HIPÓTESIS

La diabetes gestacional disminuye la capacidad cognoscitiva en la descendencia vía estrés oxidante en el hipocampo y la corteza cerebral.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la diabetes gestacional en las capacidades cognoscitivas y el estrés oxidante en el hipocampo y la corteza cerebral de la descendencia en edad juvenil y adulta.

6.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la diabetes gestacional en la capacidad cognoscitiva en la descendencia de primera y segunda generación en edad juvenil y adulta.
- Determinar el efecto de la diabetes gestacional en el estrés oxidante del hipocampo y la corteza cerebral en la descendencia de primera y segunda generación en edad juvenil y adulta.
- Determinar el efecto de la diabetes gestacional en los parámetros metabólicos en la descendencia de primera y segunda generación en edad juvenil y adulta.

7. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se presentan divididos en dos capítulos. El capítulo uno corresponde a los resultados de los tres objetivos en la descendencia de primera generación F1 de ratas con diabetes gestacional. Con los resultados obtenidos en esta primera parte se publicó el artículo: Gestational Diabetes Triggers Oxidative Stress in Hippocampus and Cerebral Cortex and Cognitive Behavior Modifications in Rat Offspring: Age- and Sex-Dependent Effects. 2020. Maribel Huerta-Cervantes, Donovan J. Peña-Montes, Rocío Montoya-Pérez, Xóchitl Trujillo, Miguel Huerta, Miguel Ángel López-Vázquez, María Esther Olvera-Cortés and Alfredo Saavedra-Molina. *Nutrients* 2020, 12, 376. Factor de impacto: 4.546 (2020).

En el capítulo dos se muestran los resultados de los tres objetivos en la descendencia de segunda generación F2 de ratas con diabetes gestacional. Efectos de la diabetes gestacional en la capacidad cognoscitiva, el estrés oxidante y el metabolismo de la descendencia de segunda generación de ratas.

7.1Capítulo 1

La diabetes gestacional desencadena estrés oxidante en el hipocampo y corteza cerebral y modificaciones conductuales en la descendencia de ratas: Efectos dependientes de la edad y el sexo



Article

Gestational Diabetes Triggers Oxidative Stress in Hippocampus and Cerebral Cortex and Cognitive Behavior Modifications in Rat Offspring: Age- and Sex-Dependent Effects

Maribel Huerta-Cervantes ¹, Donovan J. Peña-Montes ^{1,2}, Rocío Montoya-Pérez ¹,
Xóchitl Trujillo ², Miguel Huerta ², Miguel Ángel López-Vázquez ³,
María Esther Olvera-Cortés ^{3,*} and Alfredo Saavedra-Molina ^{1,*}

¹ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030 Morelia, Mich., Mexico; marzy112@yahoo.com.mx (M.H.-C.); yodonnies@gmail.com (D.J.P.-M.); rmontoya@umich.mx (R.M.-P.)

² Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, 28045 Colima, Colima, Mexico; rosio@ucol.mx (X.T.); huertam@ucol.mx (M.H.)

³ Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, 58341 Morelia, Mich., Mexico; migangelv@yahoo.com.mx

* Correspondence: saavedra@umich.mx (A.S.-M.); maesolco@yahoo.com (M.E.O.-C.);
Tel.: +52-443-326-5790 (A.S.-M.); + 52-443-322-2600 (M.E.O.-C.)

Received: 23 November 2019; Accepted: 27 January 2020; Published: 31 January 2020



Abstract: Gestational diabetes (GD) has been linked with an increased risk of developing metabolic disorders and behavioral abnormalities in the offspring. Oxidative stress is strongly associated with neurodegeneration and cognitive disruption. In the offspring brains in a GD experimental rat model, increased oxidative stress in the prenatal and postnatal stages was reported. However, long-term alterations to offspring behavior and oxidative stress, caused by changes in the cerebral cortex and hippocampus, remain unclear. In this study, we evaluated the effect of GD on young and adult male and female rat offspring in metabolic parameters, cognitive behavior, and oxidative stress. GD was induced using streptozotocin in dams. Next, the offspring were evaluated at two and six months of age. Anxiety-like behavior was evaluated using the elevated plus maze and open field maze; spatial learning and short-term memory were evaluated using the Morris water maze and radial maze, respectively. We determined oxidative stress biomarkers (reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation and glutathione status) and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in the brain of offspring. We observed that male GD offspring showed a reduced level of anxiety at both ages as they spent less time in the closed arms of the elevated plus maze at adult age ($P = 0.019$, $d = 1.083$ (size effect)) and spent more time in the open area of an open field ($P = 0.0412$, $d = 0.743$) when young and adult age ($P = 0.018$, $d = 0.65$). Adult female GD offspring showed a reduced level of anxiety ($P = 0.036$; $d = 0.966$), and young female GD offspring showed a deficiency in spatial learning ($P = 0.0291$ vs. control, $d = 3.207$). Adult male GD offspring showed a deficiency in short-term memory ($P = 0.017$, $d = 1.795$). We found an increase in ROS and lipid peroxidation, a disruption in the glutathione status, and decreased activity of catalase and superoxide dismutase ($P < 0.05$ vs. control, $d > 1.0$), in the cerebral cortex and hippocampus of male and female GD offspring. GD altered metabolism; male offspring of both ages and adult females showed a high level of triglycerides and a lower level of high-density lipoprotein-cholesterol ($P < 0.05$ vs. control, $d > 1.0$). Young and adult female offspring displayed higher insulin levels ($P < 0.05$, $d > 1.0$). These results suggest that gestational diabetes modifies oxidative stress and cognitive behavior in an age- and sex-dependent manner.

Keywords: anxiety; behavior; cortex; gestational diabetes; hippocampus; learning; metabolism; oxidative stress

1. Introduction

Gestational diabetes (GD) is a temporary disorder of glucose metabolism during pregnancy, is diagnosed with a fasting glucose level >126 mg/dL, 2-hour glucose 200 mg/dL following a 75 g oral glucose or a casual glucose >200 mg/dL [1]. Currently, one out of six human births are affected by gestational diabetes. Of live births, 21.3 million or 16.2% had some form of hyperglycemia in pregnancy diabetes [2] GD affects offspring at different critical developmental periods during the fetal stages and early postnatal life, and these alterations enhance the risk of health disturbances in adulthood, like metabolic syndrome, diabetes, and obesity [3–6].

In animal models, GD was shown to cause alterations in the neonatal body weight of offspring, as well as alterations in the fetal pancreatic function, morphology, number and size of pancreatic islets, resulting in glucose intolerance or insulin resistance in different organs, such as liver, muscle, and adipose tissue [7–9]. Whereas the effect of GD has been studied in peripheral organs, the effects of GD on the behavior and neural development in the cerebral cortex and hippocampus remains unclear. The hippocampus (the hippocampal formation includes Cornu Amonis (CA) 1–4, dentate gyrus, entorhinal cortex, subiculum, and pre- and para-subiculum) is a particularly important structure for processing spatial learning and memory, and together with the cerebral prefrontal cortex, participates in working memory and executive function organization. The development delay and/or damages to these structures are responsible for cognitive deficiency [10]. Some studies in humans have described that maternal diabetes affects the intrauterine development of the nervous system and cognitive abilities of the offspring. While the offspring of mothers with gestational diabetes show alterations in prenatal neurodevelopment, explicit memory [11], as well as electrophysiological alterations related attention deficit [12], and motor alterations [13].

Studies on diabetic rat offspring have reported retarded dendritic development and lower expression of the insulin-like growth factor at the embryonic age [14], a critical factor in neuron growth, dendritic arborization and synaptogenesis [15]. A significant reduction in the pyramidal cell density of CA1 and CA3 hippocampal subfields at postnatal days 7 and 21 was reported in GD offspring [16].

Several studies have indicated that rats with GD and their offspring are exposed to oxidative stress, reporting increased biomarkers of oxidative stress in the liver, muscle, pancreatic cells, and brain [17,18]. In the brain, oxidative stress is involved in the neuroinflammatory state and excitotoxicity, two main causes of neural death [19]. In humans and experimental models, oxidative stress has been linked to cognitive impairment in neurodegenerative diseases, like Alzheimer's and Parkinson's, as well as in age-related cognitive decline [20]. Neurons are particularly vulnerable to oxidative damage due to their high polyunsaturated fatty acid composition in membranes and their high oxygen and energy demand and glucose consumption [21]. Therefore, determining the role of oxidative stress in GD offspring rats is necessary.

Cognitive impairment in the diabetic milieu has been amply recognized in diabetes mellitus (DM) 1 and 2 [22,23]. In rats, feeding a diet high in sucrose or fat was shown to increase anxiety-like behavior [24,25] but the relationship between hyperglycemia in the intrauterine milieu, as in the case of gestational diabetes (GD), and its impact in the cognitive development and behavior of offspring and a possible mechanism has been poorly studied. The aim of this study was to evaluate the effects of gestational diabetes on cognitive performance, focusing on anxiety-like behavior and learning in juvenile and adult offspring rats. We also investigated the impact of gestational diabetes on oxidative stress and metabolic parameters in the hippocampus and cerebral cortex at the same ages.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design

In this study we employed a total of twelve Wistar female rats, weighing 280–300 g. Rats were maintained under a normal light/dark cycle (12/12 h) at a temperature of 22 °C in an animal house, with free access to standard rat food and water (Rat Diet 5012, Lab Diet, St Louis, MO, USA). All experiments were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No.80-23) and the “Norma Oficial Mexicana” regarding the use of experimental animals (NOM-062-ZOO-1999), and approved by the Research Ethics Committee of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (R-2017-1603-16).

Female rats were mated with male control rats. Next, vaginal smears were performed over consecutive days to verify the presence of sperm. Once sperm was observed, gestational day 0 had begun, and pregnant rats (dams) were randomly divided into two groups: gestational control rats (GC, $n = 6$) and gestational diabetic rats (GD, $n = 6$). On the ninth day of gestation (mid gestation), diabetes was induced, after 16 h of fasting, by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 38 mg/kg of body weight), freshly dissolved in citrate buffer (0.1 M, pH 4.5), and GC rats were injected with an equivalent volume of a citrate buffer. To select the STZ dose used in this study we carry out a screening injecting the drug (STZ) at different doses (35 to 45 mg/kg, intraperitoneally). A 38 mg/kg dose was selected taking into account that elevated glucose levels were maintained in a sustained manner and keeping the pregnancy viable and the viability of fetuses, as well as their development. Gestational diabetes was confirmed by a tail blood sample, and the glucose level was measured using a glucometer (Accu-chek Performa System, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) two days later. Only rats that exhibited blood glucose levels between 200 and 350 mg/dL were considered in this study. Glucose levels were monitored throughout pregnancy by taking postprandial blood on days 12, 16, and 20 of pregnancy. At born, all litters were adjusted to 12 pups, maintaining an equal number of males and females. We used two male and two female rats from each litter; after weaning, rats were maintained in groups of four per cage, until the behavioral evaluation. Two-month-old rats (young) and six-month-old rats (adult) male and female offspring from the gestational control (GC) and gestational diabetes (GD) dams; were studied. Behavior tests were applied to 10–12 rats from each group. Next, 5–6 rats were sacrificed to determine oxidative stress biomarkers and the other half of the rats was perfused with formaldehyde solution and reserved for subsequent morphological studies.

2.2. Behavioral Test

Anxiety-like behavior was evaluated using the elevated plus maze and open field test. The Morris water maze was used to evaluate spatial learning, and the eight-arm radial maze was employed to assess spatial working memory.

2.2.1. Elevated Plus Maze

First, anxiety-like behavior was evaluated by employing the elevated plus maze. The maze consisted of two opposite open arms (50 × 10 cm) and two opposite enclosed arms (50 × 10 × 40 cm); with an open roof. The maze was elevated to a height of 50 cm and lighted by a 60-watt white lamp in the center of the maze. Rats were individually placed in the central area of the maze, and their behavior was recorded for 10 min and analyzed using the Sci-Works software (DataWave Technologies Inc., Longmont, CO, USA). The time spent in the closed arms was measured.

2.2.2. Open Field Test

We also evaluated anxiety-like behavior using the open field test. The test consisted of a square arena (60 × 60 cm), divided into eight quadrants (peripheral areas, including corner areas) and a central zone. The arena was lighted by a 60-watt white lamp, situated in the center. Similar to the elevated plus maze, the rats were placed individually into the central area, and their behavior was recorded for

10 min and analyzed using the Sci-Works software (DataWave Technologies Inc., Longmont, CO, USA). The total time spent in the open area (central zone) was measured.

2.2.3. Morris Water Maze

Next, spatial learning was evaluated using the Morris Water Maze. The maze consisted of a circular pool (measuring 100 cm diameter and 28 cm high, for young rats, 150 cm diameter and 50 cm high, for adult rats) filled with water, maintained at 27 ± 2 °C, and dyed dark blue by the addition of gentian violet. The pool contained a circular platform that was placed 2 cm under the water level in a fixed position in one of the four virtual quadrants of the maze during the study. Visual cues were located around the experimental room. Ten different starting positions were placed around the perimeter of the pool. The trial began when a rat was placed in the water facing the wall of the pool at one of the starting points. If the rat failed to find the platform within 60 seconds, it was guided to the platform by the experimenter. Once the rat reached the platform, it was allowed to remain there for 15 seconds.

Training consisted of two trials per day (beginning from 1 of the 10 starting positions, which was chosen randomly, with inter-trial period of 20 minutes for 8 consecutive days. On the ninth day, after the last training session, spatial memory was evaluated. Finally, rats were challenged by removing the platform from the pool and allowing them to swim for 30 seconds (probe trial). The swimming routes were recorded and analyzed using the Sci-Works software (DataWave Technologies Inc., Longmont, CO, USA). The escape latency and distance travelled during the 8 days of training, as well as the time spent at each quadrant during the probe trial, were measured.

2.2.4. Radial Maze

The eight-arm radial maze was employed to evaluate short-term memory. The maze consisted of one central circular arena (30 cm in diameter), from which eight radial arms were extended (60 cm $\times$ 10 cm). For this behavioral test, rats were maintained under a food restriction condition (80% of their normal consumption *ad libitum*) for two weeks, followed by a habituation period: Rats were familiarized with the maze during two sessions. On the first day, they were maintained in the maze for 10 minutes, where free exploration occurred; on the second habituation day, rats were exposed again to the maze for 10 min, with a reward (fruit cereal) available in the central area and arms of the maze. On the third day, the training period, the rats were placed in the central area with the eight available arms. The number of visited arms was recorded, and a rat travelling with four feet into the arm was considered a visit. The visited arms were recorded during a maximal period of 10 min, or until the rat had eaten in all arms. Rats performed two 20-minute trials per day over eight consecutive days. Re-entry errors (entries to a previously visited arm), omission errors (entries to the arm, without collection of the reward), and total errors (re-entry errors plus omission errors) were evaluated.

Once the behavioral tests were accomplished, rats were sacrificed by decapitation. The brain was dissected, and blood samples were taken.

2.3. Tissue Preparation

The bilateral hippocampus and cerebral cortex were dissected. Next, tissues were gently chopped. Then, a part of the tissues was homogenized with a buffer (70 mM sucrose, 20 mM mannitol, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 0.5 % bovine serum albumin (BSA) and 10 mM 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), pH 7.4) to assay the oxidative stress biomarkers (glutathione, reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), and catalase activities). The other part was homogenized in 0.9% saline (sodium chloride) and employed for the determination of lipid-peroxidation. Homogenates were stored at -70 °C, until use. The protein content of the homogenates from the cerebral cortex and hippocampus was assayed by a modification of the Biuret procedure [26] using BSA as the standard.

2.4. Oxidative Stress Biomarkers

2.4.1. Determination of Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation was measured by thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) as described by Buege and Aust [27] with slight modifications. Next, 500 µg of protein was suspended in phosphate buffer (100 mM, pH 7.4), mixed with the reagent solution containing 0.375% thiobarbituric acid (TBA), 15% trichloroacetic acid (TCA), and 0.25 M hydrochloric acid (HCl), and incubated for 15 min in a boiling water bath. Butylated hydroxytoluene (BHT) 0.01% was added to the TBA-TCA-HCl reagent to prevent non-specific chromophore formation. After cooling, the flocculent precipitate was centrifuged at 6720 ×g for 5 min. The absorbance was measured at 532 nm in a Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS Spectrophotometer (Perkin Elmer Inc., Shelton, CT, USA) using 156 mM^{−1} cm^{−1} as the molar extinction coefficient.

2.4.2. Determination of ROS

ROS were determined using the cell-permeable fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA). We resuspended 500 µg of protein from the different tissues in 2 mL of buffer (10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, and 3 mM KH₂PO₄, pH 7.4) and incubated with 12.5 µM of H₂DCFDA for 15 min in an ice bath under constant shaking [28]. Next, basal fluorescence was recorded after 1 min, and 5 mM/5mM of glutamate/malate was added. Changes in fluorescence were recorded for 20 min at extinction 485 nm and emission 520 nm wavelengths, in a spectrofluorophotometer (Shimadzu RF-5301PC, Kyoto, Japan). Results are expressed as arbitrary units.

2.4.3. Determination of Glutathione Status

Glutathione status was determined in accordance with Akerboom and Sies [29]. The total glutathione was determined in 500 µg of protein. Samples were suspended in 0.1% Triton-X and 0.6% sulfosalicylic acid in a 0.1 M potassium phosphate buffer, plus 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.5. Next, the mix was sonicated in three cycles of sonication/ice for 20 s, followed by two freeze/thaw cycles, and centrifuged at 6500 ×g. Then, the supernatant (100 µL) was placed in potassium phosphate buffer, with 100 µM 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 0.1 units/mL glutathione reductase (GR) and incubated for 30 seconds. The reaction was started by the addition of 50 µM β-NADPH and monitored for 5 min at 412 nm in kinetic mode in a spectrophotometer UV VIS (Shimadzu RF-5301PC, Kyoto, Japan). Oxidized glutathione (GSSG) was obtained after reduced glutathione (GSH) derivatization by incubation with 0.2% 4-vinylpyridine for 1 h at room temperature, before the reaction. GSH was calculated by subtracting GSSG from the total glutathione.

2.4.4. Determination of Catalase and SOD activities

Catalase activity was assayed by measuring the conversion of H₂O₂ to oxygen using a Clark-type oxygen electrode connected to a biological oxygen monitor (5300A Biological Oxygen Monitor, YSI, Yellow Springs, OH, USA), according to Jeulin et al. [30], with slight modifications. Briefly, 500 µg of protein from homogenate tissues were resuspended in a 0.1 M potassium phosphate buffer, with 5 mM EDTA (pH 7.6), at 25 °C and monitored 1 minute. Later, fresh 6 mM of H₂O₂ was added to the chamber, and the conversion of H₂O₂ to oxygen was recorded for 2 minutes. Finally, 1.0 mM of sodium azide was added to the chamber. Catalase activity was calculated using bovine catalase as standard. Results are expressed as U × mg of protein. SOD activity was determined using a commercial kit (Sigma, 19160, St. Louis, MO, USA), following the manufacturer's instructions, and calculated using the SOD from *Escherichia coli* as standard.

2.5. Biochemical Serum Analyses

Blood glucose levels were determined using a commercial blood glucometer (Accu-chek Performa System, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), serum lipid (triglycerides, total cholesterol and high-density lipoprotein (HDL) levels were determined enzymatically using reagent kits and following the manufacturer instructions (Química Clínica Aplicada, Amposta, Spain). Serum insulin levels were measured by using a sandwich-type immunoassay (ELISA) commercial kit (80-INSRT-E01, E10, ALPCO Diagnostic, Salem, NY, USA).

2.6. Statistical Analysis

All data were analyzed using Prism (GraphPad 7.0 version, Inc., San Diego, CA, USA). Results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), and significance of differences in the mean of body weight, metabolic parameters, anxiety-like behavior, and oxidative stress biomarkers were assessed using an unpaired, a two-tailed Student's *t*-test. The Morris water maze data were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with the group as the between-subject factor and day as the within-subject factor. Tukey post hoc tests were used if the overall differences were significant ($P < 0.05$). An analysis of the effect size (*d*) was conducted if the outcome was statistically significant. Finally, the Pearson correlation coefficients were calculated between behavioral parameters and oxidative stress biomarkers was made.

3. Results

3.1. Effects of STZ on Pregnant Female Rats (F0)

A total of six female rats (dams) for group (control and GD) were required to obtain the total male offspring and female offspring for each group and age. Glucose fasting was measured two days after the STZ injection, and a significant increase in fasting glucose in GD, compared with GC female rats was observed ($t = 2.944$, $P = 0.0321$). As shown in Table 1, gestational diabetes was characterized by an increase in the postprandial blood glucose. Glucose levels in the GD group were four times greater than in the GC group and remained high throughout pregnancy ($F(1,10) = 84.12$, $P = 0.0003$). We observed as no difference in body weight between rats from the GD and GC groups.

Table 1. Glucose levels and body weight of control and diabetic dams during the pregnancy.

		GC	GD
Fasting blood glucose (mg/dL)	Pre-induction (day 9)	88.5 $\pm$ 4.1	93.17 $\pm$ 4.9
	Post-induction (day 11)	77.0 $\pm$ 2.0	246.8 $\pm$ 48.7 *
Postprandial blood glucose (mg/dL)	Day 12	76.0 $\pm$ 2.0	423.0 $\pm$ 25.8 *
	Day 16	87.0 $\pm$ 6.8	398.8 $\pm$ 46.5 *
	Day 20	88.3 $\pm$ 5.2	296.8 $\pm$ 49.8 *
Body weight (g)	Day 12	333.3 $\pm$ 13.3	338.0 $\pm$ 18.0
	Day 16	381.7 $\pm$ 2.8	378.0 $\pm$ 6.9
	Day 20	420.0 $\pm$ 8.1	404.0 $\pm$ 13.8

Note: Results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Student's *t*-test; * $p < 0.05$. GC, pregnant control rats ($n = 6$); GD, rats with gestational diabetes ($n = 6$).

3.2. Effects of GD on the Body Weight of First-Generation Offspring

We measured body weight at birth and weaning of all rats in the litter, then all rats were randomly divided into two groups: Young and adult. Male offspring of diabetic rats showed a lower body weight at birth. However, during weaning, female and male offspring of GD rats showed a reduced body weight (33% less in male and 26% less in female), compared with their respective controls. Only young male GD offspring showed a reduced body weight (15%), and the reduction remained into adulthood (Table 2).

Table 2. Offspring body weight at different ages.

Age	Body Weight (g)							
	Male Offspring		#		Female Offspring		#	
	C	GD	C	GD	C	GD	C	GD
Birth	6.82 ± 0.16	5.81 ± 0.14 **	28	34	6.35 ± 0.24	5.99 ± 0.22	20	30
Weaning (21 days)	37.3 ± 0.93	24.86 ± 1.06 **	28	34	36.41 ± 1.36	26.71 ± 1.07 **	20	30
Young (2 months)	295.2 ± 10.85	261.5 ± 14.26 **	10	10	204.0 ± 3.84	196.0 ± 4.11	10	10
Adult (6 months)	514.4 ± 14.59	436.8 ± 20.8 **	12	12	281.4 ± 16.14	282.5 ± 5.60	10	10

Note: Data are expressed as the mean ± SEM. Student's t-test; * $p < 0.05$; * $d > 1.0$. C: control offspring, GD: gestational diabetes offspring.

3.3. Effects of GD on the Anxiety-Like Behavior of First-Generation Offspring

To determine the effect of GD on the anxiety of the offspring, the performance of rats in the plus maze and open field were evaluated. In the plus maze, the time that rats spent in the closed arms is considered an anxiety index. Male and female GD offspring spent a similar amount of time in the closed arm, compared with their respective control group when young (Figure 1a, b). Both GD male and female adult rats showed a decrease in the time spent in the closed arms ($t = 2.42$, $P = 0.0193$, $d = 0.992$, and $t = 2.53$, $P = 0.0199$, $d = 1.083$, respectively), suggesting that GD male and female offspring rats experienced a reduced level of anxiety in adulthood compared with the normoglycemic offspring. In the open field, the time spent in the center (open area) is considered an anxiety level index (rats spending more time in this open area are considered less anxious). As shown in Figure 1c,d, young and adult male GD offspring rats spent twice as much time in the center of the open field as the control offspring, whereas the GD offspring female rats spend an 80% more time in the center of the open field only in adulthood. In agreement with the plus maze performance, these results strongly indicate a reduced anxiety level in adult GD offspring, regardless the sex, whereas when young, only GD male offspring showed reduced anxiety levels in the open field test.

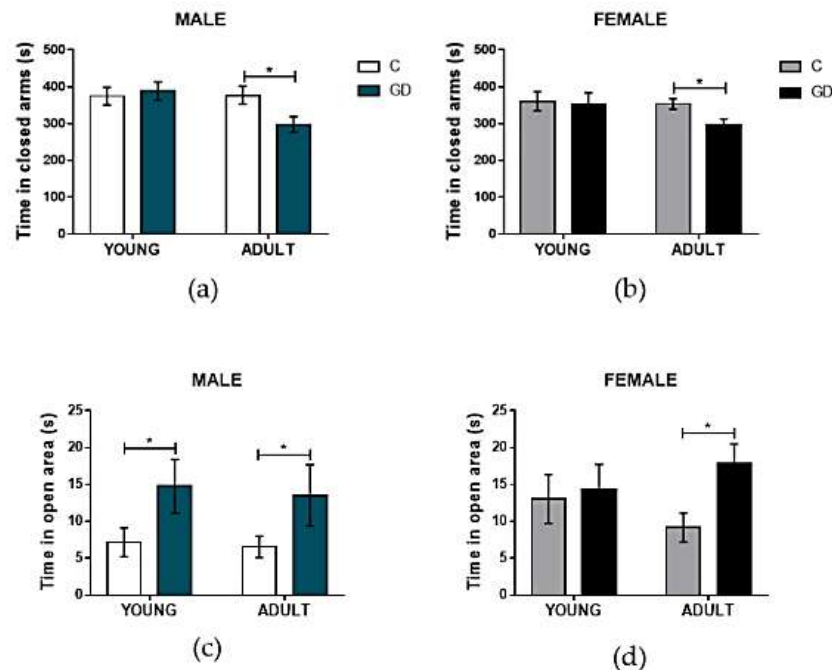


Figure 1. Effect of gestational diabetes (GD) on anxiety-like offspring behavior. Time spent in closed arms of the elevated plus maze for the (a) male and (b) female offspring rats. Time spent in the open area of the open field for the (c) male and (d) female offspring rats. C, control offspring; GD, gestational diabetes offspring. Control male offspring: young, $n = 10$; adult, $n = 12$; GD male offspring: young, $n = 10$; adult, $n = 12$. Control female offspring: young, $n = 10$; adult, $n = 10$; GD female offspring: young, $n = 10$; adult, $n = 10$. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM; Student's t -test; * $p < 0.05$.

3.4. Effects of GD on the Spatial Learning of First-Generation Offspring

To determine if GD disrupts spatial learning, the performance of young and adult (male and female) offspring of GD rats was assessed using the Morris water maze test for eight days. No statistical differences were found in terms of the swimming distances of male rats of any age during the training days compared with the control group ($F(1,9) = 1.07$, $P = 0.32$ and $F(1,11) = 0.41$, $P = 0.53$ for the young and adult age groups, respectively). In the probe trial (ninth day), rats from both groups (GD and C groups) spent more time at the platform position (target) instead of the other maze quadrants, and the performance of the groups was similar, as shown in Figure 2a–d. The young female offspring of GD rats showed longer swimming distances during the training days (group effect, $F(1,9) = 6.71$, $P = 0.029$, $d = 3.207$), and paired comparisons showed significantly longer distances at days 7 and 8 for the GD compared with the female C group ($t = 2.362$, $P = 0.029$, $d = 1.056$ and $t = 2.216$, $P = 0.039$, $d = 0.991$, respectively). Accordingly, with deficient learning, in the probe trial (ninth day), GD female rats spent the same amount of time in all zones of the maze, whereas the rats from the C group searched the platform for the target quadrant, as shown in Figure 2e,f. These changes were not observed in adulthood, as shown in Figure 2g,h.

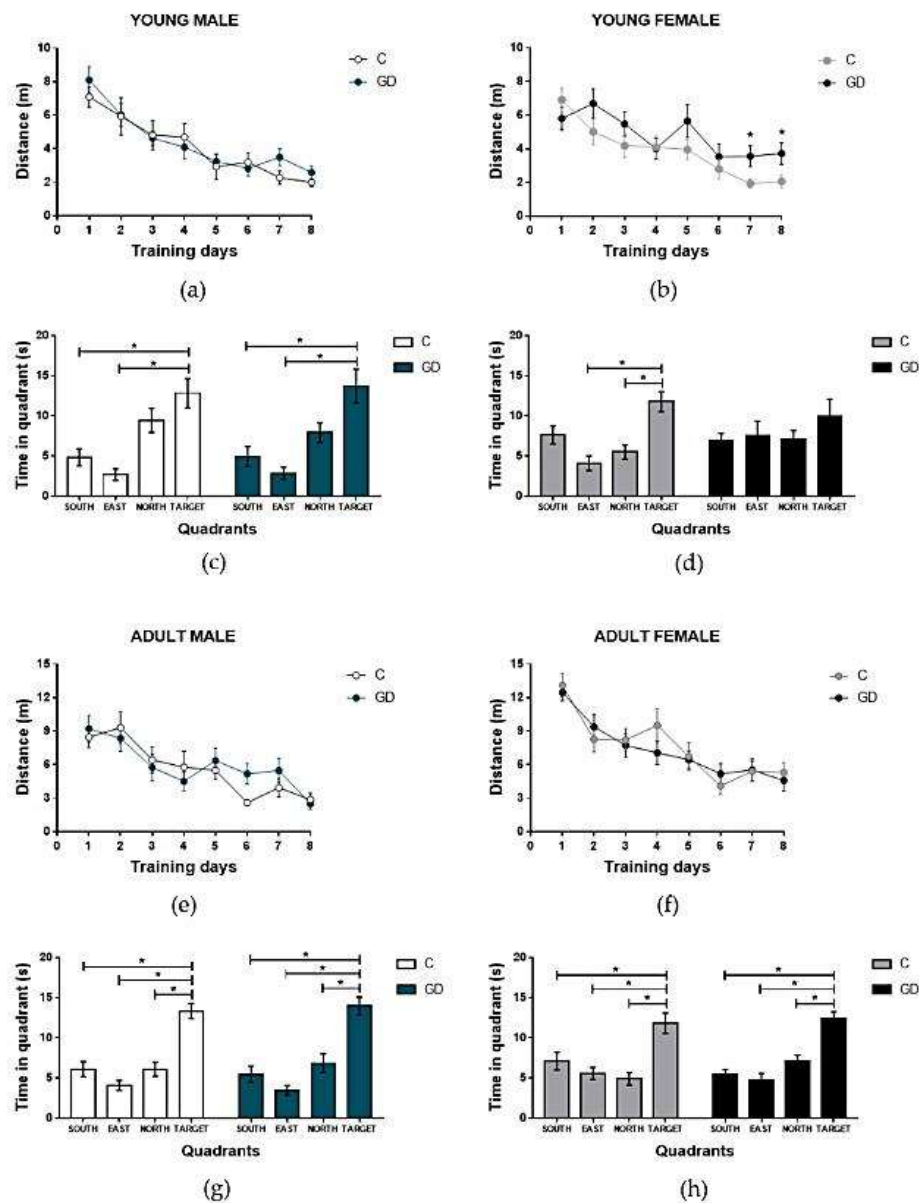


Figure 2. Effect of GD on the spatial learning of offspring, showing the distance traveled (m) during the training days and the probe trial and the time spent at each quadrant. The young male and female offspring distance (a, b) and time in each quadrant of young male and female offspring (c, d). The adult male and female offspring distance (e, f) and time in each quadrant of adult male and female offspring (g, h). C, control offspring; GD, gestational diabetes offspring. Control male offspring: young $n = 10$; adult $n = 12$, GD male offspring: young $n = 10$; adult $n = 12$. Control female offspring: young, $n = 10$; adult, $n = 10$; GD female offspring: young: $n = 10$; adult, $n = 10$. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA of repeated measures and one-way ANOVA; post hoc Tukey's test; * $p < 0.05$.

3.5. Effects of GD on the Working Memory of First-Generation Offspring

Next, to evaluate the effect of GD on the spatial working memory of offspring, we used an eight-arm, eight-day radial maze test (Figure 3). Young male and female GD offspring did not show statistical differences in the number of total and re-entry errors, compared with the control group ($F(1,9) = 1.72$, $P = 0.22$ and $F(1,9) = 0.26$, $P = 0.61$). They efficiently performed the task, making fewer

errors during the training days (total and re-entry errors). We found a significant difference between adult male offspring of GD rats and the control group in the number of re-entry errors ($F(7,77) = 2.61$, $P = 0.017$, $d = 1.695$), and a paired test revealed that a higher number of re-entry errors were committed by GD group rats on days 7 and 8 ($t = 2.88$, $P = 0.0086$, $d = 1.177$ and $t = 3.11$, $P = 0.0057$, $d = 1.695$, respectively). These results show a short-term memory deficiency.

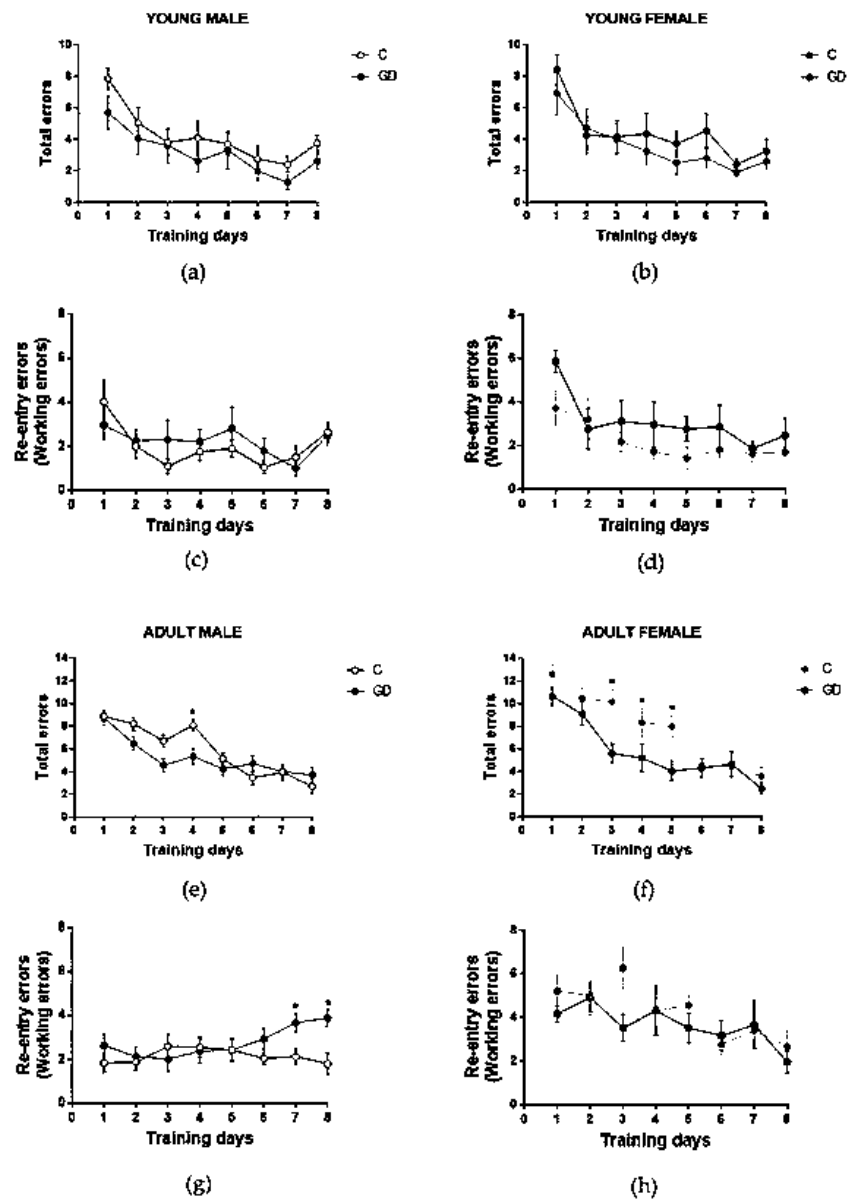


Figure 3. Effect of GD on the short-term memory of offspring, showing the total and reentry errors during the training days. The young male and female offspring total errors (a, b) and reentry errors (c, d) respectively. The adult male and female offspring total errors (e, f) and reentry errors (g, h) respectively. C, control offspring; GD, gestational diabetes offspring. Control male offspring: young, $n = 10$; adult, $n = 12$. GD male offspring: young, $n = 10$; adult, $n = 12$. Control female offspring: young, $n = 10$; adult, $n = 10$. GD female offspring: young, $n = 10$; adult, $n = 10$. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA of repeated measures and one-way ANOVA; post hoc Tukey's test; * $p < 0.05$.

Female GD offspring showed a significant decrease in the number of total errors in adulthood from days 3 to day 5 ($F(7,63) = 2.15$, $P = 0.050$) due to the reduction of the number of omissions, since the number of re-entry errors did not show significant differences compared with the control, and they efficiently performed the task during the training days.

3.6. Effects of GD on Oxidative Stress Biomarkers and ROS Production in Hippocampus and Cortex of First-Generation Offspring

To determine the effect of GD in oxidative stress on the cerebral cortex and hippocampus from both male and female offspring in young and adult rats, we first evaluated ROS production measured by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate probe. We found a significant increase in ROS production in male and female GD offspring, as shown in Table 3. In young male GD offspring, we found a ~31% increase in ROS production in the cerebral cortex compared with their respective control ($t = 2.61$, $P = 0.0009$, $d = 1.26$), with a ~66% increase in the hippocampus ($t = 3.85$, $P = 0.0009$, $d = 1.64$). Next, in the cerebral cortex of adult male GD offspring, a ~36% increase in ROS production was observed ($t = 2.69$, $P = 0.017$, $d = 1.34$). We also found a ~40% increase in the hippocampus of adult male GD offspring ($t = 3.8$, $P = 0.0013$, $d = 1.70$). Female GD offspring exhibited similar results in both the cerebral cortex (~22%, $t = 2.45$, $P = 0.028$, $d = 1.27$; ~41%, $t = 2.87$, $P = 0.011$, $d = 1.39$ young and adult rats, respectively) and the hippocampus (~36% $t = 2.79$, $P = 0.015$, $d = 1.44$; ~42% $t = 3.50$, $P = 0.047$, $d = 1.75$ young and adult rats, respectively). We also evaluated lipid-peroxidation using thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in both the cerebral cortex and hippocampus in male and female GD offspring, and we found a significant increase in lipid-peroxidation as shown in Table 3.

Table 3. Oxidative stress biomarkers. Effect of gestational diabetes in oxidative stress biomarkers of cerebral cortex and hippocampus of young and adult, male and female offspring.

Cerebral Cortex	Male Offspring				Female Offspring			
	C-Young n = 6	GD-Young n = 6	C-Adult n = 6	GD-Adult n = 6	C-Young n = 5	GD-Young n = 5	C-Adult n = 5	GD-Adult n = 5
GSHt (μmoles/mg protein)	0.39 ± 0.04	0.22 ± 0.04 **	0.36 ± 0.04	0.42 ± 0.01	0.38 ± 0.1	0.32 ± 0.02	0.69 ± 0.03	0.49 ± 0.04 **
GSSG (μmoles/mg protein)	0.01 ± 0.001	0.13 ± 0.02 **	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.016	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.26 ± 0.04 **
GSH (μmoles/mg protein)	0.37 ± 0.04	0.11 ± 0.03 **	0.25 ± 0.05	0.27 ± 0.005	0.21 ± 0.02	0.13 ± 0.04	0.61 ± 0.03	0.23 ± 0.07 **
GSH/GSSG ratio	14.02 ± 2.16	1.14 ± 0.33 **	2.66 ± 0.08	1.75 ± 0.18	1.36 ± 0.35	0.84 ± 0.37	8.44 ± 1.73	0.97 ± 0.35 **
ROS (arbitrary units/mg protein)	27.29 ± 2.56	36.1 ± 2.53 **	21.85 ± 2.15	29.74 ± 1.98 **	28.52 ± 0.97	34.81 ± 2.23 **	28.27 ± 3.01	41.19 ± 3.33 **
Lipid peroxidation (nmoles TBARS/mg protein)	330.0 ± 13.21	412.9 ± 29.1 **	241.1 ± 15.82	329.0 ± 33.18 **	328.2 ± 10.14	433.7 ± 18.68 **	309.7 ± 27.23	332.3 ± 17.91 **
Catalase activity (U/mg protein)	1.58 ± 0.17	0.87 ± 0.05 *	1.24 ± 0.08	0.79 ± 0.11 *	2.00 ± 0.17	1.03 ± 0.12 **	1.88 ± 0.19	1.05 ± 0.100 **
SOD activity (U/mg protein)	2.56 ± 0.15	2.97 ± 0.017	1.59 ± 0.166	1.90 ± 0.13	12.76 ± 0.82	8.18 ± 0.44 **	7.95 ± 0.38	2.57 ± 0.085 **
Hippocampus	C-Young n = 6	GD-Young n = 6	C-Adult n = 6	GD-Adult n = 6	C-Young n = 5	GD-Young n = 5	C-Adult n = 5	GD-Adult n = 5
	C-Young n = 6	GD-Young n = 6	C-Adult n = 6	GD-Adult n = 6	C-Young n = 5	GD-Young n = 5	C-Adult n = 5	GD-Adult n = 5
GSHt (μmoles/mg protein)	0.21 ± 0.02	0.41 ± 0.02 **	0.28 ± 0.03	0.38 ± 0.06	0.42 ± 0.00	0.18 ± 0.03	0.68 ± 0.0	0.47 ± 0.02
GSSG (μmoles/mg protein)	0.07 ± 0.004	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.053 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.081 ± 0.0	0.05 ± 0.0
GSH (μmoles/mg protein)	0.14 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.21 ± 0.04	0.36 ± 0.01	0.12 ± 0.04 **	0.60 ± 0.01	0.41 ± 0.01 **
GSH/GSSG ratio	2.10 ± 0.55	2.33 ± 0.67	0.92 ± 0.24	1.22 ± 0.33	7.01 ± 0.8	2.05 ± 0.95 **	8.17 ± 1.84	8.60 ± 1.6
ROS (arbitrary units/mg protein)	17.93 ± 1.24	29.9 ± 2.61 **	17.03 ± 1.71	24.03 ± 0.84 **	17.97 ± 2.18	24.46 ± 1.03 *	17.8 ± 2.90	25.44 ± 1.95 **
Lipid peroxidation (nmoles TBARS/mg protein)	348.6 ± 18.15	403.0 ± 11.85 **	197.7 ± 15.97	320.7 ± 33.01 **	276.5 ± 18.8	393.6 ± 35.93 **	288.2 ± 17.75	420.3 ± 45.84 **
Catalase activity (U/mg protein)	1.15 ± 0.17	0.74 ± 0.08	1.41 ± 0.09	0.80 ± 0.04 **	1.45 ± 0.16	0.81 ± 0.14 **	1.33 ± 0.09	0.66 ± 0.09 **
SOD activity (U/mg protein)	7.02 ± 0.23	6.95 ± 0.20	5.43 ± 0.21	4.87 ± 0.02	12.76 ± 0.62	8.12 ± 0.44 **	7.72 ± 0.56	3.27 ± 0.04 **

Note: C, control offspring; GD, gestational diabetes offspring (n = 5–6). GSHt, total glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GSH, reduced glutathione; ROS, reactive oxygen species; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances; SOD, superoxide dismutase. Data are expressed as mean ± SEM. Student's t-test; * $P < 0.05$, * $d > 1$.

3.7. Effects of GD on the Antioxidant Enzymes Activities in First-Generation Offspring

Next, we evaluated catalase and SOD activities in the hippocampus and cerebral cortex of male and female rats of both ages. A significant decrease in the cerebral cortex catalase activity of young and adult male GD offspring rats was found (~43% and ~35%, respectively; Table 3). In the hippocampus, a decrease in catalase activity (~42% less) was observed only in adult male offspring compared with the control group (Table 3). The cerebral cortex and hippocampus of the female offspring of GD rats showed a decrease in catalase activity at young and adult ages (~48% and ~44% less in the cerebral cortex and ~44% and 50% reduced in the hippocampus, respectively) compared with their respective control (Table 3).

We evaluated SOD activity, and an activity decrease at both ages and in both structures was observed only in the female offspring of rats with gestational diabetes. No changes in the male offspring were observed (Table 3).

3.8. Effects of GD on the Glutathione Status of First-Generation Offspring

The glutathione status in the cortex and hippocampus was evaluated (Table 3). A reduced level of total glutathione in the cerebral cortex, the highest level of oxidized glutathione, and a decrease in reduced glutathione levels were found in young GD male offspring as well as a low GSH/GSSG ratio. The cerebral cortex of adult male offspring did not show statistical differences. In the hippocampus, an increase in total glutathione (~90%) was observed in the juvenile offspring of rats with gestational diabetes, without changes in the oxidized glutathione, reduced glutathione levels and GSH/GSSG ratio. No significant changes in the glutathione status were found in the cerebral cortex of young GD female offspring. However, in the hippocampus of young GD female offspring, we found a decrease in reduced glutathione and a minor GSH/GSSG ratio. Adult GD female offspring exhibit a decrease in total glutathione levels with an increase in oxidized glutathione and a decrease in reduced glutathione levels in the cerebral cortex as well as the lowest GSH/GSSG ratio. Finally, a decrease in reduced glutathione in the hippocampus of adult GD offspring was found.

3.9. Effects of GD on the Biochemical Serum Parameters of First-Generation Offspring

To determine the impact of gestational diabetes on metabolic parameters, the glucose, insulin, cholesterol, and triglycerides in the serum of young and adult male and female offspring were measured (Table 4). No statistical differences were observed in the glucose and total cholesterol of male or female, and young or adult GD offspring. The triglycerides level was higher in young and adult male GD offspring ($t = 2.243$, $P = 0.041$, $d = 1.13$, and $t = 2.341$, $P = 0.037$, $d = 1.25$, respectively), whereas the female GD offspring showed a higher level in this parameter only in adulthood ($t = 2.256$, $P = 0.0319$, $d = 1.366$). The HDL-cholesterol level was low in young and adult male GD offspring ($t = 3.48$, $P = 0.003$, $d = 1.64$, and $t = 23.87$, $P = 0.001$, respectively), and the insulin serum level was low in young male GD offspring ($t = 2.33$, $P = 0.025$, $d = 1.88$). This change did not remain into adulthood. Similar to young GD offspring, we observed a low level of HDL-cholesterol in young and adult female offspring ($t = 4.83$, $P = 0.0002$, $d = 2.34$, and $t = 4.40$, $P = 0.0006$, $d = 2.20$, respectively) and a higher insulin level at both ages ($t = 2.37$, $P = 0.032$, $d = 1.18$, and $t = 2.47$, $P = 0.023$, $d = 1.107$, respectively).

Table 4. Metabolic parameters of offspring.

Male Offspring				
	C-Young <i>n</i> = 8	GD-Young <i>n</i> = 8	C-Adult <i>n</i> = 7	GD-Adult <i>n</i> = 7
Glucose (mg/dL)	90.27 ± 2.07	85.4 ± 3.03	91.92 ± 1.63	91.35 ± 3.31
Insulin (ng/mL)	0.42 ± 0.027	0.33 ± 0.015 *	0.44 ± 0.023	0.42 ± 0.029
Cholesterol (mg/dL)	71.84 ± 1.92	75.89 ± 2.71	73.43 ± 2.18	68.2 ± 1.98
Triglycerides (mg/dL)	33.3 ± 2.84	43.46 ± 3.31 *	40.24 ± 2.55	53.94 ± 5.26 *
HDL-cholesterol (mg/dL)	52.72 ± 1.95	40.1 ± 3.05 *	50.63 ± 3.04	38.1 ± 1.43 *
Female Offspring				
	C-Young <i>n</i> = 7	GD-Young <i>n</i> = 10	C-Adult <i>n</i> = 9	GD-Adult <i>n</i> = 7
Glucose (mg/dL)	82.22 ± 3.28	82.69 ± 2.49	86.44 ± 2.23	87.63 ± 2.01
Insulin (ng/mL)	0.32 ± 0.002	0.36 ± 0.014 *	0.32 ± 0.004	0.48 ± 0.064 *
Cholesterol (mg/dL)	85.63 ± 1.61	85.44 ± 1.72	74.29 ± 2.28	80.61 ± 4.8
Triglycerides (mg/dL)	37.96 ± 1.87	43.04 ± 2.46	37.74 ± 6.46	54.25 ± 2.89 *
HDL-cholesterol (mg/dL)	62.46 ± 1.60	49.06 ± 2.18 *	51.38 ± 3.04	34.73 ± 2.24 *

Note: Data are expressed as the mean ± SEM. Student's *t*-test; * *p* < 0.05.

3.10. Correlation Between Behavior Parameters and Oxidative Stress

Finally, we calculated the Pearson correlation coefficients between the parameters of the behavioral tests and oxidative stress biomarkers. Only correlations that were significant at *P* < 0.05 were considered, as shown in Table 5. In anxiety behavior, we found a significant correlation between the time in closed arms and SOD activity in hippocampus and cerebral cortex in young male and adult female rats, indicating that the more time spent in the closed arms of the elevated plus maze, the greater the SOD activity. In adult females, a significant correlation of this behavior with the enzyme catalase was also found. We compared the open field behavior and we found a correlation between time in the open area and the production of ROS in the hippocampus of young male rats, suggesting an increase in the production of ROS in the hippocampus promotes reduced anxiety-like behavior. In adult females' rats, we found a significant inverse correlation between the time spent in the open area and the SOD and catalase activities in the cerebral cortex. Therefore, reduced anxiety-like behavior is correlated with lower activity of these enzymes in the cerebral cortex. In the Morris water maze studies, we found a correlation between the average distance traveled during the eight training days and ROS production in cerebral cortex of young males, indicating a relationship between the increase in ROS and the distance traveled to find the platform. In young female rats, we found a significant inverse correlation of the distance traveled with reduced SOD activity in both the hippocampus and cerebral cortex. This finding indicates a potential relationship between oxidative stress and behavior abnormalities in offspring of GD rats. We did not find a correlation between the number of re-entry errors with respect to oxidative stress biomarkers (data not shown).

Table 5. Pearson correlation between behavior parameters and oxidative stress biomarkers.

	Male Offspring						Female offspring					
	Young			Adult			Young			Adult		
Cerebral cortex	ROS	SOD	CAT	ROS	SOD	CAT	ROS	SOD	CAT	ROS	SOD	CAT
Time in closed arms (Elevated plus maze)	-	$r = 0.709$ $P = 0.009$	-	$r = -0.660$ $P = 0.019$	-	-	-	-	-	-	$r = 0.614$ $P = 0.033$	-
Time in open area (Open field)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$r = -0.651$ $P = 0.021$	$r = -0.793$ $P = 0.002$
Distance traveled (Morris water maze)	$r = 0.746$ $P = 0.005$	-	-	-	-	-	$r = 0.587$ $P = 0.048$	-	-	-	-	-
Hippocampus	ROS	SOD	CAT	ROS	SOD	CAT	ROS	SOD	CAT	ROS	SOD	CAT
Time in closed arms (Elevated plus maze)	-	$r = 0.815$ $P = 0.001$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$r = 0.741$ $P = 0.005$
Time in open area (Open field)	$r = 0.601$ $P = 0.038$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Distance traveled (Morris water maze)	-	-	-	-	-	-	$r = -0.577$ $P = 0.049$	-	-	-	-	-

Note: Pearson correlation coefficient (r) between parameters of the behavioral tests and oxidative stress biomarkers; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; young male, n = 6; adult male, n = 6; young female, n = 5; adult female n = 5.

4. Discussion

In this study, we examined the effects of gestational diabetes on oxidative stress and their relationship with behavioral impairment linked to the hippocampus and cerebral cortex function in young and adult rat offspring. Adverse environment exposure during embryonic and early postnatal development may lead to a risk of developing metabolic disease in later life [7,31–33].

Gestational diabetes modifies the offspring's body weight at birth in a maternal glucose-dependent manner. Our results only indicated a lower body weight at birth (microsomia) in male offspring of GD rats, and this change remained during the weaning, juvenile, and adult stages. This weight reduction at birth could be due to the high blood glucose concentration in the intrauterine milieu during gestational diabetes, since it was reported to induce pancreatic hypertrophy due to the over-stimulation of pancreatic β cells, preventing the secretion of insulin and decreasing anabolism and, subsequently, neonatal microsomia [3,34–36], this results are according with [37]. The female offspring of GD showed a lower body weight only during weaning, without changes at birth or juvenile and adult stages. These results suggest that the male offspring of GD rats are more susceptible to disturbances in body weight, when they are exposed to a high maternal blood glucose level during the middle stage of pregnancy. In this regard, sexual differences in the offspring body weight have been reported in relation to maternal obesity and a maternal high-fat diet model [38,39], where it was shown that the body weight of female offspring did not change.

Our most striking findings are the cognitive changes in the offspring exposed to gestational diabetes. Several studies have reported disturbances in the anxiety-like behavior of gestational diabetes offspring. Ramanathan et al. [40] showed that maternal diabetes offspring displayed hyperactivity in the open field test and anxiety in the elevated plus maze at two months of age (young rats). We found a lower level of anxiety-like behavior in the male offspring of GD rats at the juvenile age, which remained into adulthood, whereas in adult female offspring, similar to adult male offspring, a low level of anxiety-like behavior was observed. These results agree with those reported by Chandna et al. [41], who observed the same behavior in the male offspring of rats with gestational diabetes at the postnatal day 58 (young). The discrepancy between our results and those of Ramanathan et al. [40] could be due to differences in the gestational diabetes model and STZ dose. Ramanathan et al. used a dose of 50 mg/kg of body weight and employed a pregestational model. In our experiments, as well as in Chandna et al.'s model [41], a low dose of STZ in the middle stage of pregnancy (38 mg/kg body weight) was used. These observations indicate that the behavioral abnormalities in the offspring of diabetic rats are dependent on the level of intrauterine hyperglycemia, as well the time of exposure.

Currently, few studies have assessed the effect of gestational diabetes on cognitive performance. In this study, we evaluated spatial learning and short-term memory. We obtained findings of age- and sex-dependency. Whereas the male offspring of gestational diabetic rats at young and adult ages did not show disruptions in spatial learning, the female progeny showed an impairment of cognitive performance at the juvenile age. These results are in accordance with those reported by Kinney et al. [42], who found learning deficits, determined through the use of the Lashley III maze, only in female offspring at 60 days of age. In our work, female offspring traveled a greater distance to reach the escape platform during the training days in the Morris water maze. However, this deficit did not remain into adulthood. Estrogens have been reported to exert protective effects on neuronal cells and may contribute to the normal process of memory consolidation. Thus, the deficit reversion observed in adult female rats could be due to the effect of estrogens [43,44]. In addition, disturbances in spatial learning and deficiencies in working memory (a cortex-dependent task) have been described in metabolic disorders, such as type I and II diabetes mellitus, as well as in over-nourished offspring [45] and during the early post-natal stage of offspring of gestational diabetes rats [46], which was linked to a modification of the neurotransmitter levels and cell death. Our results show that the adult female offspring of diabetic rats showed minor total errors at days 3–5 of training, compared with control rats, which was due to a reduced number of error omissions committed by the diabetic offspring rats, which is possibly related to the lower anxiety level presented in this group. However, their re-entry errors

were similar to those of the control group, implying that no differences in working memory existed in diabetic female offspring rats of any age. In male offspring, we observed a deficit in working memory only at the adult age, at which the rats committed a higher number of re-entry errors. This result differs from that reported by Kim et al. [46] (short-term memory impairment), which could be due to their use of a different task. They realized an avoidance task, in which a possible alteration to the amygdala could strongly influence the performance. They showed an increase in hippocampal apoptosis, a brain area related to long-term memory or spatial information. Conversely, we used the radial maze, which is a task that implies hippocampal–prefrontal cortex communication dependence.

Optimal brain function is dependent on cellular redox homeostasis, and neurodegenerative diseases, cognitive decline, and cerebral dysfunction are closely related to oxidative stress. At the embryonic stage, under hyperglycemia, a link with oxidative stress has been reported in the intrauterine milieu, and ROS reduction contributes to the decrease in oxidative damage to developing embryos in rats with gestational diabetes [19,47]. For the first time, the influence of gestational diabetes on oxidative stress in specific brain areas, the cerebral cortex and hippocampus, was examined. We found a significant increase in reactive ROS using H2DCFDA. To corroborate if this increase in oxidants was related with oxidative damage in lipids, we also evaluated lipid peroxidation and we found a consistent increase. The brain is highly susceptible to lipid peroxidation due a high polyunsaturated lipids content, high oxygen consumption, and a relatively poor antioxidant defense [21]. 4-Hydroxynonenal (4-HNE) and malondialdehyde (MDA) are two highly reactive aldehydes, by-products of lipid peroxidation implicated in the pathogenesis of a variety of neuropsychiatric disorders, for example, Alzheimer's disease, depression, Parkinson's disease, and schizophrenia [48]. The oxidation of polyunsaturated lipids in the cell membrane leads to significant changes in cell integrity and in membrane permeability, affecting various transmembrane processes, such as receptors activation, formation of intracellular second messenger and Ca^{2+} homeostasis, and impairment of glutamate transport and mitochondrial function in synapses [49].

These results suggest that the cerebral cortex and hippocampus are susceptible to oxidative damage and are therefore liable to present an altered function. The antioxidant system was disturbed in male and female GD offspring in the cerebral cortex and hippocampus at the juvenile age, which remained into adulthood. Oxidative stress resulting from a hyperglycemic intrauterine milieu increased the oxidative damage and alteration in the antioxidant defense during fetal [18] and neonatal [17] stages in the peripheric organs (the liver, kidney, and pancreas). Our results showed for the first time that these changes during the fetal stage remain into adulthood and specifically in the cerebral cortex and hippocampus. The increases in ROS, SOD, and catalase activities are correlated with behavior abnormalities in the offspring of GD dams. Oxidative stress could modify the normal brain development of GD offspring and lead to cognitive deficiency. We think that a more complex relationship exists between oxidative stress and cognitive function due to the reactive oxygen/nitrogen species, which act as signals in the regulation of many processes in neuronal development and brain function [19].

According to many studies that support the link between exposure to an adverse intrauterine milieu, including hyperglycemia, and a subsequent risk of developing metabolic diseases [3,9,50–52], our results show a metabolic disruption in male and female GD offspring. The male progeny only showed modifications in lipid metabolism in adulthood, whereas in female offspring, we observed an increase in the insulin level, indicative of insulin resistance, and a lipid metabolism alteration at both ages, indicating a sex-dependent metabolic disruption. Hence, GD, during the middle stage of gestation with a moderate glucose level in the intrauterine milieu, is enough to permanently modify the health of young rats.

In summary, these results suggest that gestational diabetes modifies oxidative stress and cognitive behavior in an age- and sex-dependent manner. However, the relationship between oxidative stress and cognitive performance is complex. Therefore, the evaluation of other possible mediators, such as the impact of oxidative stress and the inflammatory response to neuronal function and

12. Cai, S.; Qiu, A.; Broekman, B.F.; Wong, E.Q.; Gluckman, P.D.; Godfrey, K.M.; Saw, M.S.; Soh, S.E.; Kwek, K.; Chong, K.; et al. The influence of gestational diabetes on neurodevelopment of children in the first two years of life: A prospective study. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162113. [\[CrossRef\]](#)
13. Ornoy, A.; Ratzon, N.; Greenbaum, C.; Wolf, A.; Dulitzky, M. School-age children born to diabetic mothers and to mothers with gestational diabetes exhibit a high rate of inattention and fine and gross motor impairment. *J. Pediatric Endocrinol. Metab.* **2001**, *14*, 681–690. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Jing, Y.H.; Song, Y.F.; Yao, Y.M.; Yin, J.; Wang, D.G.; Gao, L.P. Retardation of fetal dendritic development induced by gestational hyperglycemia is associated with brain insulin/IGF-I signals. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2014**, *37*, 15–20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Wrigley, S.; Arafa, D.; Tropea, D. Insulin-like growth factor 1: At the crossroads of brain development and aging. *Front Cell Neurosci.* **2017**, *11*, 14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Golalipour, M.J.; Kafshgiri, S.K.; Ghafari, S. Gestational diabetes induced neuronal loss in CA1 and CA3 subfields of rat hippocampus in early postnatal life. *Folia Morphol.* **2012**, *71*, 71–77.
17. Raza, H.; John, A. Glutathione metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissues from streptozotocin-induced diabetic mothers. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2004**, *20*, 72–78. [\[CrossRef\]](#)
18. Kamel, M.A.; Helmy, M.H.; Hanafi, M.Y.; Mahmoud, S.A.; Elfetoh, H.A. Effect of maternal diabetes on pre-and post-natal redox status of F1 rat offspring. *Open J. Endocr. Metab. Dis.* **2014**, *4*, 111. [\[CrossRef\]](#)
19. Wang, X.; Michaelis, E.K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci.* **2010**, *2*, 12. [\[CrossRef\]](#)
20. Liu, Z.; Zhou, T.; Ziegler, A.C.; Dimitrion, P.; Zuo, L. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: From molecular mechanisms to clinical applications. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
21. Rego, A.C.; Oliveira, C.R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: Implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* **2003**, *28*, 1563–1574. [\[CrossRef\]](#)
22. Alvarez, E.O.; Beauquis, J.; Revsin, Y.; Banzan, A.M.; Roig, P.; De Nicola, A.F.; Saravia, F. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. *Behav. Brain. Res.* **2009**, *198*, 224–230. [\[CrossRef\]](#)
23. Suge, R.; Shimazu, T.; Hasegawa, H.; Inoue, I.; Hayashibe, H.; Nagasaka, H.; Watanabe, S.I. Cerebral antioxidant enzyme increase associated with learning deficit in type 2 diabetes rats. *Brain Res.* **2012**, *1481*, 97–106. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Rebolledo-Solleiro, D.; Roldán-Roldán, G.; Díaz, D.; Velasco, M.; Larqué, C.; Rico-Rosillo, G.; Vega-Robledo, G.; Zambrano, E.; Hiriart, M.; Pérez de la Mora, M. Increased anxiety-like behavior is associated with the metabolic syndrome in non-stressed rats. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0176554. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Zemdeg, J.; Quesseveur, G.; Jarriault, D.; Pénicaud, L.; Fioramonti, X.; Guirard, B.P. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. *British J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 2095–2110. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Gornall, A.G.; Bardawill, C.J.; David, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 751–766. [\[PubMed\]](#)
27. Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **1978**, *52*, 302–310. [\[PubMed\]](#)
28. Ortiz-Avila, O.; Sámano-García, C.A.; Calderón-Cortés, E.; Pérez-Hernández, I.H.; Mejía-Zepeda, R.; Rodríguez-Orozco, A.R.; Saavedra-Molina, A.; Cortés-Rojas, C. Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *J. Bioenerg. Biomemb.* **2013**, *45*, 271–287. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Akerboom, T.P.; Sies, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* **1981**, *77*, 373–382.
30. Jeulin, C.; Soufir, J.C.; Weber, P.; Laval-Martin, D.; Calvayrac, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete. Res.* **1989**, *24*, 185–196. [\[CrossRef\]](#)
31. Smith, N.H.; Ozanne, S.E. Intrauterine origins of metabolic disease. *Rev. Gynecol. Peri. Pract.* **2006**, *6*, 211–217. [\[CrossRef\]](#)
32. Vickers, M. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients* **2014**, *6*, 2165–2178. [\[CrossRef\]](#)
33. Han, J.; Xu, J.; Long, Y.S.; Epstein, P.N.; Liu, Y.Q. Rat maternal diabetes impairs pancreatic β -cell function in the offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *293*, E228–E236. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

34. Aerts, L.; Holemans, K.; Van Assche, F.A. Maternal diabetes during pregnancy: Consequences for the offspring. *Diabetes Metab. Rev.* **1990**, *6*, 147–167. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. López-Soldado, I.; Herrera, E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *J. Diabetes Res.* **2003**, *4*, 107–118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Fetita, L.S.; Sobngwi, E.; Serradas, P.; Calvo, F.; Gautier, J.F. Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 3718–3724. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Piazza, F.V.; Segabinazi, E.; de Meireles, A.L.F.; Mega, F.; de Figueiredo Spindler, C.; Augustin, O.A.; Salvaggio, G.D.S.; Achaval, M.; Kruse, M.S.; Coirini, H.; et al. Severe Uncontrolled Maternal Hyperglycemia Induces Microsomia and Neurodevelopment Delay Accompanied by Apoptosis, Cellular Survival, and Neuroinflammatory Deregulation in Rat Offspring Hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2019**, *39*, 401–414. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Panchenko, P.E.; Lacroix, M.C.; Jouin, M.; Voisin, S.; Badonnel, K.; Lemaire, M.; Durieux, D. Effect of Maternal Obesity and Preconceptional Weight Loss on Male and Female Offspring Metabolism and Olfactory Performance in Mice. *Nutrients* **2019**, *11*, 948. [\[CrossRef\]](#)
39. Wankhade, U.D.; Zhong, Y.; Kang, P.; Alfaro, M.; Chintapalli, S.V.; Piccolo, B.D.; Shankar, K. Maternal high-fat diet programs offspring liver steatosis in a sexually dimorphic manner in association with changes in gut microbial ecology in mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16502. [\[CrossRef\]](#)
40. Ramanathan, M.; Jaiswal, A.K.; Bhattacharya, S.K. Hyperglycaemia in pregnancy: Effects on the offspring behavior with special reference to anxiety paradigms. *Indian J. Exp. Biol.* **2000**, *38*, 231–236.
41. Chandna, A.R.; Kuhlmann, N.; Bryce, C.A.; Greba, Q.; Campanucci, V.A.; Howland, J.G. Chronic maternal hyperglycemia induced during mid-pregnancy in rats increases RAGE expression, augments hippocampal excitability, and alters behavior of the offspring. *Neuroscience* **2015**, *303*, 241–260. [\[CrossRef\]](#)
42. Kinney, B.A.; Rabe, M.B.; Jensen, R.A.; Steger, R.W. Maternal hyperglycemia leads to gender-dependent deficits in learning and memory in offspring. *Exp. Biol. Med.* **2003**, *228*, 152–159. [\[CrossRef\]](#)
43. McEwen, B.S.; Alves, S.E. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr. Rev.* **1999**, *20*, 279–307. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Luine, V.N. Estradiol and cognitive function: Past, present and future. *Horm. Behav.* **2014**, *66*, 602–618. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Sarker, G.; Peleg-Raibstein, D. Maternal overnutrition induces long-term cognitive deficits across several generations. *Nutrients* **2019**, *11*, 7. [\[CrossRef\]](#)
46. Kim, Y.H.; Sung, Y.H.; Lee, H.H.; Ko, I.G.; Kim, S.E.; Shin, M.S.; Kim, B.K. Postnatal treadmill exercise alleviates short-term memory impairment by enhancing cell proliferation and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups born to diabetic rats. *J. Exerc. Rehabil.* **2014**, *10*, 209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Dong, D.; Yu, J.; Wu, Y.; Fu, N.; Villela, N.A.; Yang, P. Maternal diabetes triggers DNA damage and DNA damage response in neurulation stage embryos through oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *467*, 407–412. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Romano, A.; Serviddio, G.; Calcagnini, S.; Villani, R.; Giudetti, A.M.; Cassano, T.; Gaetani, S. Linking lipid peroxidation and neuropsychiatric disorders: Focus on 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *111*, 281–293. [\[CrossRef\]](#)
49. Keller, J.N.; Mark, R.J.; Bruce, A.J.; Blanc, E.; Rothstein, J.D.; Uchida, K.; Waeg, G.; Mattson, P. 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience* **1997**, *80*, 685–696. [\[CrossRef\]](#)
50. Oswald, M.C.; Garnham, N.; Sweeney, S.T.; Landgraf, M. Regulation of neuronal development and function by ROS. *FEBS Lett.* **2018**, *592*, 679–691. [\[CrossRef\]](#)
51. Poston, L. Intergenerational transmission of insulin resistance and type 2 diabetes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2011**, *106*, 315–322. [\[CrossRef\]](#)
52. Pinney, S.E.; Simmons, R.A. Metabolic programming, epigenetics, and gestational diabetes mellitus. *Curr. Diabetes Rep.* **2012**, *12*, 67–74. [\[CrossRef\]](#)



7.2 Capítulo 2

Efectos de la diabetes gestacional en la capacidad cognoscitiva, el estrés oxidante y el metabolismo de la descendencia de segunda generación de ratas

Efectos de la diabetes gestacional en la capacidad cognoscitiva, el estrés oxidante y el metabolismo de la descendencia de segunda generación de ratas

Maribel Huerta-Cervantes ¹, Donovan J. Peña-Montes ¹, Miguel Ángel López-Vázquez ², María Esther Olvera-Cortés ^{2*} and Alfredo Saavedra-Molina ^{1*}

¹ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030 Morelia, Mich., México; marzy112@yahoo.com.mx (M.H.-C.); yodonnie@gmail.com (D.J.P.-M.); rmontoya@umich.mx (R.M.-P.)

² Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, 58341 Morelia, Mich., México; migangelv@yahoo.com.mx (M.A.L.-V.)

* Correspondence: saavedra@umich.mx (A.S.-M.); maesolco@yahoo.com (M.E.O.-C.); Tel: +52-443-326-5790 (A.S.-M.); + 52-443-322-2600 (M.E.O.-C.)

Resumen: La diabetes gestacional (DG) tiene un impacto negativo en el neurodesarrollo reflejándose en deficiencias cognoscitivas y neurológicas, además se ha reportado estrés oxidante en el cerebro de la descendencia de primera generación de ratas. El estrés oxidante ha sido fuertemente asociado con enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, existe poca información acerca del efecto de la diabetes gestacional en la capacidad cognoscitiva de la descendencia de segunda generación. En este trabajo determinamos el efecto de la DG en la capacidad cognoscitiva, el estrés oxidante y el metabolismo de la descendencia machos y hembras de segunda generación en edad juvenil y adulta. La DG se indujo con STZ en ratas gestantes, para obtener la descendencia de primera generación (F1). Ratas hembras F1 fueron apareadas con machos control para obtener la descendencia de segunda generación (F2). Se utilizaron machos y hembras F2 de dos y seis meses de edad. Se evaluó la conducta tipo ansiosa con el laberinto elevado en cruz y la prueba de campo abierto, el aprendizaje espacial con el laberinto acuático de Morris y la memoria a corto plazo con el laberinto radial. Se determinaron los biomarcadores de estrés oxidante (especies reactivas de oxígeno, peroxidación de lípidos, glutatión y superóxido dismutasa), y se midieron parámetros bioquímicos en suero. Los machos descendientes DG presentaron un mayor nivel de ansiedad y las hembras un menor nivel de ansiedad en edad juvenil. En el aprendizaje espacial no se encontraron alteraciones y en la memoria a corto plazo sólo las hembras en edad adulta presentaron deficiencias. Las hembras F2 DG presentaron un incremento de la peroxidación de lípidos en edad juvenil y adulta además una mayor concentración de glutatión oxidado y una menor relación glutatión reducido/oxidado sólo en edad adulta. La DG también alteró el metabolismo de su descendencia F2. Los machos presentaron una concentración de glucosa normal, pero una mayor concentración de colesterol y triglicéridos además una menor concentración de HDL sin modificaciones en la concentración de insulina. Por otra parte, las hembras mostraron una concentración de glucosa normal y un incremento de la concentración de insulina, además un incremento de triglicéridos. Nuestros resultados sugieren un efecto transgeneracional de la diabetes gestacional en el metabolismo, la conducta de ansiedad y la memoria a corto plazo que dan lugar a efectos

dependientes del sexo. Además, una posible asociación entre la producción de estrés oxidante en la corteza cerebral y las deficiencias en la memoria a corto plazo en las hembras descendientes DG.

Palabras clave: diabetes gestacional; ansiedad; corteza; hipocampo; aprendizaje; metabolismo; estrés oxidante

1. Introducción

Se estima que 21.3 millones de nacimientos vivos a nivel mundial son afectados por algún tipo de hiperglucemia en el embarazo, de los cuales el 83% son debidos a diabetes gestacional (DG) y actualmente uno de cada seis embarazos es afectado por la DG [1]. El transporte de la glucosa a través de la placenta no solo afecta el estado metabólico de la embarazada, sino que también interfiere con el desarrollo fetal [2]. La diabetes durante el embarazo causa un estado metabólico intrauterino anormal que en casos extremos resulta en malformaciones congénitas e hipoglucemia neonatal dependiendo de la severidad de la diabetes [3,4]. Estas alteraciones tienen consecuencias a corto y a largo plazo incluyendo modificaciones en el peso al nacimiento, resistencia a la insulina, obesidad y diabetes [5, 6]. La exposición a un medio intrauterino adverso incluido el entorno de hiperglucemia e hiperinsulinemia programa el desarrollo de la descendencia de manera que puede afectar a más de una generación mediante cambios epigenéticos [7]. Aerts et al. [8] demostraron que las modificaciones morfológicas del páncreas y consecuente alteración del metabolismo de glucosa de la descendencia de ratas con DG permanece en subsecuentes generaciones. De la misma manera se ha observado que la descendencia de segunda generación (F2) expuestas a malnutrición (dieta hipo-proteínica o alta en grasa) u obesidad presentan alteraciones del metabolismo de carbohidratos [9-11].

Además de las alteraciones metabólicas, se ha reportado que la diabetes gestacional modifica el desarrollo normal cerebral, hijos de madres con diabetes presentan problemas del neurodesarrollo incluyendo alteraciones en la capacidad de aprendizaje, en la atención y en la función motora [12-15] similar a lo observado en modelos animales [16-18]. Por otra parte, se ha reconocido ampliamente que el estrés oxidante en áreas cerebrales puede impactar negativamente en la función normal del sistema nervioso central además se ha considerado que puede desempeñar un papel clave en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas [19-21] y en los desórdenes neuropsiquiátricos como la depresión o ansiedad [22, 23]. Nuestro laboratorio recientemente reportó el impacto de la diabetes gestacional en el metabolismo, la capacidad cognoscitiva y el estrés oxidante en áreas cerebrales asociadas a la cognición en la descendencia de primera generación [24]. Sin embargo, existe poca información acerca del efecto de la diabetes gestacional en la capacidad cognoscitiva de la descendencia de segunda generación. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si la diabetes gestacional modifica el metabolismo, la conducta de ansiedad, el aprendizaje y la memoria de su descendencia de machos y hembras de

segunda generación en edad juvenil y adulta. Además, conocer si existe una asociación con el estrés oxidante como posible mecanismo subyacente.

2. Material y Métodos

2.1. Diseño Experimental

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NIH Publication No.80-23) y la Norma Oficial Mexicana para el uso de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999) y la aprobación por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS) (R-2017-1603-16).

Se emplearon ratas hembras Wistar (F0) con un peso entre 280-300 g que se mantuvieron bajo ciclo de luz/oscuridad normal (12/12h) a una temperatura de 22°C en un bioterio con alimento estándar (Rat Diet 5012, Lab Diet, St Louis, MO, USA) y agua ad libitum. Las ratas hembras se aparearon con machos control, se verificó la gestación mediante la presencia de espermatozoides en un frotis vaginal. Las hembras gestantes se dividieron aleatoriamente en 2 grupos: ratas gestantes control (GC, n=6) y ratas con diabetes gestacional (DG, n=6). La diabetes gestacional se indujo mediante una dosis única de estreptozotocina (STZ). El modelo de diabetes gestacional y la obtención de la descendencia de primera generación (F1) ya ha sido reportado previamente [24].

Para la obtención de la segunda generación (F2) se emplearon hembras de 3 meses de edad descendientes de grupo gestante control F1 (n=6) y del grupo con diabetes gestacional F1 (n=6). que fueron apareadas con machos control una vez gestantes se les permitió llegar término y parir espontáneamente. Al nacimiento todas las camadas fueron ajustadas a 12 crías y se mantuvo el mismo número de machos y hembras dentro de cada camada. Después del destete las ratas se mantuvieron en grupos de 4 ratas por caja hasta la evaluación conductual. Se emplearon descendientes de segunda generación (F2) de ratas control (C) y de ratas con diabetes gestacional (DG) machos y hembras de dos y seis meses de edad (edad juvenil y adulta respectivamente). Las pruebas conductuales se realizaron a 10-12 ratas por grupo, posteriormente un grupo de 5-6 ratas fueron sacrificadas por decapitación para la determinación de los biomarcadores de estrés oxidante y las ratas restantes fueron perfundidas con formaldehído y reservadas para su posterior análisis morfológico.

2.2. Evaluación Cognoscitiva

Todas las pruebas se realizaron entre las 8:00 y 15:00 h. en el siguiente orden: 1 -Laberinto elevado en cruz, 2 - Campo abierto, 3 - Laberinto acuático de Morris y 4 - Laberinto radial.

2.2.1. Conducta Tipo Ansiosa

2.2.1.1. Laberinto Elevado en Cruz

La conducta tipo ansiosa se evaluó en el laberinto elevado en cruz, el laberinto consistió de dos brazos abiertos opuestos (50×10 cm) y dos brazos cerrados opuestos ($50 \times 10 \times 40$ cm) con un área central abierta. El laberinto estaba elevado a una altura de 50 cm y se iluminó el centro del laberinto con una lámpara de 60 W. El día de evaluación se colocó a la rata en el centro y se registró su conducta durante 10 minutos. Los videos fueron analizados con el software Sci-Works (DataWave Technologies Inc., Longmont, CO, USA). Se determinó el tiempo que las ratas pasaban en los brazos cerrados.

2.2.1.2. Prueba de Campo Abierto

Además del laberinto elevado en cruz, evaluamos la conducta tipo ansiosa con la prueba de campo abierto. El paradigma consistió de una arena cuadrada (60×60 cm) dividida en ocho cuadrantes (zona periférica que incluía las esquinas) y una zona central (abierta). El día del experimento la rata se colocó en el centro de la arena y se registró la conducta durante 10 minutos. Los videos se analizaron con utilizando el software Sci-Works (DataWave Technologies Inc., Longmont, CO, USA) y se midió el tiempo que las ratas pasaban en la zona central.

2.2.2. Aprendizaje Espacial

El aprendizaje espacial se evaluó utilizando el laberinto acuático de Morris. El laberinto consistió en una tina circular (100 cm de diámetro y 28 cm de altura para edad juvenil, 150 cm de diámetro y 50 cm de altura para edad adulta) llena de agua a una temperatura de 27 ± 2 °C que se tiñó de azul oscuro con violeta de genciana. Dentro de la tina se colocó una plataforma circular 2 cm por debajo del nivel del agua en una posición fija (cuadrante P) en uno de los cuatro cuadrantes (virtuales) a lo largo del estudio. En el cuarto de registro se pusieron señales visuales. En la periferia de la tina se colocaron 10 posiciones de inicio. La fase de entrenamiento consistió de 2 ensayos por día con un periodo entre ensayo de 20 minutos durante 8 días consecutivos. El día del experimento se colocaba a la rata con la cara hacia la tina en una de las posiciones de inicio (elegidas aleatoriamente) se liberaba y se le permitía encontrar la plataforma en un tiempo máximo de 60 segundos, si no llegaba a la plataforma el experimentador guiaba a la rata hasta ella. Una vez en la plataforma debía permanecer en ella durante 15 segundos. Al noveno día se realizó un ensayo prueba sin la plataforma para evaluar la memoria, el día de la evaluación la rata se liberó de una de las posiciones de inicio y se le permitió nadar durante 30 segundos. Las rutas de nado fueron analizadas usando el software Sci-Works software (DataWave Technologies Inc., Longmont, CO, USA). Se midió la latencia de escape, la distancia recorrida durante los 8 días de ensayo, y el tiempo que pasaron en cada cuadrante durante el ensayo prueba.

2.2.3. Memoria de Trabajo Espacial (corto plazo)

Para evaluar la memoria de trabajo espacial (memoria a corto plazo) utilizamos el laberinto radial de ocho brazos. El laberinto consistió de una zona central circular de 30 cm de diámetro de la cual 8 brazos se extendían (60 cm × 10 cm). Para esta prueba conductual las ratas se mantuvieron bajo restricción de alimento (80% de su consumo normal *ad libitum*) durante dos semanas antes de la evaluación. La prueba consistió de un periodo de habituación de dos días para que las ratas se familiarizaran con el laberinto. Día 1 de habituación: las ratas permanecieron 10 minutos en el laberinto con libre acceso a la exploración, el día 2 las ratas se colocaron nuevamente en el laberinto durante 10 minutos, con una recompensa (cereal de fruta) disponible en el área central y en los brazos del laberinto. Al tercer día comenzó el periodo de entrenamiento, las ratas se colocaron en el centro del laberinto con los 8 brazos disponibles y al final de cada brazo se colocó una recompensa. Las ratas realizaron 2 ensayos por día con un periodo entre ensayo de 20 minutos durante ocho días consecutivos. En ensayo terminaba cuando la rata comía la recompensa en los ocho brazos con un tiempo máximo de 10 minutos. Se registró el número de brazos visitados (cuando la rata entraba con las cuatro patas al brazo se consideraba una visita). Se midió el número de errores de re-entrada (entradas a brazos previamente visitados), errores de omisión (entradas a los brazos sin comer la recompensa) y los errores totales (errores de re-entrada más los errores de omisión).

Una vez que las pruebas conductuales se completaron, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se obtuvo el cerebro y se recolectaron muestras de sangre.

2.3. Obtención del Homogenado

Se disecaron las dos regiones: el hipocampo y la corteza cerebral de manera bilateral y se cortaron gentilmente. Una parte de los tejidos se homogenizaron con buffer (sacarosa 70 mM, manitol 20 mM, EGTA 1 mM, albúmina sérica bovina-BSA 0.5 % y MOPS 10 mM, pH 7.4) para determinar biomarcadores de estrés oxidante (glutación, especies reactivas de oxígeno y superóxido dismutasa). Otra parte se homogenizó con solución salina al 0.9 % y fue empleada para la determinación de peroxidación de lípidos. Los homogenados fueron almacenados a -70 °C hasta su uso. El contenido de proteína para todas las determinaciones se realizó mediante una modificación del procedimiento de Biuret utilizando BSA como estándar.

2.4. Biomarcadores de estrés oxidante

2.4.1. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Las ERO se determinaron utilizando la sonda 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA). Se suspendieron 500 µg de proteína de los diferentes tejidos en 2 mL de buffer (HEPES 10 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 3 mM y KH₂PO₄ 3 mM, pH 7.4) y se incubó con H2DCFDA 12.5 µM por 15 minutos en un baño de hielo en agitación constante [28]. La fluorescencia basal se registró durante un minuto después se le adicionó glutamate/malato 5 mM/5mM como sustrato. Los cambios en la fluorescencia se registraron durante 20 minutos a una Excitación/Emisión = 480/520 nm en un espectrofluorofotómetro (Shimadzu RF-5301PC, Kyoto, Japan). Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias/mg de proteína.

2.4.2. Determinación de Peroxidación Lipídica

La peroxidación lipídica se fue medida a través de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como lo describe Buege and Aust [25] con ligeras modificaciones. 500 µg de proteína fueron suspendidas en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.4) y se mezcló con la solución reactiva (ácido tiobarbitúrico 0.375%, ácido tricloroacético 15% y ácido clorhídrico 0.25 M). Posteriormente se incubaron por 15 minutos en un baño de agua hirviendo. Se añadió butilhidroxitolueno (BHT) al 0.01% a la solución reactiva para prevenir la formación no específica de cromóforo. Una vez que se atemperaron fueron centrifugadas a 6720 ×g por 5 minutos. Se midió la absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS (Perkin Elmer Inc., Shelton, CT, USA) y se calculó la concentración de TBARS utilizando el coeficiente de extinción molar 156 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.4.3. Determinación de Glutación

El glutación se determinó por el método de reciclaje enzimático descrito por Rahman [26]. 500 µg de proteína fue resuspendida en Tritón X 0.1% y ácido sulfosalicílico al 0.6% en buffer de fosfato de potasio 100 mM con EDTA 5mM con un pH de 7.5 (KPBE). La mezcla fue sonicada en tres ciclos de sonicación/hielo por 20 segundos posteriormente se realizaron 2 ciclos de congelación/descongelación y se centrifugaron a 6500 ×g. El sobrenadante (100 µL) se colocó en KPBE con DTNB 100 µM y 0.1 unidades/mL de glutación reductasa (GR) y se incubaron por 30 segundos. La reacción comenzó con la adición de 50 µM β-NADPH y se monitoreó cinéticamente por 5 minutos a 412 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS (Perkin Elmer Inc., Shelton, CT, USA). El glutación oxidado (GSSG) se obtuvo después de derivatizar el glutación reducido (GSH) incubando con 4-vinilpiridina al 0.2% por 1 h a temperatura ambiente antes de empezar la reacción. El GSH se calculó sustrayendo GSSG del glutación total.

2.4.4. Determinación de la actividad de SOD

La actividad de la SOD se determinó usando un kit comercial (Sigma, 19160, St. Louis, MO, USA) siguiendo las instrucciones de manufactura y para calcular la actividad se utilizó SOD de *Escherichia coli* como estándar.

2.5. Análisis bioquímico del suero

La concentración de glucosa se determinó utilizando un glucómetro comercial (Accu-chek Performa System, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Los lípidos séricos: triglicéridos, colesterol total y la lipoproteína de alta densidad (HDL) se determinaron enzimáticamente usando reactivos de kits siguiendo las instrucciones de manufactura (Química Clínica Aplicada, Amposta, Spain). La concentración de insulina se midió por inmunoensayo tipo sándwich (ELISA) con un kit comercial (80-INSRT-E01, E10, ALPCO Diagnostic, Salem, NY, USA).

2.6. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa Prism (GraphPad versión 7.0, Inc., San Diego, CA, USA). Todos los resultados se expresaron como la media $\pm$ el error estándar de la media (S.E.M.). Las diferencias significativas en el peso corporal, parámetros metabólicos, la conducta tipo ansiosa y los biomarcadores de estrés oxidante se determinaron usando una *t* de Student. Para los datos del aprendizaje espacial y la memoria a corto plazo se usó un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías, de medidas repetidas con el grupo como factor entre sujetos y el día de entrenamiento como el factor intra sujeto, posteriormente se realizó un análisis post hoc de Tukey si las diferencias eran significativas. Para todos los análisis se consideró un valor de $P < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Efecto de la DG en el peso corporal de la descendencia de segunda generación

Se evaluó el peso corporal de la descendencia desde el nacimiento hasta la vida adulta. Los machos descendientes de segunda generación de ratas con DG no presentaron diferencias en el peso al nacimiento ni al destete, pero en edad juvenil mostraron un mayor peso corporal ($t = 5.064$, $P = 0.0001$) en comparación con el grupo control que en edad adulta se normaliza. En las hembras descendientes de ratas con DG no mostraron diferencias en el peso corporal en comparación con las hembras descendientes control a ninguna edad en que fueron evaluadas (Tabla 1).

<i>Peso corporal (g)</i>								
<i>Edad</i>	Machos		<i>n</i>		Hembras		<i>n</i>	
	C	DG	C	DG	C	DG	C	DG
<i>Nacimiento</i>	7.26 ± 0.34	7.50 ± 0.08	16	23	7.00 ± 0.31	7.53 ± 0.11	19	19
<i>Destete (21 días)</i>	45.33 ± 0.79	45.63 ± 1.39	12	19	42.89 ± 0.72	46.6 ± 1.32	20	20
<i>Juvenil (2 meses)</i>	313.9 ± 2.38	331.2 ± 2.44*	10	10	208.4 ± 4.76	218.2 ± 3.63	10	10
<i>Adulta (6 meses)</i>	497.0 ± 8.39	500.0 ± 5.79	10	10	282.0 ± 6.40	285.8 ± 6.12	10	10

Tabla 1. Peso corporal de la descendencia F2 a diferentes edades. Datos expresados como la media ± E.E. *t*-Student, * $P < 0.05$. C: descendencia Control, DG: descendencia de ratas con DG.

3.2 Efecto de la DG en la conducta tipo ansiosa de la descendencia de segunda generación

Se determinó si la DG afecta la conducta tipo ansiosa de su descendencia de segunda generación (F2) se evaluó la conducta en el laberinto elevado en cruz y en el campo abierto. En el laberinto elevado en cruz se tomó el tiempo que las ratas pasaban en los brazos cerrados como un índice de ansiedad. Los machos y hembras descendientes de ratas con DG en edad juvenil y adulta no mostraron diferencias significativas en el tiempo que pasaron en los brazos cerrados en comparación con el grupo control como se muestra en la Figura 1a y b respectivamente.

En la prueba de campo abierto se evaluó el tiempo que pasaban en la zona abierta. Los machos descendientes de ratas con DG en edad juvenil presentaron un mayor nivel de ansiedad, ellos pasaron significativamente menos tiempo en la zona abierta en comparación con la descendencia control ($t = 2.514$, $P = 0.0216$) como se muestra en la Figura 1c. Por el contrario, las hembras descendientes de ratas con DG mostraron un menor nivel de ansiedad, pasaron más tiempo en la zona abierta en comparación con los descendientes de ratas control ($t = 2.514$, $P = 0.0216$) como se puede observar en la Figura 1d.

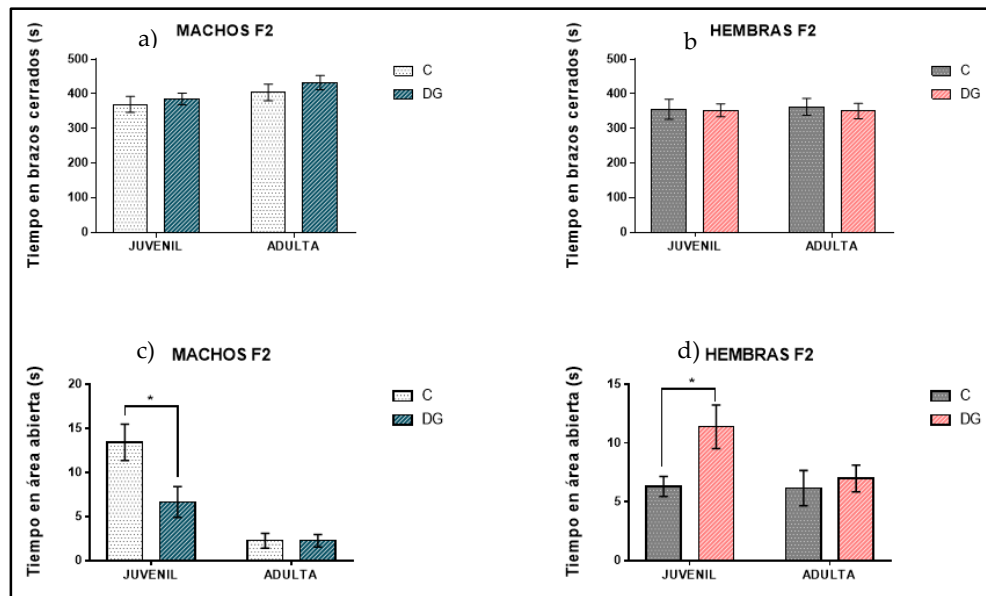


Figura 1. Efecto de la diabetes gestacional en la conducta tipo ansiosa de su descendencia F2. El panel superior muestra el tiempo que pasaron en los brazos cerrados del laberinto elevado en cruz: la descendencia macho a) y la descendencia hembra b) en edad juvenil y adulta. El panel inferior muestra el tiempo que pasaron en la zona abierta del campo abierto, se muestra en c) a la descendencia machos y en d) a la descendencia hembras en la edad juvenil y adulta. C, descendencia control; DG, descendencia de ratas con diabetes gestacional. n = 10-12 por cada grupo. Los datos están expresados como la media $\pm$ E.E. *t*-Student, * $P < 0.05$.

3.3. Efecto de la DG en el aprendizaje espacial de la descendencia de segunda generación

Se inspeccionó si la diabetes gestacional altera el aprendizaje espacial de su descendencia de segunda generación (F2) se evaluó el desempeño en el laberinto acuático de Morris, se realizó una curva de aprendizaje de 8 días. No se encontraron diferencias significativas en la distancia recorrida como se muestra en la Figura 2, los machos y hembras descendientes de ratas con DG mostraron una curva de aprendizaje similar a su respectivo grupo control en edad adulta y juvenil. En el ensayo prueba se observó que la descendencia F2 machos y hembras de ratas con diabetes gestacional así como su respectivo grupo descendiente control pasan más tiempo en el cuadrante P indicando que recuerdan eficientemente en que cuadrante se encontraba la plataforma a lo largo de los días de ensayo en edad juvenil y adulta (Figura 2 c,d y g,h).

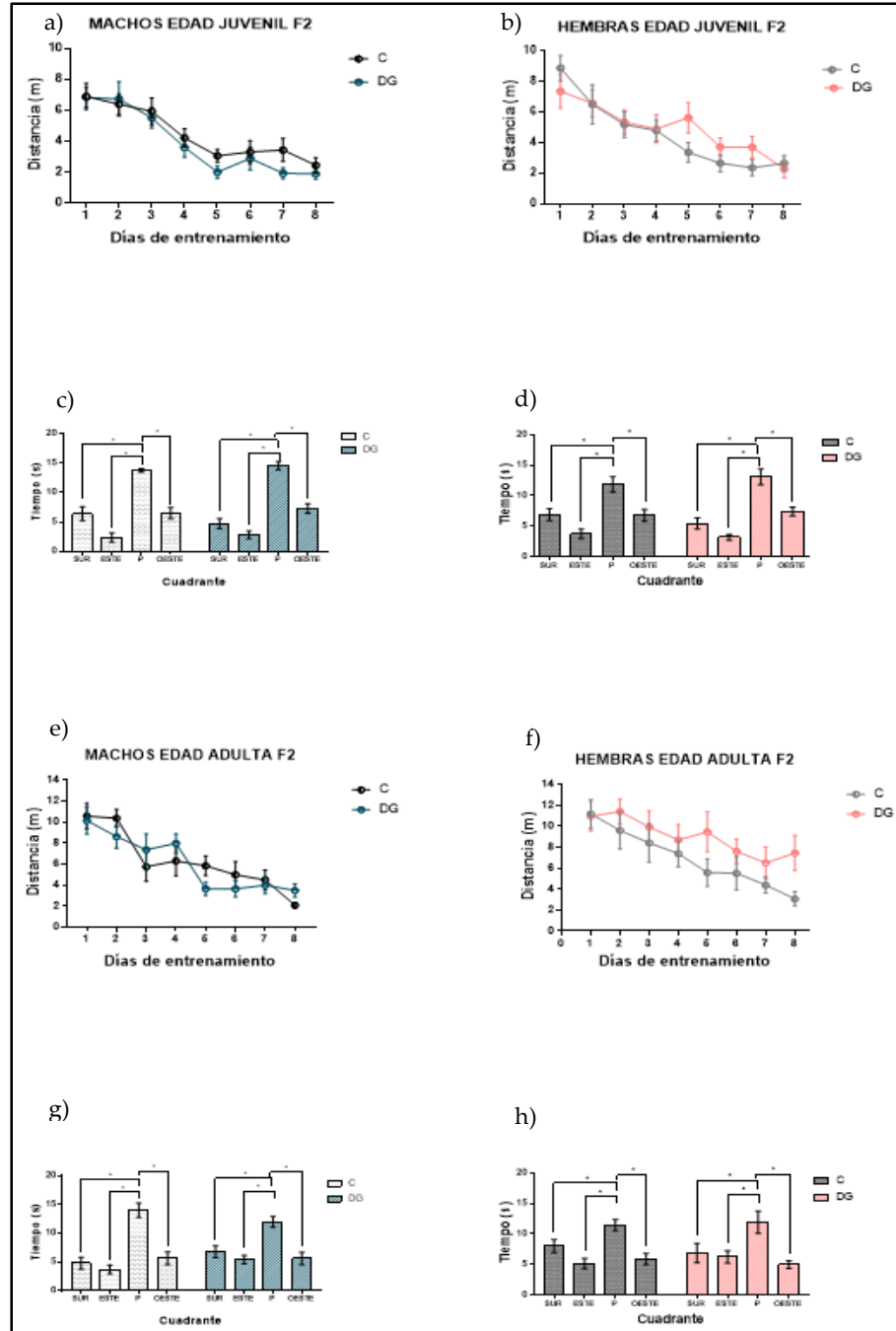


Figura 2. Efecto de la diabetes gestacional en el aprendizaje espacial de la descendencia de segunda generación F2. Se puede observar la distancia recorrida a lo largo de los días de ensayo: descendencia machos y hembras de edad juvenil (a, b) así como el tiempo que pasaron en cada cuadrante en el ensayo prueba (c, d). Distancia recorrida de la descendencia en edad adulta machos y hembras (e, f) así como el tiempo en cada cuadrante de (g, h). C, descendencia de ratas control; DG, descendencia de ratas con DG. Los datos están expresados como la media $\pm$ E.E. ANOVA de dos vías de medidas repetidas, ANOVA de una vía; post hoc Tukey's, *t*-Student; * $P < 0.05$.

3.4. Efecto de la DG en la memoria de trabajo espacial de la descendencia de segunda generación

Se determinó si la diabetes gestacional modifica la memoria de trabajo espacial (memoria a corto plazo) se utilizó el laberinto radial de ocho brazos. En edad juvenil los machos y hembras descendientes de ratas con DG no mostraron alteraciones a través de los días de entrenamiento, realizan la tarea de memoria eficientemente con un comportamiento parecido a los controles (a, b, c y d respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en el número de errores totales y en el número de errores de re-entrada en comparación con su respectivo grupo control. En edad adulta los machos descendientes de ratas con DG no mostraron alteraciones en la memoria a corto plazo a lo largo de los días de ensayo (Figura 3 e y g). Por otro lado, las hembras adultas descendientes de ratas con DG en la curva general de los días de entrenamiento no mostraron diferencias estadísticas por grupo mediante en ANOVA de dos vías de medidas repetidas. Sin embargo, los días 7 y 8 de entrenamiento las hembras adultas descendientes de ratas con DG mostraron mayor número de errores lo que denota claramente una deficiencia en la memoria a corto plazo. Se realizó una *t*-Student al número de errores del día 7 (totales $P = 0.0232$, $t = 2.481$; re-entrada $P = 0.0105$, $t = 2.855$) y día 8 (totales $P = 0.0362$, $t = 2.254$; re-entrada $P = 0.0359$, $t = 2.267$) mostrando una diferencia significativa en ambos días, la descendencia de ratas con DG cometieron más errores totales y de reentrada en comparación con los descendientes control como se muestra en la Figura 3 f y h.

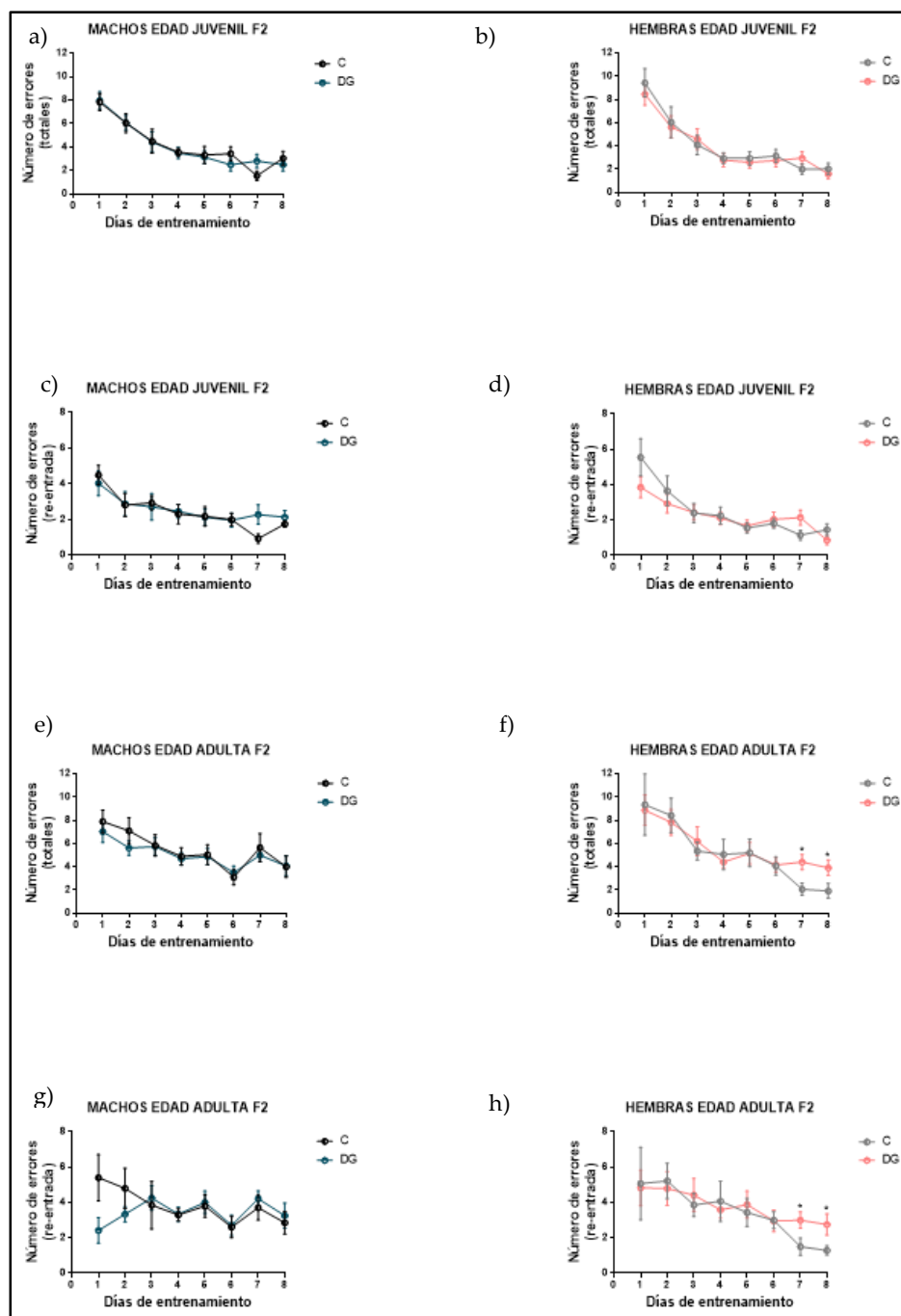


Figura 3. Efecto de la diabetes gestacional en la memoria de trabajo de la descendencia de segunda generación F2. Se pueden el número de errores a lo largo de los días de ensayo. Se muestran los errores totales y de re-entrada (a, b, c y d) de la descendencia machos y hembras de edad juvenil y en edad adulta (e, f, g y h). C, descendencia de ratas control; DG, descendencia de ratas con DG. Los datos están expresados como la media $\pm$ E.E. ANOVA de dos vías de medidas repetidas, ANOVA de una vía; post hoc Tukey's, *t*-Student; * $P < 0.05$.

3.5 Efecto de la diabetes gestacional en los biomarcadores de estrés oxidante del hipocampo y la corteza cerebral de segunda generación

Se determinó si la DG tenía un efecto en los biomarcadores de estrés oxidante en las regiones cerebrales asociadas a las capacidades cognitivas primero evaluamos la producción de especies reactivas de oxígeno. Mediante la sonda fluorescente 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA) se determinaron las ERO. Los machos descendientes de ratas con DG no mostraron diferencias en la cantidad de ERO en hipocampo o corteza cerebral en edad juvenil o adulta. Mostraron una producción de ERO similar al grupo control. En las hembras en edad juvenil y adulta no se encontraron diferencias en la cantidad de ERO en ambas regiones cerebrales. Además, se evaluó la peroxidación lipídica mediante la cuantificación de TBARS. En los machos descendientes de ratas con DG no se encontraron diferencias en la peroxidación lipídica de la corteza cerebral e hipocampo en edad juvenil y adulta en comparación con su respectivo grupo control. En el hipocampo de las hembras descendientes de ratas con DG de edad juvenil no se observaron diferencias en las TBARS en comparación con el grupo control. Por lo que la DG no altera el estado oxidante de su descendencia de segunda generación, machos y hembras juveniles y machos adultos. Sin embargo, en la corteza cerebral de hembras descendientes de ratas con DG en edad juvenil y adulta si se encontró un incremento significativo en la peroxidación de lípidos ($P = 0.0001$, $t = 9.034$; $P = 0.0128$, $t = 2.764$ respectivamente) en comparación con las hembras descendientes control de segunda generación como podemos observar en la Tabla 3.

3.6 Efecto de la diabetes gestacional en los niveles de glutatión del hipocampo y la corteza cerebral de segunda generación

Como se puede observar en la Tabla 1, la corteza e hipocampo de los machos descendientes de ratas con DG no mostraron modificaciones en los niveles de glutatión total, oxidado, reducido y en la relación GSH/GSSG en comparación con el grupo control. El estado del glutatión no se encontró alterado en edad juvenil y adulta del hipocampo y corteza cerebral de la descendencia de segunda generación. Así mismo el estado del glutatión de las hembras en edad juvenil no se alteró en ninguna de las dos regiones cerebrales evaluadas. Por otro lado, en la corteza cerebral de las hembras adultas se encontró un mayor nivel de glutatión oxidado ($P = 0.0435$, $t = 2.17$) y una menor relación GSH/GSSG ($P = 0.0196$, $t = 2.56$) sin modificaciones en el contenido de glutatión total y glutatión reducido como se muestra en la Tabla 2, indicando un daño oxidativo.

3.7 Efecto de la diabetes gestacional en la actividad de la enzima SOD del hipocampo y corteza cerebral de segunda generación

Además, se evaluó la actividad de SOD para conocer el efecto de la DG en el sistema de defensa antioxidante. No se observaron diferencias significativas en la actividad de la enzima en el hipocampo y corteza cerebral de machos y hembras descendientes de ratas con DG en edad juvenil y adulta. La actividad de la enzima superóxido dismutasa no se fue afectada por la diabetes gestacional en la descendencia de segunda generación (Tabla 2).

Descendencia Machos F2

Descendencia Hembras F2

<i>Corteza Cerebral</i>	C-Juvenil <i>n</i> = 6	DG-Juvenil <i>n</i> = 6	C-Adulta <i>n</i> = 6	DG-Adulta <i>n</i> = 6	C-Juvenil <i>n</i> = 5	DG-Juvenil <i>n</i> = 5	C-Adulta <i>n</i> = 5	DG-Adulta <i>n</i> = 5
<i>ERO (unidades arbitrarias/mg proteína)</i>	27.3 ± 4.71	29.0 ± 2.41	45.43 ± 2.27	51.65 ± 3.19	29.78 ± 5.22	28.1 ± 3.45	47.81 ± 4.59	57.62 ± 3.33
<i>Peroxidación de Lípidos (nmoles TBARS/mg proteína)</i>	263.6 ± 26.89	273 ± 28.48	203.4 ± 18.06	270.9 ± 44.75	149.9 ± 10.18	305.4 ± 13.02 *	158.3 ± 24.24	256.7 ± 24.14 *
<i>GSHt (μmoles/mg proteína)</i>	0.312 ± 0.01	0.334 ± 0.01	0.501 ± 0.03	0.565 ± 0.04	0.317 ± 0.1	0.360 ± 0.01	0.520 ± 0.02	0.481 ± 0.03
<i>GSSG (μmoles/mg proteína)</i>	0.129 ± 0.001	0.126 ± 0.01	0.104 ± 0.01	0.087 ± 0.008	0.110 ± 0.02	0.093 ± 0.01	0.097 ± 0.01	0.139 ± 0.01 *
<i>GSH (μmoles/mg proteína)</i>	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.47 ± 0.003	0.20 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.34 ± 0.03
<i>Relación GSH/GSSG</i>	1.90 ± 0.52	1.93 ± 0.54	4.86 ± 1.14	5.74 ± 0.39	2.5 ± 0.6	4.9 ± 1.3	4.89 ± 0.74	2.76 ± 0.43 *
<i>Actividad de SOD (U/mg proteína)</i>	16.02 ± 1.83	15.0 ± 1.90	12.24 ± 2.02	12.79 ± 1.27	16.78 ± 1.91	16.05 ± 1.77	16.17 ± 1.71	14.44 ± 0.27
<i>Hipocampo</i>	C-Juvenil <i>n</i> = 6	DG-Juvenil <i>n</i> = 6	C-Adulta <i>n</i> = 6	DG-Adulta <i>n</i> = 6	C-Juvenil <i>n</i> = 5	DG-Juvenil <i>n</i> = 5	C-Adulta <i>n</i> = 5	DG-Adulta <i>n</i> = 5
<i>ERO (unidades arbitrarias/mg proteína)</i>	18.01 ± 1.39	32.32 ± 8.65	41.22 ± 2.40	47.55 ± 2.49	26.76 ± 2.38	25.48 ± 1.73	40.06 ± 2.97	48.07 ± 4.28
<i>Peroxidación de Lípidos (nmoles TBARS/mg proteína)</i>	283.3 ± 48.42	378.9 ± 46.48	221.5 ± 27.61	195.6 ± 23.15	377.2 ± 50.32	476.3 ± 44.34	208.0 ± 29.1	181.1 ± 16.79
<i>GSHt (μmoles/mg proteína)</i>	0.331 ± 0.03	0.307 ± 0.01	0.511 ± 0.05	0.493 ± 0.06	0.335 ± 0.03	0.296 ± 0.01	0.408 ± 0.08	0.453 ± 0.01
<i>GSSG (μmoles/mg proteína)</i>	0.099 ± 0.01	0.099 ± 0.01	0.108 ± 0.01	0.111 ± 0.01	0.106 ± 0.02	0.117 ± 0.01	0.114 ± 0.01	0.111 ± 0.008
<i>GSH (μmoles/mg proteína)</i>	0.23 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.22 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.29 ± 0.08	0.34 ± 0.01
<i>Relación GSH/GSSG</i>	2.63 ± 0.34	2.65 ± 0.47	4.34 ± 0.64	3.72 ± 0.44	3.49 ± 1.18	2.02 ± 0.50	2.57 ± 0.74	3.36 ± 0.39
<i>Actividad de SOD (U/mg proteína)</i>	13.19 ± 1.36	12.68 ± 2.23	13.49 ± 0.69	14.21 ± 0.52	16.19 ± 2.56	17.47 ± 1.54	17.93 ± 2.60	13.74 ± 1.90

Tabla 2. Efecto de la diabetes gestacional en los biomarcadores de estrés oxidante del hipocampo y corteza cerebral de la descendencia F2. C, descendencia control; GD, descendencia de ratas con DG (n = 5–6). GSHt, glutatión total GSSG, glutatión oxidado. GSH, glutatión reducido. ERO, especies reactivas de oxígeno. TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. SOD, superóxido dismutasa. Los datos están expresados como la media ± E.E. *t*-Student; * *P* < 0.05.

3.8 Efecto de la DG en los parámetros bioquímicos séricos de la descendencia de segunda generación

Para conocer el impacto de la DG en el metabolismo de segunda generación se cuantificó la concentración de glucosa, insulina, colesterol total, triglicéridos y la lipoproteína HDL. Los machos descendientes de ratas con DG no mostraron modificaciones en la glucosa en edad juvenil o adulta en comparación con su respectivo grupo control. La concentración de insulina es fue mayor en los machos descendientes de ratas con DG en edad juvenil ($P = 0.0461$, $t = 2.19$) que en edad adulta ya no se presentó. Además, su metabolismo de lípidos mostró alteraciones. La concentración de colesterol total en la descendencia de ratas con DG fue mayor en comparación con la descendencia control en edad juvenil y adulta ($P = 0.0019$, $t = 3.62$; $P = 0.0019$, $t = 3.60$ respectivamente), presentaron una menor concentración de HDL en ambas edades adulta ($P = 0.0006$, $t = 4.24$; $P = 0.0034$, $t = 3.47$ respectivamente) y una mayor concentración de triglicéridos en edad juvenil que permanece en edad adulta ($P = 0.0228$, $t = 2.48$; $P = 0.0200$, $t = 2.62$ respectivamente) como se muestra en la Tabla 3.

Por otro lado, las hembras descendientes de ratas con diabetes gestacional no mostraron diferencias en la concentración de glucosa, pero si un incremento de la concentración de insulina en edad juvenil y adulta ($P = 0.0461$, $t = 2.20$; $P = 0.0019$, $t = 3.71$ respectivamente) en comparación con la descendencia control. Estas alteraciones podrían reflejar una resistencia a la insulina que se presentó en edad juvenil y continúa en edad adulta. Con respecto al metabolismo de lípidos, las hembras descendientes de ratas con diabetes gestacional no mostraron diferencias significativas en la concentración total y el HDL en edad juvenil y adulta, presentaron concentraciones similares al grupo control. Por otro lado, mostraron una mayor concentración de triglicéridos en edad juvenil que continúa en edad adulta ($P = 0.0005$, $t = 4.35$; $P = 0.0067$, $t = 3.11$ respectivamente) en comparación con las hembras descendientes de ratas control como se puede observar en la Tabla 3, esto podría estar relacionado a la resistencia de insulina que presentaron.

<i>Descendencia Machos F2</i>				
	C-Juvenil	DG-Juvenil	C-Adulta	DG-Adulta
	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 10
<i>Glucosa (mg/dL)</i>	95.43 ± 4.26	100.9 ± 2.96	88.0 ± 1.29	89.9 ± 2.71
<i>Insulina (ng/mL)</i>	0.33 ± 0.015	0.39 ± 0.020 *	0.39 ± 0.028	0.41 ± 0.022
<i>Colesterol (mg/dL)</i>	58.36 ± 4.00	80.23 ± 4.53 *	62.65 ± 2.86	78.78 ± 3.48 *
<i>Triglicéridos (mg/dL)</i>	43.93 ± 2.87	59.91 ± 5.74 *	29.37 ± 2.18	43.80 ± 5.04 *
<i>HDL (mg/dL)</i>	52.34 ± 2.73	39.15 ± 1.72 *	54.84 ± 1.94	43.95 ± 2.39 *
<i>Descendencia Hembras F2</i>				
	C-Juvenil	DG-Juvenil	C-Adulta	DG-Adulta
	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 10
<i>Glucosa (mg/dL)</i>	89.63 ± 2.57	91.63 ± 3.57	87.25 ± 2.44	91.1 ± 1.69
<i>Insulina (ng/mL)</i>	0.33 ± 0.006	0.42 ± 0.046 *	0.35 ± 0.016	0.52 ± 0.048 *
<i>Colesterol (mg/dL)</i>	72.68 ± 4.21	75.46 ± 2.96	68.1 ± 2.78	65.16 ± 4.67
<i>Triglicéridos (mg/dL)</i>	51.13 ± 2.99	49.99 ± 1.60	51.58 ± 2.78	50.85 ± 2.46
<i>HDL (mg/dL)</i>	62.46 ± 1.60	49.06 ± 2.18 *	51.38 ± 3.04	34.73 ± 2.24 *

Tabla 3. Efecto de la diabetes gestacional en los parámetros metabólicos de la descendencia F2. C, descendencia control; GD, descendencia de ratas con DG (*n* = 5–6). Los datos están expresados como la media ± E.E. *t*-Student; * *P* < 0.05.

4. Discusión

En este trabajo evaluamos el efecto de la diabetes gestacional en la descendencia de segunda generación F2. Particularmente en la capacidad cognoscitiva y su posible relación con el estrés oxidante en hipocampo y corteza cerebral, dos regiones que participan en los procesos de aprendizaje y memoria. Además, determinamos si altera el metabolismo de la descendencia F2.

Se ha reportado que la diabetes gestacional modifica el peso al nacimiento de su descendencia de primera generación como consecuencia de la hiperglucemia materna y la hiperactividad de las células β pancreáticas [27-29]. Se ha reportado que la malnutrición hipo-proteínica prenatal o la dieta alta en grasa durante la gestación tiene un efecto en el peso corporal de su descendencia de segunda generación que se observa al nacimiento y en edad adulta [10, 11]. Se midió el peso corporal de la descendencia F2 machos y hembras de ratas con DG en diferentes edades: al nacimiento, al destete, en edad juvenil y en edad adulta. Solo se observó que los machos descendientes F2 de ratas con DG en edad juvenil presentan un mayor peso corporal que no permaneció en edad adulta en comparación con el grupo F2 control, lo que podríamos sugerir que este cambio no es un efecto transgeneracional, porque al nacimiento y destete no lo presentan.

Existe poca información acerca del efecto de la diabetes gestacional en la capacidad cognoscitiva de su descendencia y la existente se ha enfocado principalmente en el efecto en la primera generación. Sin embargo, en roedores con una dieta alta en grasa se ha reportado una deficiencia en el aprendizaje asociativo en la descendencia F2 y F3. Esta alteración cognitiva se presenta paralelamente con un perfil de aminoácidos alterados (glutamato, aspartato, GABA y taurina) en la corteza prefrontal, el hipocampo dorsal y ventral que se sabe regulan esas funciones cognitivas [30]. En nuestro trabajo evaluamos el aprendizaje espacial un tipo de tarea dependiente en gran medida del hipocampo, así como la memoria de trabajo espacial (memoria a corto plazo, dependiente de la corteza prefrontal e hipocampo) en la descendencia F2 de ratas con DG. No se encontraron alteraciones en el aprendizaje espacial de la descendencia F2 machos y hembras en edad juvenil y adulta. Por lo que se podría sugerir que la diabetes gestacional no tiene un efecto transgeneracional que afecte la integridad del hipocampo y por ende su función. En la memoria a corto plazo de los machos F2 descendientes DG no se observaron alteraciones en edad juvenil y adulta una conducta similar que presentan las hembras en edad juvenil. Por otro lado, las hembras en edad adulta presentaron una deficiencia en la memoria a corto plazo, que es evidente al día 7 y 8 de ensayo de la tarea. Interesantemente esta alteración coincide con un incremento en la peroxidación lipídica en la corteza cerebral que se observa en edad juvenil y permanece en edad adulta. Además, se observó un incremento del glutatión oxidado y una menor relación GSH/GSSG, indicando un daño oxidativo en la corteza cerebral de hembras F2 descendientes de ratas con DG. Se ha reportado que el estrés oxidante tiene una participación importante en la generación de alteraciones cognitivas en modelos de diabetes, así como en la enfermedad de Alzheimer o Huntington [31-35]. Se ha demostrado que la diabetes gestacional induce apoptosis y neuroinflamación en el hipocampo de la descendencia de primera generación [28] por lo que otros factores como los inflamatorios podrían estar participando en la alteración cognitiva de la descendencia F2. Además, se ha identificado en deficiencias cognitivas modificaciones epigenéticas en el gen Catecol-O-transferasa que está implicado en procesos como la atención, las funciones ejecutivas, así como en el aprendizaje a corto plazo [36]. Por lo que podrían existir modificaciones epigenéticas en este gen en las hembras descendientes F2 de ratas con DG.

Se encontraron cambios importantes en la conducta tipo ansiosa en la descendencia F2 de ratas con DG en edad juvenil que no permanecieron en edad adulta. Los machos mostraron un nivel de mayor ansiedad y las hembras un menor nivel de ansiedad en comparación con sus respectivos descendientes control. Se ha reportado que en la descendencia de ratas que consumieron una dieta alta en grasas hay alteraciones epigenéticas en genes reguladores de la conducta de ansiedad en la amígdala, el hipocampo, la corteza prefrontal y el hipotálamo y estas alteraciones son dependientes del sexo de la descendencia [37].

Uno de los efectos transgeneracionales de la diabetes gestacional más estudiado es el impacto en el metabolismo de su descendencia. Nosotros mostraron que la descendencia de machos F2 presentan una alteración en el metabolismo de lípidos y que las hembras presentaron resistencia a la insulina, algo similar a lo que reportamos en la descendencia de primera generación [24]. Con respecto a esto Petropoulos et al. [38] reportaron cambios en la metilación del ADN que afectan vías de señalización involucradas en la función endócrina, el metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como la señalización de insulina en la placenta e hígado de ratas y humanos expuestos a diabetes gestacional.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la diabetes gestacional tiene un efecto en el metabolismo y en la capacidad cognoscitiva de su descendencia de segunda generación posiblemente mediada por el estrés oxidante. Aunque otros factores deben ser inspeccionados en el caso de las evaluaciones cognoscitivas evaluar la influencia de la neuroinflamación y los tejidos encargados del metabolismo de glucosa y de lípidos como hígado y páncreas conocer si existen alteraciones vía estrés oxidante. Además, dilucidar un posible mecanismo epigenético.

5. Conclusión

La diabetes gestacional tiene un efecto transgeneracional en el metabolismo y cognición de la descendencia de segunda generación F2 de manera diferencial con respecto al sexo.

REFERENCIAS

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2019; pp. 1–150. Available online: <http://www.diabetesatlas.org> (acceso 01 Julio 2020).
2. Hay Jr, W. W. (2006). Placental-fetal glucose exchange and fetal glucose metabolism. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 117, 321.
3. Martin, F. I., Heath, P., and Mountain, K. R. (1987) Pregnancy in women with diabetes mellitus. Fifteen years' experience. 1970– 1985. *Med. J. Aust.*, 146, 187–190.
4. Fuhrmann, K., Reiher, H., Semmier, K., Fischer, F., Fischer, M., and Glockner, E. (1983) Prevention of congenital malformations in infants of insulin-dependent diabetic mothers. *Diabetes Care*, 6, 219–223.
5. Cowett, R. M., and Shwartz, R. (1982) The infant of the diabetic mother. *Pediatr. Clin. North Am.*, 29, 1213–1231.
6. Small, M., Cameron, A., Lunan, C. B., and MacCuish, A. C. (1987) Macrosomia in pregnancy complicated by insulindependent diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 10, 594–599.
7. Pinney, S.E.; Simmons, R.A. (2012). Metabolic programming, epigenetics, and gestational diabetes mellitus. *Curr. Diabetes Rep.* 12, 67–74.
8. Aerts, L.; Holemans, K.; Van Assche, F.A. (1990). Maternal diabetes during pregnancy: Consequences for the offspring. *Diabetes Metab. Rev.* 6, 147–167.

9. Benyshek, D. C., Johnston, C. S., & Martin, J. F. (2006). Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life. *Diabetologia*, 49(5), 1117-1119.
10. Zambrano, E., Martinez-Samayoa, P. M., Bautista, C. J., Deas, M., Guillen, L., Rodriguez-Gonzalez, G. L., ... & Nathanielsz, P. W. (2005). Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *The Journal of physiology*, 566(1), 225-236.
11. Huang, Y. H., Ye, T. T., Liu, C. X., Wang, L., Chen, Y. W., & Dong, Y. (2017). Maternal high-fat diet impairs glucose metabolism, β -cell function and proliferation in the second generation of offspring rats. *Nutrition & metabolism*, 14(1), 67.
12. Yamamoto, J.M., Benham, J.L., Dewey, D., Sanchez, J.J., Murphy, H.R., Feig, D.S. (2019). Neurocognitive and behavioural outcomes in offspring exposed to maternal pre-existing diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 62, 15611574.
13. Nomura, Y., Marks, D.J., Grossman, B., Yoon, M., Loudon, H., Stone, J., 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. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 166 (4), 337343. Epub 2012/01/04.
14. Ornoy, A., Ratzon, N., Greenbaum, C., Wolf, A., Dulitzky, M., (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. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.: JPEM (J. Pediatr. Endocrinol. Metab.)* 14 (Suppl. 1), 681689. Epub 2001/06/08.
15. Nielsen, G.L., Andersen, E., Lundbye-Christensen, S., (2010). Maternal blood glucose in diabetic pregnancies and cognitive performance in offspring in young adulthood: a Danish cohort study. *Diabet. Med.: J. British Diabet. Assoc.* 27 (7), 786790.
16. Kinney, B.A.; Rabe, M.B.; Jensen, R.A.; Steger, R.W. (2003). Maternal hyperglycemia leads to gender-dependent deficits in learning and memory in offspring. *Exp. Biol. Med.* 228, 152–159.
17. Kim, Y.H.; Sung, Y.H.; Lee, H.H.; Ko, I.G.; Kim, S.E.; Shin, M.S.; Kim, B.K. (2014). Postnatal treadmill exercise alleviates short-term memory impairment by enhancing cell proliferation and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups born to diabetic rats. *J. Exerc. Rehabil.* 10, 209.
18. Chandna, A.R.; Kuhlmann, N.; Bryce, C.A.; Greba, Q.; Campanucci, V.A.; Howland, J.G. (2015). Chronic maternal hyperglycemia induced during mid-pregnancy in rats increases RAGE expression, augments hippocampal excitability, and alters behavior of the offspring. *Neuroscience*. 303, 241–260.
19. Li J, O W, Li W, Jiang ZG, and Ghanbari HA (2013) Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* 14:24438–24475.

20. Behl C, Trapp T, Skutella T, and Holsboer F (1997) Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death—a novel role for RU486. *Eur J Neurosci* 9: 912–920.
21. Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, and Sun GY (2008) Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* 106:45–55.
22. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, and Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84.
23. Ng F, Berk M, Dean O, and Bush AI (2008) Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 11: 851–876.
24. Huerta-Cervantes, M., Peña-Montes, D. J., Montoya-Pérez, R., Trujillo, X., Huerta, M., López-Vázquez, M. Á., ... & Saavedra-Molina, A. (2020). Gestational Diabetes Triggers Oxidative Stress in Hippocampus and Cerebral Cortex and Cognitive Behavior Modifications in Rat Offspring: Age-and Sex-Dependent Effects. *Nutrients*, 12(2), 376.
25. Buege, J.A.; Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.
26. Rahman, I.; Kode, A., Biswas, S.K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 1(6), 3159–3165.
27. 11. Aerts, L.; Van Assche. (2006). F.A. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 894–903.
28. Piazza, F.V.; Segabinazi, E.; de Meireles, A.L.F.; Mega, F.; de Figueiredo Spindler, C.; Augustin, O.A.; Salvalaggio, G.D.S.; Achaval, M.; Kruse, M.S.; Coirini, H. (2019). Severe Uncontrolled Maternal Hyperglycemia Induces Microsomnia and Neurodevelopment Delay Accompanied by Apoptosis, Cellular Survival, and Neuroinflammatory Deregulation in Rat Offspring Hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.* 39, 401–414.
29. Han, J.; Xu, J.; Long, Y. S.; Epstein, P. N.; Liu, Y. Q. (2007). Rat maternal diabetes impairs pancreatic β -cell function in the offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293, E228–E236.
30. Sarker, G., & Peleg-Raibstein, D. (2019). Maternal overnutrition induces long-term cognitive deficits across several generations. *Nutrients*, 11(1), 7.
31. Li, Z. G., Zhang, W., Grunberger, G., & Sima, A. A. (2002). Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain research*, 946(2), 221–231.

32. Lupien, S. B., Bluhm, E. J., & Ishii, D. N. (2003). Systemic insulin-like growth factor-I administration prevents cognitive impairment in diabetic rats, and brain IGF regulates learning/memory in normal adult rats. *Journal of neuroscience research*, 74(4), 512-523.
33. Resende, R., Moreira, P. I., Proença, T., Deshpande, A., Busciglio, J., Pereira, C., & Oliveira, C. R. (2008). Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(12), 2051-2057.
34. Ansari, M. A., & Scheff, S. W. (2010). Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 69(2), 155-167.
35. Browne, S. E., Ferrante, R. J., & Beal, M. F. (1999). Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain pathology*, 9(1), 147-163.
36. Rosales-Reynoso, M. A., Ochoa-Hernández, A. B., Juárez-Vázquez, C. I., & Barros-Núñez, P. (2016). Mecanismos epigenéticos en el desarrollo de la memoria y su implicación en algunas enfermedades neurológicas. *Neurologia*, 31(9), 628-638.
37. Glendining, K. A., Fisher, L. C., & Jasoni, C. L. (2018). Maternal high fat diet alters offspring epigenetic regulators, amygdala glutamatergic profile and anxiety. *Psychoneuroendocrinology*, 96, 132-141.
38. Petropoulos, S., Guillemin, C., Ergaz, Z., Dimov, S., Suderman, M., Weinstein-Fudim, L., Ornoy, A. & Szyf, M. (2015). Gestational diabetes alters offspring DNA methylation profiles in human and rat: identification of key pathways involved in endocrine system disorders, insulin signaling, diabetes signaling, and ILK signaling. *Endocrinology*, 156(6), 2222-2238.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Debido a que la diabetes es un problema de salud a nivel mundial, es necesario estudiar las consecuencias de esta enfermedad en su descendencia, particularmente de la diabetes gestacional (DG) ya que la exposición a elevadas concentraciones de glucosa ocurre durante periodos críticos del desarrollo del feto.

Anormalidades en el metabolismo materno como malnutrición, obesidad y DG alteran el aporte energético e inducen adaptaciones en el desarrollo fetal de su descendencia que pueden tener consecuencias posteriores e incluso afectar a más de una generación [11, 73]. De particular interés es el hecho de que la diabetes materna altera la trayectoria normal del desarrollo cerebral, predisponiendo a la descendencia a desordenes del neurodesarrollo, como deficiencias en la función motora, en la atención y en la capacidad de aprendizaje [24, 32].

En este trabajo se determinó el efecto de la DG en la conducta cognoscitiva y su relación con el estrés oxidante del hipocampo y la corteza cerebral de su descendencia machos y hembras en edad juvenil y adulta. Se ha reportado que la diabetes gestacional modifica el peso al nacimiento de su descendencia de manera dependiente de la concentración de glucosa materna [11]. Los descendientes macho de primera generación de ratas con DG presentaron un menor peso al nacimiento (microsomía neonatal) en comparación con el grupo control, esta alteración se mantuvo hasta la edad adulta. La alta concentración de glucosa induce una sobreestimulación de las células β del páncreas fetal que lleva a hipertrofia, las células se desorganizan y son incapaces de secretar insulina, por lo que la hiperinsulinemia fetal, se convierte en hipoinsulinemia, disminución del anabolismo y microsomía neonatal [20, 74]. Estos resultados concuerdan con Piazza *et al.* [75] que al igual que en la presente investigación utilizaron un modelo de diabetes severa. Por otro lado, las hembras descendientes de ratas con DG no mostraron cambios en el peso al nacimiento, sugiriendo que el páncreas fetal de los machos es más susceptible a los daños ocasionados por la hiperglucemia materna, estas diferencias también han sido observadas en la descendencia de ratas con obesidad

materna o que ingieren una dieta alta en grasa durante la gestación [76, 77]. En la descendencia de segunda generación (machos y hembras), no se observaron cambios en el peso al nacimiento, posiblemente debido a que no estuvieron expuestas directamente al insulto en el ambiente intrauterino.

En la evaluación conductual se observó un nivel más bajo de ansiedad en la descendencia machos de ratas DG, conducta que permaneció en la edad adulta, en las hembras observamos la misma conducta, pero sólo en edad adulta. Lo anterior, observado en machos concuerda con lo reportado por Chandna *et al.* (2015) [24] que reportó un menor nivel de ansiedad en la descendencia de ratas con DG de 58 días de edad (joven). Por otro lado, Ramanathan *et al.* (2000) [78] reportó hiperactividad y así como un nivel mayor de la conducta tipo ansiosa en la descendencia de primera generación de ratas con DG a la edad de dos meses (edad juvenil). La discrepancia de estos resultados y los de Ramanathan *et al.* (2000) [78] podría deberse a diferencias en el tipo de diabetes materna, ellos utilizaron un modelo de diabetes pregestacional, y en el presente trabajo se utilizó un modelo de DG igual que Chandna *et al.* (2015) [24]. Estas observaciones indican que las alteraciones conductuales en la descendencia de ratas diabéticas dependen del nivel de hiperglucemia intrauterina, así como del tiempo de evolución de la diabetes en la madre. En la descendencia de la segunda generación de ratas con diabetes gestacional se observaron modificaciones solamente en la edad juvenil, los machos presentaron un nivel mayor de ansiedad y en contraste, las hembras presentan un menor nivel de ansiedad, lo cual sugiere que las alteraciones en la conducta de ansiedad provocadas por la hiperglucemia materna pueden afectar a más de una generación, también de manera diferencial con respecto al sexo. No existen reportes acerca del mecanismo subyacente en las alteraciones en la ansiedad de la descendencia de ratas con DG, es posible que la señalización de serotonina y el circuito neuronal implicado en la conducta de ansiedad esté alterada. Se ha reportado una asociación entre las alteraciones metabólicas como la diabetes con cambios en la conducta de ansiedad debido a alteraciones en la señalización de la

serotonina [79-81]. Sin embargo, se requieren estudios que evalúen el circuito implicado en la conducta de ansiedad.

Se ha reportado que en el cerebro de la descendencia de ratas con diabetes gestacional hay una menor densidad de espinas dendríticas durante la etapa fetal, debido a un retardo en la maduración de las neuritas debida a una alteración en la señalización del factor de crecimiento tipo insulina [82], y en edad posnatal temprana se presenta una menor densidad de neuronas piramidales en las diferentes subregiones CA1 y CA3 del hipocampo [83]. Estas modificaciones a nivel morfológico, derivadas de la exposición intrauterina materna a concentraciones elevadas de glucosa, sugieren una alteración en la función del hipocampo y otras regiones como la corteza cerebral que están involucradas en funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria. En la actualidad existe poca información acerca del efecto de la DG en la capacidad de aprendizaje de su descendencia, por lo que se evaluó el aprendizaje espacial (una tarea dependiente en mayor medida del hipocampo) y la memoria de trabajo (de corto plazo, tarea dependiente en mayor medida de la corteza cerebral).

Estos resultados sugieren que los cambios en la memoria y aprendizaje son dependientes de la edad y el sexo, mientras que los machos descendientes de ratas con DG no mostraron alteraciones en el aprendizaje espacial, las hembras presentaron un déficit en edad juvenil, esta alteración podría deberse a un retraso en la maduración neuronal o a daño oxidativo en el hipocampo. Estos resultados concuerdan con los reportados por Kinney *et al.* (2003) [84] que también encontraron menor eficiencia de aprendizaje en las hembras de 60 días de edad (edad juvenil). Las alteraciones en el aprendizaje de las hembras en edad juvenil no permanecieron en la vida adulta. Es posible que en edad adulta no presenten deficiencias debido a la producción de estrógenos, se ha reportado que los estrógenos ejercen efectos protectores en las neuronas y contribuyen al proceso normal de consolidación de la memoria [85, 86]. En la descendencia de ratas con DG de segunda generación no se encontraron modificaciones en la curva de aprendizaje espacial de machos y hembras en edad juvenil y adulta, por lo que las

alteraciones en el aprendizaje espacial observadas en la descendencia de primera generación no tienen un efecto transgeneracional.

Se han reportado deficiencias en la memoria a corto plazo o memoria de trabajo en individuos con trastornos metabólicos como diabetes tipo I y II además en la descendencia de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa [87], por lo que se esperaría encontrar deficiencias en este tipo de memoria. Kim *et al.* (2014) [88] reportaron una alteración de la memoria a corto plazo en la descendencia de ratas con DG durante una edad posnatal temprana (6 semanas de edad) y lo relacionan con una disminución de la proliferación celular y mayor apoptosis en el hipocampo. Lo observado en esta investigación, muestran que los machos descendientes de ratas con DG tienen un déficit en la memoria de trabajo solo en la edad adulta, ya que ellos cometen más errores para realizar la tarea en comparación que su grupo control, aunque estos resultados difieren a lo reportado por Kim *et al.* (2014) [88] es posible que la tarea que ellos realizan esté influenciada por el sistema límbico debido a que es una tarea de evitación (aversión). En su investigación se evaluó la tarea en edad posnatal temprana y en el presente trabajo se utilizó el laberinto radial, una prueba no invasiva dependiente completamente de la comunicación de la corteza cerebral con el hipocampo, que se encargan de procesar la memoria a corto plazo y la evaluación se realizó en edad juvenil. Además, es posible que la memoria a corto plazo en la descendencia macho se deteriore conforme se incrementa la edad. Alteraciones en la memoria a corto plazo se han reportado como consecuencia de la pérdida de la integridad de la corteza cerebral. Se han identificado diversos factores implicados en la integridad de la corteza cerebral como, por ejemplo, una menor expresión de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en ratones knockout, alteraciones en la morfología neuronal y exposición a estrés oxidante en modelos de estrés crónico prenatal [89]

Por otro lado, en las hembras de edad juvenil y adulta no se observaron modificaciones en este tipo de memoria, lo que sugiere una integridad de la corteza cerebral. En la descendencia de segunda generación se observó una deficiencia de la memoria de trabajo en las hembras sólo en edad adulta, posiblemente este efecto

sea desencadenado con respecto a la edad o a efectos del estrés oxidante, por lo que la diabetes gestacional. Entonces se podría sugerir que la diabetes gestacional tiene efectos en más de una generación en la memoria de trabajo.

La función cerebral óptima depende de la homeostasis redox celular, cuando el balance entre oxidantes y antioxidantes se pierde se produce estrés oxidante que ha sido estrechamente relacionado a las enfermedades neurodegenerativas. Se ha reportado que en la etapa embrionaria en condiciones de hiperglucemia se promueve el estrés oxidante en el medio intrauterino que puede ser reestablecido con la reducción de las ERO, disminuyendo de esta manera el daño oxidativo en los embriones descendientes de ratas con diabetes gestacional [69, 71]. Con esta investigación, se explora por primera la influencia de la DG sobre el estrés oxidante en áreas específicas del cerebro relacionadas a procesos cognoscitivos, la corteza cerebral y el hipocampo.

Con la evaluación de los biomarcadores de estrés oxidante se observó un incremento significativo de ERO, para corroborar si este incremento en oxidantes estaba relacionado con el daño oxidativo en los lípidos, se evaluó la peroxidación lipídica y se encontró un incremento consistente en la descendencia de machos y de hembras de ratas con DG de la primera generación. El cerebro es muy susceptible a la peroxidación de lípidos debido a su alto contenido de lípidos poliinsaturados, un alto consumo de oxígeno y una defensa antioxidante relativamente deficiente [90]. El 4-hidroxinonenal (4-HNE) y el malondialdehído (MDA) son dos aldehídos altamente reactivos, subproductos de la peroxidación lipídica implicados en la patogénesis de una variedad de trastornos neuropsiquiátricos, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, depresión, enfermedad de Parkinson y esquizofrenia [91]. Además, la oxidación de los lípidos poliinsaturados de la membrana celular conduce a cambios significativos en la integridad celular y en la permeabilidad de la membrana, afectando varios procesos transmembranales, como la activación de receptores, la formación de segundos mensajeros, alteración en la homeostasis del Ca^{2+} , alteraciones en la funcionalidad sináptica y disfunción mitocondrial [92]. Estos resultados sugieren que la corteza

cerebral y el hipocampo son susceptibles al daño oxidativo y, por lo tanto, pueden presentar una función alterada. En la corteza cerebral y el hipocampo de machos y hembras descendientes de ratas con DG de edad juvenil, se observaron alteraciones del sistema antioxidante que permanecieron en la edad adulta. Durante la DG en el medio intrauterino hiperglucémico hay un incremento del daño oxidativo en el feto, así como un estado alterado de los mecanismos de defensa antioxidante, durante la etapa fetal [62] y neonatal [61] en diversos órganos como hígado, riñón y páncreas. Los resultados de esta investigación mostraron que el daño oxidativo al sistema nervioso durante la etapa fetal permanece hasta la edad adulta, específicamente en el hipocampo y la corteza cerebral.

Además, se observó una correlación entre el incremento de las ERO y un subsecuente aumento en la actividad de las enzimas SOD y catalasa con las alteraciones en la memoria y el aprendizaje de los descendientes de ratas con DG de la primera generación, por lo que es posible que esos tres biomarcadores de estrés oxidante sean lo suficientemente sensibles para reflejar directamente las alteraciones en la función del hipocampo y la corteza cerebral en comparación con otros biomarcadores como glutatión. El estrés oxidante podría modificar el desarrollo cerebral normal y conducir a modificaciones conductuales. Aunque en este trabajo se observó un incremento de peroxidación lipídica y una alteración de los niveles de glutatión en ambas áreas cerebrales en las dos edades de machos y hembras descendientes de ratas con DG, no se encontraron deficiencias en el aprendizaje y en la memoria, por lo que es posible que exista una relación más compleja entre el estrés oxidante y las capacidades cognitivas. Es posible que la acumulación del daño en las neuronas por el estrés oxidante comprometa la función desde la edad juvenil hasta la edad adulta. Las ERO y las ERN en el sistema nervioso tienen un papel central como segundos mensajeros. Las neuronas son capaces de registrar, transmitir y convertir señales de las ERO y ERN en respuestas intracelulares (mediante proteínas sensibles a cambios redox) en diversos procesos incluyendo la plasticidad sináptica [69]. La producción controlada de las ERO proporciona el estado redox óptimo para la activación de las vías transducciones

implicadas en la plasticidad sináptica y la regulación del desarrollo neuronal a partir de precursores neuronales, así como en la proliferación, diferenciación y maduración celular [93]. En la descendencia de la segunda generación, la producción de ERO en el hipocampo y la corteza cerebral de machos y hembras de edad juvenil y adulta fue similar al de su respectivo grupo control, sin embargo se observó una mayor peroxidación de lípidos en la corteza cerebral de las descendientes hembras de ratas con DG en edad juvenil que permanece en edad adulta, además de una mayor concentración de glutatión oxidado y una menor relación GSH/GSSG, evidenciando un daño por estrés oxidante en la corteza cerebral. Estos datos se relacionan con la deficiencia en la memoria a corto plazo que muestran en edad adulta, posiblemente el estrés oxidante esté alterando la función de la corteza cerebral. Las modificaciones en la memoria de trabajo que es dependiente de la corteza cerebral en mayor medida también se manifiestan en más de una generación.

Se ha descrito ampliamente que cualquier tipo de estrés intrauterino incluyendo los factores nutrimentales, incrementan el riesgo de padecer enfermedades metabólicas como diabetes tipo 2 durante la vida adulta [11, 9, 73, 94, 95]. Los resultados mostraron una alteración metabólica en la descendencia tanto de machos como de hembras de ratas con DG. La progenie masculina en edad juvenil mostró una disminución de la concentración de insulina lo que se correlaciona con el bajo peso al nacimiento, Aerts y Van Asche (2006) [11] reportan que las crías microsómicas durante la edad fetal tuvieron una sobreestimulación de células β del páncreas e hiperinsulinemia fetal, en edad posnatal temprana manifiestan hipoinsulinemia debido a una hipertrofia del páncreas, lo que se observó en edad juvenil y que en edad adulta desaparece. Además, se encontraron alteraciones del metabolismo de lípidos; un incremento de la concentración de colesterol y los triglicéridos (posible dislipidemia) en edad juvenil que permaneció en edad adulta. Por otro lado, las hembras mostraron un incremento de la concentración de insulina y una concentración de glucosa normal indicativo de resistencia a la insulina además de una alteración del metabolismo lipídico en

ambas edades. La descendencia de la segunda generación también presentó anomalías del metabolismo, los machos presentaron alteraciones del metabolismo de lípidos en edad juvenil que permaneció en edad adulta y las hembras presentaron resistencia a la insulina, que se observó en edad juvenil y permaneció en edad adulta. Los resultados obtenidos sugieren que la DG, así como otras alteraciones como la desnutrición materna [96] tienen efectos en el estado de salud de su descendencia en más de una generación, aun cuando la segunda generación no ha estado expuesta a alteraciones en el medio intrauterino y que estas alteraciones están estrechamente ligadas al sexo de la descendencia. En recientes años se han realizado estudios en el epigenoma del hígado de ratas expuestas a diabetes pregestacional (edad embrionaria y posnatal temprana), así como en la placenta humana, se han reportado alteraciones en la metilación del ADN, en genes específicos involucrados en la función endocrina, el metabolismo y la respuesta de la insulina, como el gen del receptor PPAR γ , cuya función es incrementar la utilización de glucosa y favorece la acción de la insulina en hígado, además participa en el almacenamiento de lípidos en tejido adiposo. Estos datos apoyan la hipótesis de la programación y el desarrollo de enfermedades metabólicas en la vida adulta que se observaron en la descendencia de ratas con DG de primera y segunda generación. Lo que sugiere la participación de mecanismos epigenéticos [23].

En resumen, estos resultados sugieren que la DG modifica el estado metabólico de su descendencia lo que podría estar relacionado a la generación de estrés oxidante, así como a las alteraciones cognitivas de su descendencia de la primera y la segunda generación. Los efectos de la DG son dependientes de la edad y el sexo. Para elucidar el posible mecanismo que subyace en estas alteraciones, es necesario evaluar otros posibles mediadores como la posible participación de moléculas inflamatorias, modificaciones en la morfología neuronal y en los factores neurotróficos. Además, la determinación de los mecanismos epigenéticos subyacentes en las alteraciones observadas en la descendencia de la segunda generación, así como su posible efecto en subsecuentes generaciones.

9. CONCLUSIÓN GENERAL

La diabetes gestacional modifica la conducta de ansiedad, disminuye el aprendizaje y la memoria y desencadena estrés oxidante en el hipocampo y corteza cerebral, además altera el metabolismo de la glucosa y los lípidos de su descendencia de la primera y la segunda generación. La diabetes gestacional programa a su descendencia a presentar alteraciones cognoscitivas y metabólicas, estos efectos son dependientes de la edad y el sexo.

10.PERSPECTIVAS

- Evaluar la morfología neuronal del hipocampo y corteza cerebral de la descendencia de ratas con diabetes gestacional.
- Evaluar los efectos de la diabetes gestacional en la capacidad cognoscitiva, el estrés oxidante del hipocampo y la corteza cerebral y el metabolismo de la descendencia de tercera generación.
- Estudiar la participación de procesos neuro-inflamatorios en las alteraciones cognoscitivas observadas en la descendencia de ratas con diabetes gestacional.
- Elucidar un posible mecanismo mediante marcadores epigenéticos de las alteraciones observadas en la descendencia de ratas con diabetes gestacional

11. REFERENCIAS

1. WHO Reproductive Health Library. WHO recommendation on the diagnosis of gestational diabetes in pregnancy. (December 2016). The WHO Reproductive Health Library, World Health Organization: Geneva, Switzerland. Available online: <https://extranet.who.int/rhl/topics/preconception-pregnancy-childbirth-and-postpartum-care/antenatal-care/who-recommendation-diagnosis-gestational-diabetes-pregnancy-0> (acceso 01 Julio 2020).
2. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2019; pp. 1–150. Available online: <http://www.diabetesatlas.org> (acceso 01 Julio 2020)
3. Diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo. Evidencias y recomendaciones. Catálogo maestro de guías de práctica clínica: IMSS-320-10. México: Instituto Mexicano del Seguro Social; 03/11/2016.
4. OMS. Informe mundial sobre la diabetes. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; Ginebra, Suiza, 2016; pp. 1-88.
5. Kamana, K. C., Shakya, S., & Zhang, H. (2015). Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66(2), 14-20.
6. Di Cianni, G., Miccoli, R., Volpe, L., Lencioni, C., & Del Prato, S. (2003). Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 19(4), 259-270.
7. Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3342.
8. Shang, M., & Lin, L. (2014). IADPSG criteria for diagnosing gestational diabetes mellitus and predicting adverse pregnancy outcomes. *Journal of Perinatology*, 34(2), 100-104.
9. Pedersen, J. (1954). Weight and length at birth of infants of diabetic mothers. *European Journal of Endocrinology*, 16(4), 330-342.
10. Freinkel, N. (1980). Banting Lecture 1980: Of pregnancy and progeny. *Diabetes*, 29(12), 1023-1035.
11. Aerts, L.; Van Assche. (2006). F.A. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 894–903.

12. Friedman, J.E. (2015). Obesity and gestational diabetes mellitus pathways for programming in mouse, monkey, and man—where do we go next? The 2014 Norbert Freinkel Award Lecture. *Diabetes Care*. 38, 1402–1411.
13. Pettitt, D. J., Baird, H. R., Aleck, K. A., Bennett, P. H., & Knowler, W. C. (1983). Excessive obesity in offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 308(5), 242-245.
14. López-Soldado, I., & Herrera, E. (2003). Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Experimental Diabetes Research*, 4.
15. Rodriguez, R.R.; Renauld, A.; Celener, D.; Pérez, R.L.; Susemihl, M.C. (1998). Offspring of streptozotocin diabetic rats: Size changes in Langerhans islets with time after birth. *Diabetes Res. Clin. Prac.* 41, 95–100.
16. Han, J.; Xu, J.; Long, Y.S.; Epstein, P.N.; Liu, Y.Q. (2007). Rat maternal diabetes impairs pancreatic cell function in the offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E228–E236.
17. Merzouk, H., Madani, S., Chabane Sari, D., Prost, J., Bouchenak, M., & Belleville, J. (2000). Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clinical Science*, 98(1), 21-30.
18. Segar, E. M., Norris, A. W., Yao, J. R., Hu, S., Koppenhafer, S. L., Roghair, R. D., ... & Scholz, T. D. (2009). Programming of growth, insulin resistance and vascular dysfunction in offspring of late gestation diabetic rats. *Clinical Science*, 117(3), 129-138.
19. Blondeau, B., Joly, B., Perret, C., Prince, S., Bruneval, P., Lelièvre-Pégorier, M., ... & Van Huyen, J. P. D. (2011). Exposure in utero to maternal diabetes leads to glucose intolerance and high blood pressure with no major effects on lipid metabolism. *Diabetes & metabolism*, 37(3), 245-251.
20. Aerts, L.; Holemans, K.; Van Assche, F.A. (1990). Maternal diabetes during pregnancy: Consequences for the offspring. *Diabetes Metab. Rev.* 6, 147–167.
21. Barker, D. J. (1995). Intrauterine programming of adult disease. *Molecular medicine today*, 1(9), 418-423.

22. Seki, Y.; Williams, L.; Vuguin, P.M.; Charron, M.J. (2012). Minireview: Epigenetic programming of diabetes and obesity: Animal models. *Endocrinology*. 153, 1031–1038.
23. Petropoulos, S., Guillemin, C., Ergaz, Z., Dimov, S., Suderman, M., Weinstein-Fudim, L., Ornoy, A. & Szyf, M. (2015). Gestational diabetes alters offspring DNA methylation profiles in human and rat: identification of key pathways involved in endocrine system disorders, insulin signaling, diabetes signaling, and ILK signaling. *Endocrinology*, 156(6), 2222-2238.
24. Chandna, A.R.; Kuhlmann, N.; Bryce, C.A.; Greba, Q.; Campanucci, V.A.; Howland, J.G. (2015). Chronic maternal hyperglycemia induced during mid-pregnancy in rats increases RAGE expression, augments hippocampal excitability, and alters behavior of the offspring. *Neuroscience*. 303, 241–260.
25. Ornoy, A. (2007). Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reproductive toxicology*, 24(1), 31-41.
26. Widness, J. A., Susa, J. B., Garcia, J. F., Singer, D. B., Sehgal, P. W. & Schwartz, H. C. (1981). Increased erythropoiesis and elevated erythropoietin in infants born to diabetic mothers and in hyperinsulinemic rhesus fetuses. *The Journal of clinical investigation*, 67(3), 637-642.
27. Petry, C. D., Eaton, M. A., Wobken, J. D., Mills, M. M., Johnson, D. E., & Georgieff, M. K. (1992). Iron deficiency of liver, heart, and brain in newborn infants of diabetic mothers. *The Journal of pediatrics*, 121(1), 109-114.
28. deUngria, M., Rao, R., Wobken, J. D., Luciana, M., Nelson, C. A., & Georgieff, M. K. (2001). Perinatal iron deficiency decreases cytochrome c oxidase (CytOx) activity in selected regions of neonatal rat brain. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 56(4), 191-193.
29. Nelson, C., & Silverstein, F. S. (1994). Acute disruption of cytochrome oxidase activity in brain in a perinatal rat stroke model. *Pediatric research*, 36(1), 12-19.
30. Bolo, N. R., Musen, G., Simonson, D. C., Nickerson, L. D., Flores, V. L., Siracusa, T., ... & Jacobson, A. M. (2015). Functional connectivity of insula, basal ganglia, and prefrontal executive control networks during hypoglycemia in type 1 diabetes. *Journal of Neuroscience*, 35(31), 11012-11023.

31. He, X. S., Wang, Z. X., Zhu, Y. Z., Wang, N., Hu, X., Zhang, D. R., ... & Zhou, J. N. (2015). Hyperactivation of working memory-related brain circuits in newly diagnosed middle-aged type 2 diabetics. *Acta diabetologica*, 52(1), 133-142.
32. Xia, W., Wang, S., Rao, H., Spaeth, A. M., Wang, P., Yang, Y., ... & Sun, H. (2015). Disrupted resting-state attentional networks in T2DM patients. *Scientific reports*, 5, 11148.
33. Zhou, L. Y., Wright, T. E., & Clarkson, A. N. (2016). Prefrontal cortex stroke induces delayed impairment in spatial memory. *Behavioural brain research*, 296, 373-378.
34. Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (Eds.). (2006). The hippocampus book. Oxford university press.
35. Freund, T. F., & Buzsaki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347-470.
36. Dolorfo, C. L., & Amaral, D. G. (1998). Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 398(1), 25-48.
37. Stubbley-Weatherly, L., Harding, J. W., & Wright, J. W. (1996). Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain research*, 716(1-2), 29-38.
38. Kolb, B., & Gibb, R. (1991). Anatomical correlates of behavioural change after neonatal prefrontal lesions in rats. *In Progress in brain research*. 85, 241-256.
39. Zilles, K., Schleicher, A., Glaser, T., Traber, J., & Rath, M. (1985). The ontogenetic development of serotonin (5-HT 1) receptors in various cortical regions of the rat brain. *Anatomy and embryology*, 172(3), 255-264.
40. Krettek, J. E., & Price, J. L. (1977). The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 171(2), 157-191.
41. Jay, T. M., Glowinski, J., & Thierry, A. M. (1989). Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain research*, 505(2), 337-340.
42. Kolb, B. (1984). Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Research Reviews*, 8(1), 65-98.
43. Johnston, V. S., Hart, M., & Howell, W. (1974). The nature of the medial wall deficit in the rat. *Neuropsychologia*, 12(4), 497-500.

44. Pribram, K. H., Ahumada, A., Hartog, J., & Ross, L. A. (1964). A progress report on the neurological processes disturbed by frontal lesions in primates. *Experimental Neurology*, 96, 841-500.
45. Hvoslef-Eide, M., Oomen, C. A., Fisher, B. M., Heath, C. J., Robbins, T. W., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2015). Facilitation of spatial working memory performance following intra-prefrontal cortical administration of the adrenergic alpha1 agonist phenylephrine. *Psychopharmacology*, 232(21-22), 4005-4016.
46. Kesner, R. P., & Ragozzino, M. (1998). Pharmacological approaches to animal models of human working memory and shifting attentional set. Commentary on Robbins' Homology in behavioural pharmacology: an approach to animal models of human cognition. *Behavioural Pharmacology*, 9(7), 521-524.
47. McAllister, K. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2013). Dissociation between memory retention across a delay and pattern separation following medial prefrontal cortex lesions in the touchscreen TUNL task. *Neurobiology of learning and memory*, 101, 120-126.
48. Ragozzino, M. E., & Kesner, R. P. (1998). The effects of muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat anterior cingulate and prelimbic/infralimbic cortices on spatial working memory. *Neurobiology of learning and memory*, 69(3), 241-257.
49. Seamans, J. K., Floresco, S. B., & Phillips, A. G. (1995). Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. *Behavioral neuroscience*, 109(6), 1063.
50. Barker, G. R., Banks, P. J., Scott, H., Ralph, G. S., Mitrophanous, K. A., Wong, L. F., & Warburton, E. C. (2017). Separate elements of episodic memory subserved by distinct hippocampal–prefrontal connections. *Nature Neuroscience*, 20(2), 242-250.
51. Sapiurka, M., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2016). Distinct roles of hippocampus and medial prefrontal cortex in spatial and nonspatial memory. *Hippocampus*, 26(12), 1515-1524.
52. Allen, R. G., & Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(3), 463-499.
53. De Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C. et al. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 5, 9–19.

54. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
55. Cadenas, E., and Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.
56. Balaban, R. S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120, 483–495.
57. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*, 52(4), 601-623.
58. Dhalla, N. S., Temsah, R. M., & Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of hypertension*, 18(6), 655-673.
59. Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 53(S3), S26-S38.
60. Sayre, L. M., Smith, M. A., & Perry, G. (2001). Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Current medicinal chemistry*, 8(7), 721-738.
61. Raza, H.; John, A. (2004). Glutathione metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissues from streptozotocin-induced diabetic mothers. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 20, 72–78.
62. Kamel, M.A.; Helmy, M.H.; Hanafi, M.Y.; Mahmoud, S.A.; Elfetoh, H.A. (2014). Effect of maternal diabetes on pre-and post-natal redox status of F1 rat offspring. *Open J. Endocr. Metab. Dis.*, 4, 111.
63. Campese VM, Ye S, Zhong H, Yanamadala V, Ye Z, Chiu J. (2004) Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 287:H695–H703.
64. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:11285–11289
65. Stevens CF, Wang Y. (1993) Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase. *Nature* 364:147–149.

66. Zhuo M, Small SA, Kandel ER, Hawkins RD. (1993) Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* 260:1946–1950.
67. Knapp LT, Klann E. (2002) Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *J Neurosci Res* 70:1–7.
68. Gu Y, Dee CM, Shen J. (2011) Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. *Front Biosci.* 3:1216–1231.
69. Wang X, Michaelis EK. (2010) Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci* 2:12.
70. Sorce S, Krause KH. (2009) NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal* 11:2481–2504.
71. Dong, D.; Yu, J.; Wu, Y.; Fu, N.; Villela, N.A.; Yang, P. (2015). Maternal diabetes triggers DNA damage and DNA damage response in neurulation stage embryos through oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467, 407–412.
72. Ornoy, A., Reece, E. A., Pavlinkova, G., Kappen, C., & Miller, R. K. (2015). Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 105(1), 53-72.
73. Poston, L. (2011). Intergenerational transmission of insulin resistance and type 2 diabetes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 106, 315–322.
74. Kervran, A., Guillaume, M., & Jost, A. (1978). The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia*, 15, 387–393.
75. Piazza, F.V.; Segabinazi, E.; de Meireles, A.L.F.; Mega, F.; de Figueiredo Spindler, C.; Augustin, O.A.; Salvalaggio, G.D.S.; Achaval, M.; Kruse, M.S.; Coirini, H. (2019). Severe Uncontrolled Maternal Hyperglycemia Induces Microsomia and Neurodevelopment Delay Accompanied by Apoptosis, Cellular Survival, and Neuroinflammatory Deregulation in Rat Offspring Hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.* 39, 401–414.
76. Panchenko, P.E.; Lacroix, M.C.; Jouin, M.; Voisin, S.; Badonnel, K.; Lemaire, M.; Durieux, D. (2019). Effect of Maternal Obesity and Preconceptional Weight Loss on Male and Female Offspring Metabolism and Olfactory Performance in Mice. *Nutrients*. 11, 948.

77. Wankhade, U.D.; Zhong, Y.; Kang, P.; Alfaro, M.; Chintapalli, S.V.; Piccolo, B.D.; Shankar, K. (2018). Maternal high-fat diet programs offspring liver steatosis in a sexually dimorphic manner in association with changes in gut microbial ecology in mice. *Sci. Rep.* 8, 16502.
78. Ramanathan, M.; Jaiswal, A.K.; Bhattacharya, S.K. (2000). Hyperglycaemia in pregnancy: Effects on the offspring behavior with special reference to anxiety paradigms. *Indian J. Exp. Biol.* 38, 231–236.
79. Heisler, L. K., Zhou, L., Bajwa, P., Hsu, J., & Tecott, L. H. (2007). Serotonin 5-HT_{2C} receptors regulate anxiety-like behavior. *Genes, Brain and Behavior*, 6(5), 491-496.
80. Thorré, K., Chaoulloff, F., Sarre, S., Meeusen, R., Ebinger, G., & Michotte, Y. (1997). Differential effects of restraint stress on hippocampal 5-HT metabolism and extracellular levels of 5-HT in streptozotocin-diabetic rats. *Brain research*, 772(1-2), 209-216.
81. Rebolledo-Solleiro, D., Roldán-Roldán, G., Díaz, D., Velasco, M., Larqué, C., Rico-Rosillo, G. & Pérez de la Mora, M. (2017). Increased anxiety-like behavior is associated with the metabolic syndrome in non-stressed rats. *PLoS One*, 12(5).
82. Jing, Y.H.; Song, Y.F.; Yao, Y.M.; Yin, J.; Wang, D.G.; Gao, L.P. (2014). Retardation of fetal dendritic development induced by gestational hyperglycemia is associated with brain insulin/IGF-I signals. *Int. J. Dev. Neurosci.* 37, 15–20.
83. Golalipour, M.J.; Kafshgiri, S.K.; Ghafari, S. (2012). Gestational diabetes induced neuronal loss in CA1 and CA3 subfields of rat hippocampus in early postnatal life. *Folia Morphol.* 71, 71–77.
84. Kinney, B.A.; Rabe, M.B.; Jensen, R.A.; Steger, R.W. (2003). Maternal hyperglycemia leads to gender-dependent deficits in learning and memory in offspring. *Exp. Biol. Med.* 228, 152–159.
85. McEwen, B.S.; Alves, S.E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr. Rev.* 20, 279–307.
86. Luine, V.N. (2014). Estradiol and cognitive function: Past, present and future. *Horm. Behav.* 66, 602–618.
87. Sarker, G.; Peleg-Raibstein, D. (2019). Maternal overnutrition induces long-term cognitive deficits across several generations. *Nutrients* 11, 7.
88. Kim, Y.H.; Sung, Y.H.; Lee, H.H.; Ko, I.G.; Kim, S.E.; Shin, M.S.; Kim, B.K. (2014). Postnatal treadmill exercise alleviates short-term memory impairment by enhancing

- cell proliferation and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups born to diabetic rats. *J. Exerc. Rehabil.* 10, 209.
89. Li, B., Arime, Y., Hall, F. S., Uhl, G. R., & Sora, I. (2010). Impaired spatial working memory and decreased frontal cortex BDNF protein level in dopamine transporter knockout mice. *European journal of pharmacology*, 628(1-3), 104-107.
 90. Rego, A.C.; Oliveira, C.R. (2003). Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: Implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* 28,1563–1574.
 91. Romano, A.; Serviddio, G.; Calcagnini, S.; Villani, R.; Giudetti, A.M.; Cassano, T.; Gaetani, S. (2017). Linking lipid peroxidation and neuropsychiatric disorders: Focus on 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic. Biol. Med.* 111, 281–293.
 92. Keller, J.N.; Mark, R.J.; Bruce, A.J.; Blanc, E.; Rothstein, J.D.; Uchida, K.; Waeg, G.; Mattson, P. (1997). 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience* 80, 685–696.
 93. Beckhauser, T. F., Francis-Oliveira, J., & De Pasquale, R. (2016). Reactive oxygen species: physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity: supplementary issue: brain plasticity and repair. *Journal of experimental neuroscience*, 10, 23-48.
 94. Oswald, M.C.; Garnham, N.; Sweeney, S.T.; Landgraf, M. (2018). Regulation of neuronal development and function by ROS. *FEBS lett.* 592, 679–691.
 95. Pinney, S.E.; Simmons, R.A. (2012). Metabolic programming, epigenetics, and gestational diabetes mellitus. *Curr. Diabetes Rep.* 12, 67–74.
 96. Benyshek, D. C., Johnston, C. S., & Martin, J. F. (2006). Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life. *Diabetologia*, 49(5), 1117-1119.

12. ANEXOS

Artículo de divulgación en la Revista Saber Más, revista de divulgación científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

<https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/343-numero-40/622-consecuencias-de-un-dulce-embarazo.html>

Año 7 / Julio-Agosto/ No. 40 | U.M.S.N.H.

ARTÍCULO

Consecuencias de un dulce embarazo

Maribel Huerta Cervantes y Alfredo Saavedra Molina



Diabetes gestacional

La diabetes gestacional es una alteración del metabolismo de los carbohidratos (también llamados glúcidos), que se caracteriza por un incremento de glucosa en la sangre, que se reconoce por primera vez durante el embarazo.

Este tipo de diabetes se considera un estado transitorio que sólo se presenta durante la etapa del embarazo y que posterior al parto o cesárea desaparece, aunque en algunos casos puede evolucionar a diabetes tipo 2.

De hecho, se ha propuesto que la diabetes gestacional se desencadena en respuesta a un incremento excesivo de diversas hormonas como el lactógeno placentario, la progesterona, el cortisol, la hormona del crecimiento y la prolactina.

El papel de estas hormonas es el adecuado en el funcionamiento de la placenta durante el embarazo normal, es decir cuando no se presentan las condiciones de la diabetes gestacional. La detección de este tipo de diabetes se realiza a través de la prueba de O'Sullivan que consiste en la administración oral de una carga de glucosa de 50 gramos y una hora después se extrae sangre para la determinación de los niveles de glucosa, si la concentración es mayor a 140mg/dL, la prueba se considera positiva.

La M.C. Maribel Huerta Cervantes es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Opción en Biología Experimental, marzy112@yahoo.com.mx

D.C. Alfredo Saavedra Molina es Profesor e Investigador, ambos del Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, saavedra@umich.mx

Coordinación de Investigación Científica

27

La diabetes gestacional va en aumento en México

En los últimos años, como ya vimos anteriormente, el número de personas que padece diabetes en nuestro país ha incrementado, debido a esto, México ocupa el quinto lugar a nivel mundial en prevalencia de esta enfermedad y de manera interesante, del número total de casos, el 53% lo padecen las mujeres. Aunado a lo anterior, nuestro país tiene el segundo lugar en prevalencia de obesidad en adultos y estos datos son muy importantes, ya que el sobrepeso y la obesidad son factores de predisposición para desarrollar diabetes gestacional.

Además, se ha reportado que mujeres que nunca padecieron alguna enfermedad metabólica, es decir mujeres con un buen estado de salud, desarrollan diabetes durante el embarazo, por lo que la incidencia incrementa más allá de los casos ya diagnosticados.

Este tipo de diabetes pone en riesgo la salud de la madre, ya que las mujeres con diabetes gestacional tienen un mayor riesgo de presentar complicaciones del embarazo como preeclampsia (hipertensión que se desarrolla después de la semana veinte de embarazo), trauma obstétrico o mortalidad perinatal entre otras.

«La Federación Internacional de Diabetes ha reportado que hasta el año 2017, uno de cada seis nacimientos es afectado por la diabetes gestacional»

Efectos en los hijos de madres con diabetes gestacional

En los años treinta (siglo pasado), se observó que madres con diabetes gestacional daban a luz a hijos con una talla y peso altos, a este fenómeno

se le conoce como "macrosomía neonatal", que es el resultado del ambiente fetal rico en glucosa. En 1952 el epidemiólogo Jorgen Pedersen propuso que la elevada concentración de glucosa en sangre de la madre embarazada cruza la placenta, lo que provocaba hiperinsulinemia y excesivo crecimiento fetal.

Posteriormente, en 1980 el doctor Norbert Freinkel planteó que el incremento de carbohidratos, como la glucosa, así como concentraciones alteradas (en exceso o deficiencia) de aminoácidos, lípidos, proteínas, cetonas y posiblemente otros nutrientes presentes en el ambiente intrauterino, inducen alteraciones en el desarrollo. En la etapa pre- y post-natal temprana, el producto es completamente dependiente de los nutrientes suministrados por su madre y es, por lo tanto, susceptible de padecer alteraciones con consecuencias a corto y largo plazo.

Por ello, es que durante la gestación y la lactancia se lleva a cabo un rápido crecimiento de todos los tejidos, lo que requiere de procesos de proliferación, migración y organización celular, además, se establecen las vías de regulación metabólica. Al respecto, diversos órganos entre ellos el páncreas, el riñón, el corazón y el hígado, así como el sistema nervioso central y periférico, durante estas etapas, son susceptibles a ser modificados por diversos factores ambientales, entre ellos, los nutricionales. Se han realizado diversos estudios en animales de experimentación que corroboran estos efectos.

En humanos, los hijos de madres que tuvieron diabetes gestacional, presentan alteraciones metabólicas como intolerancia a la glucosa, hipo- o hiper-insulinemia -bajos o altos niveles de insulina, la hormona producida por el páncreas que regula la cantidad de glucosa en sangre-, lo que puede lle-



Esta tesis contó con el apoyo financiero del CONACYT Becaria 329420, de la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (A.S-M 2019) y del Fondo de Investigación en Salud-IMSS (FIS/IMSS/PROT/G17-2/1744).