



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“EFECTO DE LA DIABETES MATERNA SOBRE
EL DESARROLLO DEL PANCREAS FETAL
DE RATA”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LIBORIO MORAN ZANABRIA

Directora de Tesis:

Dra. María Cristina Revilla Monsalve.

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Datos del Jurado.

1. Morán
Zanabria
Liborio
57 66 47 06
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
096130090
2. Dra.
María Cristina
Revilla
Monsalve
3. Dr.
Sergio Agustín
Islas
Andrade
4. M en C.
Miguel Ángel
Palomino
Garibay
5. Dra.
Elvira
Estrada
Flores
6. Dra.
Patricia
Rivas
Manzano
7. Efecto de la Diabetes materna sobre el
Desarrollo del páncreas fetal de rata.
87 p.
2006

*"El que no cree en sí mismo,
miente siempre"*

FEDERICO NIETZSCHE.

*"Aquello que no ha sido elegido
por nosotros no podemos
considerarlo ni como un mérito
ni como un fracaso."*

MILAN KUNDERA

*"Si el hacha pierde su filo,
y no se vuelve a afilar,
Hay que golpear con más fuerza.
El éxito radica en la acción
sabia y bien ejecutada."*

ECLESIASTÉS 10:10

*"Solamente un espíritu superficial
puede quedarse con la misma hipótesis,
pues se derrumba al menor análisis."*

ERNESTO SABATO

*"De todo lo escrito, sólo aprecio
lo que uno ha escrito con sangre.
Escribe con sangre y sabrás
que la sangre es espíritu."*

F. NIETZSCHE

NO SÉ POR QUÉ...

No sé por qué te quiero, tierra mía
pero daría por ti la vida entera,
y mi premio mejor morir sería
defendiendo tu nombre y tu bandera.

Yo te quiero tribal u organizada
en demócrata pueblo, unido y fuerte.
Te amo, México, hermoso y codiciado;
tuyo seré en la vida y en la muerte.

Yo no sé si soy mixe o totonaca,
si chamula yo soy o zapoteca,
si soy yaqui, chontal, tarahumara;
si soy triqui, tarasco o simple azteca.

Mucho tengo del indio chichimeca;
también me precio de que soy tlahuica;
de ser del pueblo maya o tolteca,
pero ser como soy... me identifica.

Adoro al Sol, señor que da la vida;
amo al viento y al agua, de tal suerte,
que adoro a la creación con su grandeza
y amo al fuego, a la tierra y a la muerte.

Amo en la guerra al dios Huitzilopochtli
que me hace un vencedor en la pelea;
a Quetzalcóatl lo adoro con el arte,
con la ciencia, la danza y con la idea.

Mis pies en los caminos tienen alas;
mis manos, sabias son para el tejido;
todo el orbe lo plasmo en mis bordados
y en cerámica soy un entendido.

Conozco el tiempo, tallo piedras finas;
conozco de los astros los espacios,
cultivo mil chinampas, y primores
he esculpido en los templos y palacios.

Soy venado bailando "La Pascola";
en Papantla soy pájaro en las brumas;
Soy quetzal o vistoso rehuete
y en Oaxaca soy ritmo con "La Pluma".

Soy conchero bailando "Los Chanchanes";
en Pátzcuaro, viejito con anhelo;
soy palomo, jarabe y huapango;
soy redoba y soy brinco en el chinelo.

Amo a mis cordilleras lujuriosas;
amo el valle, al desierto, a la llanada.
Amo a las tempestades que amedrentan
y amo la placidez de la alborada.

Amo al indio, mi hermano, que en los hechos
por fin desea encontrar en su existencia,
la conquista de todos sus derechos
en un ambiente de cultura y ciencia.

Yo te amo, ¡Oh Patria de los Moctezumas!
Suelo hurraño, magnífico y fecundo;
y te amo por que sí, porque eres mío
y yo soy tuyo ante la faz del mundo.

Yo te amo por ser barro de tu suelo,
porque siempre vas en mi memoria
y porque tú, mí México querido,
¡eres un pedacito de la gloria!

México, vivo estás y estarás vivo
con tu águila venciendo a la serpiente,
ornada con laureles de victoria
y en libertad viviendo eternamente.

Patria mía, la grandeza es tu destino
y que asentado quedé ya en la historia,
que unidos lograremos la victoria.
¡Juventud, emprendamos ya el camino!

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser el gran pilar de mi formación académica; por todo lo que implica el gran nombre de ésta institución, tu diversidad de conocimientos y por ello, tu diversidad cultural, gracias por dejarme pertenecer a tu Historia!!!

Al Dr. Sergio Islas Andrade y la Dra. Ma. Cristina Revilla Monsalve, por dejarme pertenecer a su inigualable equipo de trabajo, por haberme designado este trabajo tan interesante; por su apoyo en los pros y contras para la propia realización de ésta tesis. Gracias .

Al M. en C. Miguel Ángel Palomino Garibay, por el haberme demostrado que la Biología del Desarrollo es una disciplina emocionante y enriquecida; que conjunta a todas las ramas de la Biología. Gracias, por tu gran dedicación a la investigación, y a la forma de entenderla.

A la Dra. Elvira Estrada Flores por su tiempo y dedicación para la revisión de este trabajo, por su aportación sobre el entendimiento de la embriología animal, y por sus conocimientos en el campo de la Histología que dedica con entusiasmo en sus clases de ésta disciplina a los alumnos de la Facultad.

A la Dra. Patricia Rivas Manzano por su dedicación y tiempo para la revisión de éste trabajo, por su aportación sobre las técnicas de histología aplicadas en éste estudio y por sus comentarios con respecto a la descripción de la biología del desarrollo, Gracias.

A la M. en C. Elidía Loredo Núñez, en primera, por dejarme ser tu amigo, por la paciencia que tuviste hacia mi persona y por haberme compartido en la práctica tus conocimientos. Gracias, por ser como eres, Eli.

A la Biól. Graciela Quezada Escobar, por tu apoyo incondicional, por tu amistad, por no dejarte vencer, por ser un ejemplo para mí.

A los pasantes de Biología: Mario, Iris y Elena por su amistad, a seguir con sus proyectos de vida y que alcancen con éxito sus metas que se han establecido.

A mis demás compañeras de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas (UIMEM) del Centro Medico Nacional Siglo XXI: Monste, Isis, Brenda, Paty, Gaby, Consuelo, Yazmín, Reme, Lolita y Ale; gracias por compartirme momentos tan gratos en el laboratorio, hubiera sido aburrido sin contar con ustedes.

Dedicatoria

A mis padres:

Liborio y Rosario, aquí esta el resultado de su gran apoyo, gracias por obsequiarme la vida y la forma en que la he disfrutado, sé que soy muy dichoso al pertenecer a esta gran familia, y por ser, las dos fuentes de sabiduría que Dios puso en mi camino, muchas, pero muchas gracias, ... Los quiero.

A mi hermano:

Jesús, gracias por ser un aliado en mi gran camino por la vida, sin ti hubiera sido muy aburrido, gracias por tu apoyo, comprensión, y alegría, muy pronto te veré sacando provecho a esa gran creatividad que tienes, Diseñador...!!!

A mis Abuelos:

Liborio y María, Por ser los dos grandes pilares de la familia: Morán Aguilar, por su gran lección de vida: su humildad y sencillez, por su gran amor que envuelve a toda la familia. Los años siguen pasando abuela pero no te dejes vencer; la vida es para disfrutarse y no se podría disfrutar del todo sin tí, Ánimo...!!!, Abuelo: Finish...!!!

A ti Mamá María:

Por ser y seguir siendo como mi segunda madre, gracias por todo lo que me has enseñado, por tu gran lucha en la vida, por demostrarnos a todos la gran mujer que eres y por tu amor que compartes con todos nosotros.... mil gracias!!!

A mis Tíos(as):

A los que pertenecen a la Familia Morán y a la Familia Sanabria, serán muy distintos en su forma de ser, pero, todos tienen algo en común, ser hombres de provecho y sobre todo exitosos, con familias envidiables, y me servirán de inspiración cuando forme la mía propia, gracias por su apoyo y por su cariño.

A mis primos(as):

Los mayores: A los de la familia Ortega Sanabria, a las de la familia Sanabria Marín, Sanabria Figueroa y Prado Morán por el apoyo que me dieron, ese entusiasmo que me brindaron para llegar a esto, gracias, por todos los momentos que he vivido con ustedes y a echarle ganas con sus familias y nuevos integrantes.

A **Elizabeth, Zaira y Víctor**, por ser para mí como hermanos gemelos (por llevarnos tan poco tiempo de vida) por acompañarme en este camino, esto es un tributo para ustedes, por el gran cariño que les tengo, por los grandes momentos que hemos tenido desde la niñez, y los que vendrán...!!! sólo recuerden que aquí estoy para todo lo que se ofrezca, y no, no me voy a casar pronto...!!!

Los que nos siguen: a **Miguel, César, Nancy, Alma, Cristian, Melina, Laksmi, Carlos, José Luís y Adni**; a mis sobrinos: **Concepción y José Maximino**, No seré un buen ejemplo a seguir, pero ustedes que ya empezaron y empezarán a construir su propio camino, a echarle ganas, es difícil, pero sólo con constancia y coraje lo lograrán..... si se puede !!!

ya los veré...

A mis Amigos(as):

A la Familia Ruiz Aceves:

Que ha estado conmigo y con mi familia desde hace mas de 20 años, gracias por su amistad a todos los que la integran: a Lupita, a Pepé, Silvia y Vanesa, a Jaime y a su familia, espero que sigamos siendo buenos amigos como lo hemos hecho todos estos años, gracias por su apoyo.

Karla:

Aunque no te tengo presente físicamente, se que estas ahí cuando te necesito, y por haberme brindado momentos tan agradables en la primaria y en la secundaria, por el coraje que te caracteriza, gracias por tus cartas y por tu gran amistad, que dure toda la vida!!!

Los de la Facultad:**Marcela:**

A tí futura Maestra en ciencias, por ser una guía en mi camino, al enseñarme a nivelar la responsabilidad y la diversión, por ser una persona excepcional, que has logrado todas las metas que te has propuesto, gracias por tu amistad.

Araceli:

Por ser una hermana para mí, gracias por tus consejos, por dejarme recargar en tu hombro cuando lo necesité, por tu gran amistad, y sé que le vida te agradece ser así con las personas, por eso, te mando ese delicado regalo: Uriel... Cuídalo!! Y ya... aplicate!!!

Rosa:

Por ser para mí una persona admirable, muchos no te conocen y te juzgan superficialmente, pero se equivocan, eres la mujer mas fuerte y constante que conozco, échale más ganas, que los frutos de tu esfuerzo ya se han abierto, sigue con tú interesante trabajo, Bióloga pesquera.

A Carlos, Everardo y Ángel :

Hermanos, por todos esos momentos que pasamos en la Facultad, en las prácticas de campo, chido, por las conversaciones de gran variedad, gracias. Sigán con sus proyectos de investigación que ya falta poco.

A Aimée, Sandra y Tania:

A ustedes, que las conozco desde que entre a Biología, gracias por su gran apoyo, muy distintas en el carácter y a lo que se dedican, pero en el fondo unas personas de sentimientos puros, que..., también me ayudaron en momentos difíciles, se les agradece con el corazón.

Y a: **Ana, Astrid, Diana, Erandi, Ismael, Jacsani, Mariana, Miriam, Mirsa, Norma**, a los físicos (**Alejandro Anuar, Erick, Ismael, Mario y Víctor**) por esos grandes momentos de reunión, los fines de semana, chido... por las conversaciones y los debates que vivimos y que seguiremos teniendo... no?

Y... demás compañeros que tuve el agrado de conocer durante mi estancia en la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

*Mientras más sabiduría, más problemas;
Mientras más se sabe, más se sufre.*

Eclesiastés 1:18.

INDICE

RESUMEN	1
I.- ANTECEDENTES	3
1.1 Diabetes mellitus.....	3
1.2 Clasificación.....	4
1.2.1 Diabetes Gestacional.....	5
1.2.2 Causas y consecuencias.....	5
II BIOLOGIA DEL PANCREAS	6
2.1 Anatomía e Histología.....	6
2.2 Páncreas exócrino.....	7
2.3 Páncreas endocrino.....	8
2.4 Desarrollo del páncreas.....	10
2.4.1 Morfogénesis del páncreas.....	10
2.4.2 Diferenciación celular y crecimiento.....	12
2.5 Insulina.....	16
2.5.1 Señalización celular y regulación.....	19
2.5.2 Amilina	20
2.5.3 Glucagon.....	21
2.5.3.1 Señalización celular y regulación.....	21
2.5.3.2 Glucagon y diabetes.....	24
2.5.4 Somatostatina.....	25
2.5.4.1 Señalización celular y regulación.....	25
2.5.5 Polipéptido pancreático (PP).....	26
2.5.5.1 Señalización celular y regulación.....	26
2.5.6 Grelina y su señalización celular.....	26
III DIABETES EXPERIMENTAL	28
3.1 Modelos Animales.....	28
3.2 Modelos de diabetes espontánea.....	28
3.3 Modelos de diabetes inducida.....	30
3.3.1 Inducción quirúrgica.....	30
3.3.1.1 Pancreatectomía.....	30
3.3.2 Inducción hormonal.....	31
3.3.2.1 Dexametasona.....	31
3.3.3 Inducción viral.....	32
3.3.4 Inducción química.....	32
3.3.4.1 Estreptozotocina.....	33
3.3.4.2 Mecanismo de acción.....	34
IV DIABETES Y DESARROLLO	36
4.1 Diabetes inducida y desarrollo.....	36
4.2 Desarrollo del páncreas y diabetes inducida.....	38

V JUSTIFICACION.....	39
VI HIPOTESIS.....	39
VII OBJETIVOS.....	39
7.1 General.....	39
7.2 Particulares.....	39
VIII MATERIAL Y METODO.....	40
8.1 Animales.....	40
8.2 Grupo Experimental.....	40
8.3 Parámetros bioquímicos.....	41
8.4 Análisis estadístico.....	41
8.5 Microscopia de Luz.....	41
8.6 Inmunohistoquímica.....	42
IX RESULTADOS.....	43
9.1 Peso.....	43
9.2 Glucosa.....	44
9.3 Química sanguínea.....	45
9.3.1 Glucosa sérica.....	46
9.3.2 Colesterol.....	46
9.3.3 Triglicéridos.....	47
9.3.4 VLDL	48
9.4 Fetos.....	49
9.4.1 Peso.....	49
9.4.2 Talla.....	50
9.4.3 Anomalías congénitas.....	51
9.5 Descripción del páncreas fetal.....	52
9.6 Inmunohistoquímica para insulina.....	58
X DISCUSION.....	63
XI CONCLUSIONES.....	73
XII REFERENCIAS.....	74
XIII ANEXOS.....	84

RESUMEN

Se determinó el efecto de la diabetes materna, inducida con estreptozotocina (STZ) sobre el desarrollo del páncreas fetal a los: 15, 17, 19, y 21 días de gestación y 1er. día de vida extrauterina (1d.V.E.U.). Se utilizaron 13 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 200-300g. Se aparearon con machos de fertilidad comprobada toda una noche, a la mañana siguiente la presencia del tapón vaginal y/o espermatozoides determinó a este como el 1er. día de gestación. Se dividieron en dos lotes: Lote Experimental (LE) compuesto de 8 ratas, a las que se les administró ip. 50 mg/kg de peso de STZ en amortiguador de acetatos a 0.1M pH 4.3. Se consideraron diabéticas aquellas que presentaron niveles de glucosa ≥ 200 mg/dl, 48 hrs. después. Lote Control (LC) compuesto de 5 ratas, que se les administró ip. amortiguador de acetatos a 0.1M pH 4.3.

Durante la gestación a las madres gestantes se les determinó glucosa sanguínea y peso corporal cada tercer día hasta el día de sacrificio. Las ratas de los dos lotes fueron sacrificadas los días: 15, 17, 19 y 21 de gestación y 1d.V.E.U. Se obtuvo la sangre total de la aorta, se extirparon el páncreas y los dos cuernos uterinos; se determinó el número de reabsorciones y de fetos y el número de crías. De cada camada se determinó peso y talla a cada feto ó cría. De los productos se obtuvo el páncreas que fue procesado mediante las técnicas de histología convencional utilizando las tinciones de H/E y Gomori para su posterior observación con microscopia de luz. La síntesis de insulina se determinó mediante inmunohistoquímica utilizando la técnica de marcaje con doble anticuerpo; en la que se utilizó como anticuerpo primario el Anti-Insulina Ab-6 de Neomarkers (Lab Vision®), y como segundo anticuerpo un anti-conejo acoplado a HRP⁺(Dako®).

Durante la gestación el peso de las ratas del LE fue menor que el del LC, y esta disminución fue significativa para los últimos días de gestación 19 y 21 (LC vs. LE $p < 0.05$). Los niveles de glucosa fueron significativamente altos a las 48 hrs. después de la administración de STZ en el LE ($p < 0.001$), considerando un estado hiperglucémico durante la gestación. Niveles de glucosa sérica, colesterol, triglicéridos y VLDL fueron mayores en el LE en comparación del LC en los tiempos estudiados. Los niveles descendieron después del parto para el colesterol, triglicéridos y VLDL, mientras que los niveles de glucosa sanguínea y sérica disminuyeron, aunque representaron valores hiperglucémicos. El peso y la talla promedio de fetos y crías de madres del LE fueron significativamente menores que los que presentaron los de madres del LC en los días 15, 17, 19, 21 de gestación y 1d.V.E.U. ($p < 0.001$).

La diferenciación del páncreas presentó un retraso durante el desarrollo fetal que fue más evidente en el día 15 de la gestación: manifestándose como asociaciones de células pre-ductales sin ramificación, además de gran cantidad de mesenquima y observándose que los primordios pancreáticos no se habían fusionado aún; en el día 17 de gestación: las asociaciones celulares pre-ductales apenas iniciaron su fusión para formar los ductos pancreáticos, en ésta etapa las asociaciones pre-acinares presentaron un retraso de diferenciación en comparación con el LC. En el día 19 de gestación en LE las células acinares iniciaron su diferenciación y formaron agrupaciones tipo acinos, mientras que en LC los acinos ya se habían estructurado y se observaron diversas agrupaciones de células endocrinas. A los 21 días de gestación en el LC, los acinos presentaron su conformación acino-lobular, las agrupaciones endocrinas incrementaron y claramente se observan agrupaciones tipo-islotas, mientras que en el LE estas asociaciones son pequeñas y escasas.

En el 1d.V.E.U. tanto en el LC como en el LE se observaron islotes totalmente estructurados aunque en el LE aún están presentes entre la masa acinar pequeñas estructuras tipo-islote.

El estudio inmunohistoquímico reveló: una reacción positiva a insulina en el día 15 de gestación, que fue más evidente en el LE, que en el LC en el que se presentaron escasas células positivas a insulina entre la masa de células epiteliales pre-ductales.

En el día 17, en el LE se observó un aumento de células positivas a insulina, mientras en el LC las células positivas a insulina fueron escasas. En el día 19 de gestación, la reacción positiva a insulina fue más evidente en los páncreas fetales del LC y se presentó una disminución de células positivas a insulina en los páncreas del LE. Esta disminución persistió hasta el día 21 de gestación en los páncreas del LE, siendo considerablemente baja con respecto al LC. Después del parto, en 1dV.E.U. se presentó la misma alteración, con una disminución drástica en la reacción positiva de insulina en los páncreas de crías del LE. Las agrupaciones tipo-islote presentaron una baja positividad a insulina en el LE, y se presentó un incremento de la masa celular β .

La diabetes materna severa inducida con STZ en ratas, ocasionó un retardo en la morfogénesis del páncreas evidenciado por: la fusión de primordios pancreáticos posterior al día 15, presencia de epitelio preductal y mayor masa mesenquimatosa en el día 17, ausencia de agrupaciones tipo islote en el día 19, menor cantidad de células endocrinas en las agrupaciones tipo islote en el día 21, atraso en la formación de islotes en 1d.V.E.U; mayor inmunopositividad a insulina en los páncreas de fetos de 15 y 17 días y menor inmunopositividad a insulina en los páncreas de fetos de 19, 21 días de gestación y crías de 1d.V.E.U.

I ANTECEDENTES

1.1 Diabetes mellitus

La Diabetes mellitus es una enfermedad crónica progresiva caracterizada por un nivel de glucosa elevado como denominador común; debido a la carencia absoluta o relativa de insulina, el sujeto sufre de alteraciones en casi todos los tejidos del organismo; complicaciones serias pueden desarrollarse tales como afección cardiaca en las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica, neuropatía y es siempre fatal si no es tratada (1).

Los efectos tempranos de la hiperglucemia producen cambios en células vasculares que incluyen alteraciones hemodinámicas, disfunción endotelial, activación de células inflamatorias y cambios en la expresión de factores vasculares y neurotróficos. Estos, son en sí, los primeros cambios biológicos y bioquímicos que ocasionan efectos patológicos específicos tisulares debido a la propia necesidad fisiológica del organismo (2).

El número de personas con diabetes está incrementado debido al crecimiento poblacional, aumento de la edad de vida y el incremento en la prevalencia de la obesidad y el sedentarismo (3). Para el año 2000, el número de casos de Diabetes a nivel mundial fue de 171 millones de personas. La Federación Internacional de Diabetes estimó que en el año 2003 la cifra fue en aumento, se presentaron 194 millones de casos y para el 2030 la cifra aumentará a 334 millones de casos, 140 millones de personas más, serán diabéticas (4).

En México este padecimiento se ha convertido en uno de los principales problemas de salud. El 10% de la población mexicana padece o está propensa a sufrir esta enfermedad. En el año 2002 murieron cerca de 53 mil personas por enfermedades relacionadas a la Diabetes, ubicándose como la segunda causa de muerte en el país (5).

La tendencia de esta cifra es cada vez mayor por la urbanización desacelerada en países en desarrollo como el nuestro, que se asocia con el aumento en el consumo de la dieta alta en grasa, la disminución de la actividad física y otros factores como el estrés (4).

Para el año 2003, un estudio de la Secretaria de Salud, concluyó que esta enfermedad es ahora la primera causa de muerte entre los mexicanos; además de ser uno de los países con mayor prevalencia de diabetes tipo 2, se calcula que ocupa el décimo lugar, y que en tan sólo 20 años ocupará un nada prestigioso séptimo lugar a nivel mundial (1,5).

Por tratarse de un padecimiento incurable, los diabéticos deben recibir tratamiento durante toda su vida (6), pero una pequeña fracción de los afectados acude regularmente a los servicios de salud y de éstos entre 25 y 40% tienen un control metabólico de la enfermedad (6, 7).

Los costos indirectos y directos de la enfermedad en nuestro país son de 330 y 100 millones de dólares anuales, respectivamente. Un niño de 7 años que desarrolle diabetes deberá afrontar un costo acumulado de 52 mil dólares hasta los 40 años como consecuencia de la enfermedad (7).

1.2 Clasificación

La hiperglucemia por si sola no define la enfermedad, pero en la práctica cualquier trastorno que produzca elevación de glucosa plasmática después del ayuno tiende a denominarse Diabetes mellitus. Está determinada genéticamente y ocasiona alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, junto con la deficiencia en la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a ésta (1). La diabetes no sólo es la simple elevación de glucosa; sino un síndrome que debe considerarse desde el punto de vista integral.

Existen al menos 4 grandes tipos de esta enfermedad (3):

Diabetes tipo 1:

Anteriormente conocida como Diabetes tipo I ó Diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM), que se presenta en pacientes con destrucción autoinmune de las células β del páncreas, por lo cual el cuerpo no produce insulina. Ocurre principalmente en niños y adultos jóvenes. Las personas con diabetes tipo 1 deben aplicarse inyecciones de insulina diariamente para mantenerse vivas. La diabetes tipo 1 representa de 5 a 10% de los casos.

Diabetes tipo 2:

Anteriormente conocida como diabetes tipo II o Diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM) que incluye pacientes que muestran tanto un defecto en la secreción de insulina como una deficiente acción de la hormona a nivel tisular. Es la forma más común de la enfermedad, representando entre 90 y 95% de los casos de diabetes. Este tipo, está asociado con el envejecimiento, la obesidad, historia familiar de la enfermedad, historia previa de diabetes durante el embarazo, intolerancia a la glucosa, inactividad física y la raza o etnicidad. Este tipo, en los últimos años, se está presentando tempranamente en niños y adolescentes.

Diferentes tipos de Diabetes:

Incluye ciertos defectos genéticos a nivel celular, en particular a las células β del páncreas que son heredados en forma autosómica dominante; o a nivel molecular sobre la estructura de la insulina, por enfermedades del páncreas exócrino, o por infecciones o síndromes asociados a la enfermedad. Estos tipos de diabetes ocurren en 5% de los casos diagnosticados.

Diabetes gestacional:

En este caso, el efecto de la insulina es bloqueado parcialmente por hormonas antagonistas producidas por la placenta. Se desarrolla en 2 a 5% de las embarazadas. Las mujeres que han tenido diabetes durante el embarazo tienen un riesgo más alto de desarrollar diabetes más tarde (1,3).

1.2.1 Diabetes Gestacional

La diabetes gestacional se define como la intolerancia a los carbohidratos en grados variables, acompañada de alteraciones en las concentraciones de aminoácidos y lípidos; que se inicia o reconoce durante la gestación, independientemente de que se requiera o no de insulina y persista una vez que se concluya el embarazo (8).

La prevalencia mundial oscila entre el 1 y 14% dependiendo de la población y la metodología para estudiarla (8). En México, se ha propuesto que es un problema grave, la prevalencia oscila entre el 1.2 y 16.7% según diversos autores. En un estudio que se realizó en el año 2000 en la región occidente del país (Aguascalientes, Colima, Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Nayarit) la prevalencia fue de 2.5% (1).

1.2.2 Causas y Consecuencias

Los estudios epidemiológicos en mujeres gestantes presentan resultados variables debido a la influencia de la raza, la región geográfica y la predisposición genética. No obstante, los dos factores que acompañan a la diabetes gestacional parecen ser la edad y la obesidad. Algunos investigadores postulan que las mujeres mayores de 25 años de edad con más del 20% de su peso normal o con un índice de masa corporal mayor de 27 tienen un riesgo mayor que mujeres sanas (1, 8).

Diversos estudios muestran una gran variedad de anomalías sobre la asociación madre-feto, estas anomalías originan cambios diversos, pero tienen en común, ser consecuencia de la hiperglucemia materna (9).

Entre las anomalías maternas, las más frecuentes son: los procesos hipertensivos (18%), la cetoacidosis (9.3%), pielonefritis (4.3%), el polihidramnios (15.7%) y el parto pretérmino (9.5%). La frecuencia total de cesáreas (41.5%) y la mortalidad materna de 0.11% (1). Mientras que en el producto, el desorden hiperglucémico está asociado con altas tasas de mortalidad perinatal, macrosomía, trauma en el nacimiento, hiperbilirubinemia e hipoglucemia neonatal (9, 10).

El mayor problema de los hijos de madres diabéticas es la prevalencia (dos a tres veces mayor) de anomalías congénitas. Los defectos congénitos son en la actualidad la causa principal de mortalidad perinatal y contribuyen en un 20% a 50% al total de las pérdidas perinatales (10). Los defectos congénitos más frecuentes afectan al corazón y los sistemas nervioso y esquelético (11).

II BIOLOGÍA DEL PÁNCREAS

2.1 Anatomía e Histología

El páncreas es una glándula accesoria asociada al aparato digestivo, la cual, al igual que el hígado, secreta sustancias hacia la primera porción del intestino delgado para la degradación de los nutrientes y hormonas implicadas en la regulación metabólica del organismo (12, 13). Es un órgano que se ubica en la curva del duodeno en forma de C, y está conectado a éste por la Ampula de Vater, donde el ducto pancreático se une con la bilis. En humanos su peso es de 65 a 120g y una longitud de 20 a 25 cm. (13), (Figura 1). Es una glándula anticrina; es decir, está compuesta de tejido glandular exócrino y endocrino. No posee cápsula fibrosa definida, sin embargo, está rodeado por una capa de tejido conectivo laxo, el cual se introduce hacia el tejido dividiéndolo en lóbulos (14).

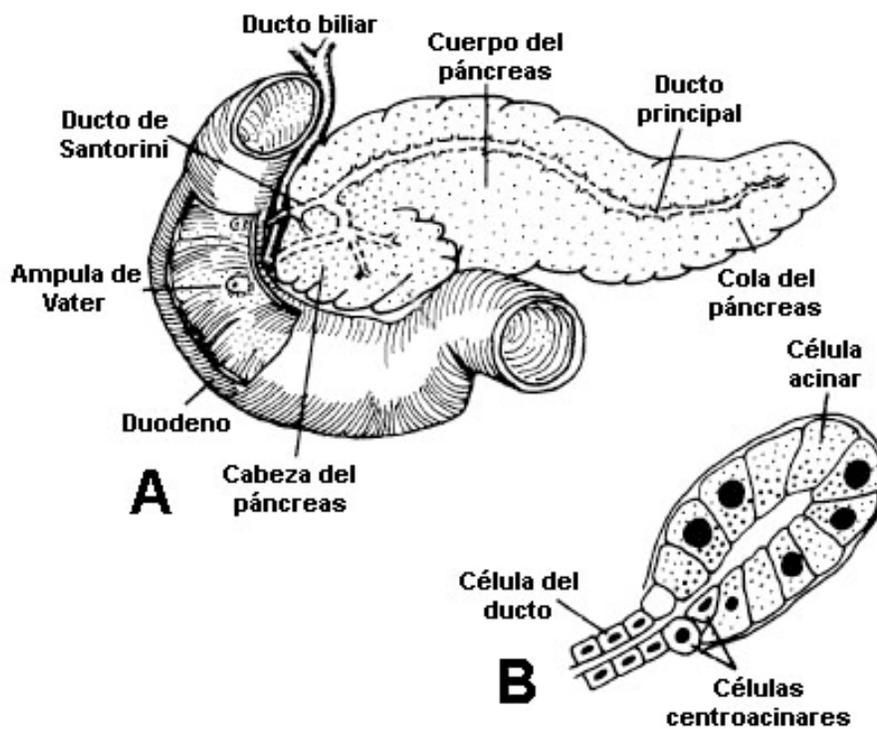


Figura 1. A) Anatomía del páncreas adulto. **B)** Histología de un acino pancreático (15).

El abastecimiento arterial en el páncreas se origina de las arterias esplénica, hepática y mesentérica, el drenaje venoso se da por las venas esplénica y mesentérica (14).

Se presentan fibras nerviosas adrenérgicas y colinérgicas en los dos tipos de tejido pancreático, exócrino y endocrino (16).

El páncreas en los mamíferos consiste de tres compartimientos epiteliales principales: el sistema ductal, las células exócrinas acinares y células endocrinas. El sistema ductal se ramifica delicadamente y conduce las proenzimas digestivas producidas por el tejido exócrino acinar hacia el duodeno. Los ductos pancreáticos se caracterizan por ser lineares con células epiteliales columnares y en los grandes ductos, se presentan células globosas similares a las del intestino (12).

La porción exócrina del páncreas produce enzimas digestivas y un fluido pancreático para la digestión de los alimentos; está conformado como una glándula compuesta tubuloacinar, semejante a las glándulas salivales (12).

La porción endocrina consiste de tejido aislado en forma esférica disperso entre la gran masa del páncreas exócrino, fue inicialmente descrito por Langerhans en 1869. Debido a su forma y a su descubridor son comúnmente llamados islotes de Langerhans (13).

2.2 Páncreas Exócrino

La porción exócrina del páncreas consiste de tejido tubulo-acinar. Los acinos son redondos formados por 4 a 8 células epiteliales cúbicas o piramidales (Figura 2), que producen enzimas digestivas incluyendo proteasas, amilasas, lipasas y nucleasas; muchas de éstas secretadas como precursores inactivos e inician su actividad después de que entran al duodeno (13). Se concentran en la parte apical de la célula acinar dentro de gránulos de secreción, presentan retículo endoplásmico rugoso y un prominente aparato de Golgi (12). (Figura 1B). Esta glándula exócrina segrega el jugo digestivo que contiene grandes cantidades de iones de sodio y bicarbonato que neutralizan el material ácido que entra al intestino delgado desde el estómago (13, 16).

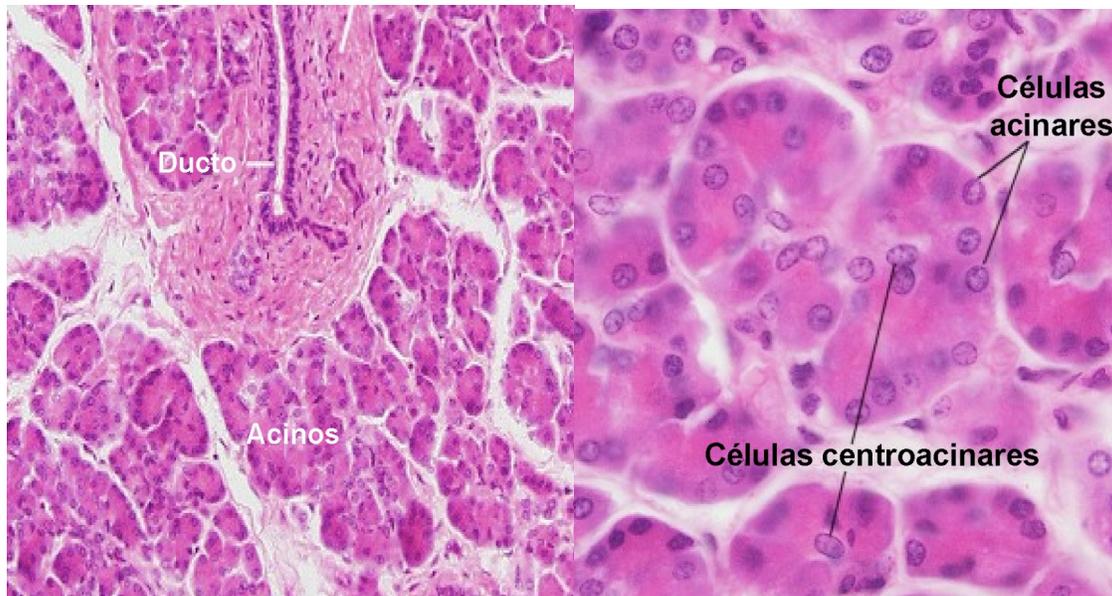


Figura 2. Microfotografías del páncreas exócrino (17).

La secreción enzimática del páncreas exócrino está bajo un control múltiple. Los impulsos neurales son transmitidos por la acetilcolina. Las señales hormonales son iniciadas por el contenido del duodeno (péptidos, aminoácidos, ácidos grasos), que causan la liberación de colecistocinina en el intestino (13). Otras hormonas como la secretina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), estimulan la secreción pancreática, proenzimas y agua. Al igual que de forma paracrina, el polipéptido pancreático (PP) regula la secreción enzimática (16).

2.3 Páncreas Endocrino

Los islotes de Langerhans se encuentran dispersos en todo el páncreas, están compuestos de células epiteliales dispuestas en cordones, entre ellos hay una red de vasos sanguíneos y están separados de los lóbulos vecinos por una fina cápsula de fibras reticulares (18).

El papel que juega el páncreas endocrino es el de mantener un nivel constante de glucosa en sangre y facilita el almacenamiento celular del material alimentario después de una ingestión de comida, provee también la movilización de estos sustratos durante periodos de ayuno (16). Por medio de técnicas histológicas con rojo neutro se estima que se presentan alrededor de 13,500 y 890,000 islotes en el páncreas de rata y humano respectivamente (18). Los islotes de Langerhans en páncreas de rata presentan un rango de 50-400 μ m de diámetro (19). Hasta hoy se han identificado 5 tipos celulares dentro de los islotes de Langerhans, designados como: A ó α , B ó β , D ó δ , F ó PP y E ó ϵ cada una de las cuales segregan una hormona distinta (Figura 3):

Células α :

Son células acidofílicas y argirofílicas, comúnmente grandes, localizadas en la periferia del islote; se encargan de sintetizar el segundo recurso más importante de las hormonas pancreáticas, el glucagon, que es mostrado por técnicas inmunocitoquímicas que es almacenado y secretado por gránulos de alrededor 235 nm de diámetro; estos, insolubles en alcohol. El porcentaje de células α en los islotes varía en los mamíferos dependiendo de la especie, pero su número es menor al de las células β (16, 18).

Células β :

Fueron las primeras células identificadas en los islotes, se localizan comúnmente en el centro del islote, son las encargadas de sintetizar la hormona más importante pancreática: la insulina. Las técnicas de inmunocitoquímica han demostrado que es almacenada y secretada por gránulos de cerca de 300 nm de diámetro, éstos solubles en alcohol. El número de éstas células es mayor que el de las demás células (arriba del 50%), en la rata el porcentaje es del 67% (13, 14). En 1987, se descubrió una segunda hormona sintetizada en este tipo de célula: la amilina, y se cree que tiene un papel complementario al de la insulina (18, 19).

Células δ :

Células que secretan somatostatina. Se distribuyen de igual manera que las células α , en la periferia del islote, pero, su número es muy reducido. En los mamíferos, se presentan dos tipos de somatostatina (SS) en el páncreas, somatostatina 14 (SS14) y somatostatina 28 (SS28) de la cual 14 amino ácidos son idénticos a la forma SS14. Esta hormona inhibe la liberación de insulina, glucagon y polipéptido pancreático (PP) de manera paracrina (14, 16).

Células F ó PP:

Son células que se encuentran al igual que las α y δ en la periferia del islote, son nombradas así, por secretar el polipéptido pancreático (PP), que consiste de 36 aminoácidos. Su tamaño es similar al de las células α (14). Diversos estudios han reportado que es un potente inhibidor de la secreción exócrina pancreática, y no influencia el metabolismo de carbohidratos (16,18).

En el estudio de Elayat y colaboradores se descubrió que en el páncreas de rata se encuentran dos tipos de islotes: uno rico en células α y pocas células PP, en la región gástrica y esplénica del páncreas, mientras que en la región duodénica se encuentran islotes ricos en células PP y pobres en células α (19).

Células E ó ϵ :

Nuevos estudios realizados con microarreglos han revelado un nuevo tipo de célula endocrina dentro de los islotes de Langerhans (20). Estas células se encuentran al igual que las células α , δ y PP en la periferia del islote y secretan una hormona llamada grelina, que se encarga de regular el apetito y la hormona de crecimiento. Se sabe que este tipo de célula es muy común en el estómago pero hace un año se encontró en los islotes pancreáticos (20,21).

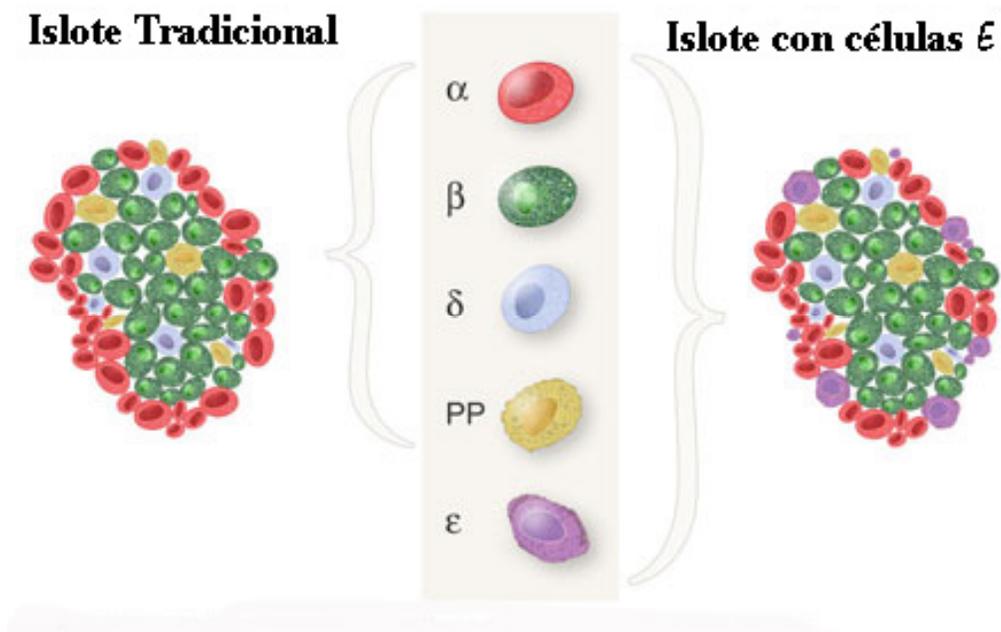


Figura 3: Estructura típica de un islote de Langerhans (22),

Los islotes están irrigados por un extenso laberinto de capilares. Cada islote está normalmente irrigado por 1-3 arteriolas, las cuales abruptamente terminan como capilares y 1- 6 vénulas, dependiendo de la talla del islote (13). Los capilares en los islotes pancreáticos incluyen células endoteliales que están fenestradas para permitir la rápida toma de las hormonas pépticas; y es conocido que los islotes con capilares fenestrados son de 4-7 veces más permeables que los capilares no fenestrados. Los productos hormonales secretados por las células de los islotes dentro del fluido extracelular circundante pueden así atravesar la membrana basal del endotelio antes de que entren al torrente sanguíneo.

La inervación de los islotes pancreáticos es dada por dos tipos de neuronas: las colinérgicas parasimpáticas y neuronas adrenérgicas simpáticas (14).

La estimulación del sistema nervioso parasimpático ocasionan la secreción de insulina e inhibe la secreción del glucagon, el estímulo ocurre en el núcleo del hipotálamo lateral, el núcleo motor del vago, o nervios pancreáticos mezclados. El hipotálamo parece que juega el mayor papel de integración en el balance entre la regulación parasimpática y simpática del islote (16).

2.4 Desarrollo del páncreas.

En los últimos años se ha presentado un mayor interés sobre el estudio del desarrollo pancreático y la forma en como sus células eligen su destino, estableciendo la propia forma del órgano.

Iniciando a partir de una combinación de células progenitoras aparentemente idénticas, el páncreas se transforma a un órgano maduro conteniendo finalmente tres distintos tipos celulares: células exócrinas, células endocrinas y células del ducto (23).

El páncreas se deriva de la capa germinal endodérmica que es formada al final de la gastrulación durante el desarrollo embrionario. Después de la gastrulación, la transición del endodermo desde una capa bidimensional hacia una tridimensional ocurre formando un tubo intestinal que está evolutivamente conservado entre los vertebrados entre los días 9.5–11 pc. en rata (23).

2.4.1 Morfogénesis del páncreas

Durante la embriogénesis, el páncreas se desarrolla desde dos primordios: ventral y dorsal (23, 24). Antes de la especificación hacia un destino pancreático dorsal, la línea media endodérmica es una simple capa de células epiteliales que contacta con la notocorda, una estructura derivada del mesodermo (25).

Lateralmente, el endodermo predestinado para formar el páncreas ventral es adyacente a el mesodermo esplácnico y células epiteliales aórticas y no tiene un contacto directo con la notocorda (25). La notocorda y el endodermo prepancreático dorsal permanecen en contacto hasta cerca del día 10 pc. en rata, cuando la línea media del par de aortas dorsales se fusiona (26), (Figura 4A).

La primera señal de morfogénesis ocurre en el día 11 pc. cuando el mesenquima dorsal se condensa y el endodermo se evagina, formando un primordio dorsal reconocible después del día 11.75 – 12 pc. (26).

En el tiempo de formación del páncreas, la notocorda secreta una variedad de potentes moléculas inductoras, incluyendo el miembro de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β): la activina- β , y el Factor de crecimiento del fibroblasto tipo 2 (FGF2) (27, 28, 29).

Estas moléculas activan la expresión genética pancreática (genes importantes como el del glucagon e insulina) por medio del paro en la expresión de moléculas Sonic Hedgehog (*Shh*) e Indian Hedgehog (*Ihh*), proteínas secretadas en el epitelio prepancreático (30, 31). (Figura 4B).

Así, por medio de esta señalización el desarrollo pancreático ocurre, ya que la represión de *Shh* previene la diferenciación intestinal (28, 32, 33). Las señales a través de las vías de la activina- β y *Shh* también controlan tamaño y forma del páncreas (31).

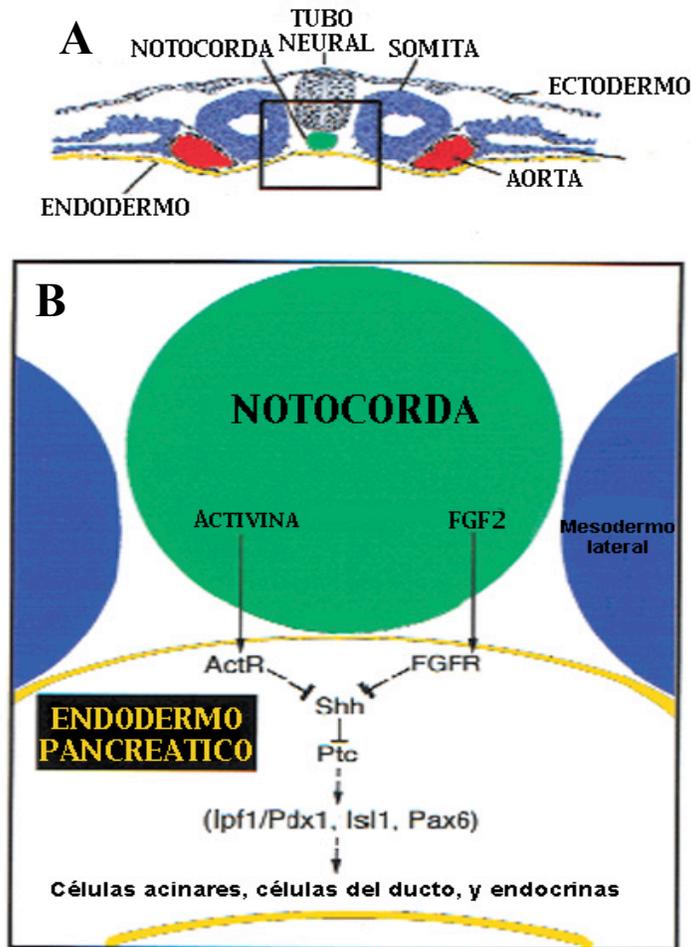


Figura 4. A) Relaciones del endodermo prepancreático y la notocorda con tejidos adyacentes en un corte transversal. **B)** Vías de señalización tempranas que regulan la expresión genética endodermo–pancreática. ActR: Receptor de activina, FGFR: receptor de FGF (33).

La pérdida del señalamiento de activina y *Shh* resulta en una anómala asociación del tejido pancreático con el intestino adyacente y una severa hipoplasia del páncreas dorsal y bazo (26, 29, 30).

En estudios de células en cultivo se ha demostrado que la señalización de *Hedgehog* es requerida para la diferenciación y función de las células β en estados terminales del desarrollo del páncreas (31).

Estudios recientes han demostrado que la proteína homeobox *Hex1* controla la posición de células endodérmicas mas allá del mesodermo cardiogénico y por tanto dicta la especificación del páncreas ventral (34); éste se encuentra adyacente al septum transversum, al mesodermo cardiogénico, venas ventrales (endotelio) y mesenquima que son los encargados de inducir su formación por la vía de moléculas reguladoras (24, 26).

Hoy se sabe, que moléculas de la familia del factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) secretadas desde el mesodermo cardiogénico inhiben la expresión de *Shh* en el páncreas ventral, destinándola como región pancreática y diferenciándola de la región del primordio hepático (34).

2.4.2 Diferenciación celular y crecimiento

Al iniciar su morfogénesis los dos primordios forman una ramificación que predominantemente consiste de mesenquima y epitelio ductal sin diferenciar -Primera transición del desarrollo- (26, 33, 35), (Figura 5).

El primordio pancreático dorsal durante el desarrollo formará parte de la cabeza y cuerpo del páncreas y al ir creciendo alcanzará el bazo ocasionando la formación de la cola del páncreas, mientras el páncreas ventral contribuye únicamente a la formación de la cabeza del órgano (15). Durante el desarrollo el páncreas dorsal excede en talla al páncreas ventral (35). La posición de la vena porta ayuda a discernir entre la parte pancreática de la cabeza derivada del primordio dorsal (anterior a la vena porta) y la parte complementaria de la cabeza derivada del primordio ventral (posterior a la vena porta), (36).

Entre los días 14.5 y 15.5 pc. la rotación del duodeno hacia la derecha desplaza al primordio ventral hasta alcanzar y fusionarse con el primordio dorsal (15, 26, 37), (Figura 5).

Cada primordio pancreático origina un ducto de drenaje. El ducto ventral es llamado ducto de Wirsung, el ducto dorsal es llamado ducto de Santorini. Como los dos primordios se fusionan, este sistema conductor también se fusiona originando un ducto principal pancreático que hace contacto para su vacío junto con el ducto biliar antes de descargar en el intestino (15). El ducto principal termina en el duodeno distalmente y se abre por la papila pancreática (36).

El desarrollo de células exócrinas (acinos y células del ducto) se diferencia hasta el día 16.5 pc. (15, 26, 36). Los gránulos secretorios se forman el día 17 en fetos de rata y son abundantes en áreas citoplásmicas basales del retículo endoplásmico rugoso en el día 18 de gestación (36). En el epitelio linear del ducto y en brotes acinares frecuentemente se puede observar mitosis celular (38).

La diferenciación de células exócrinas desde el epitelio pancreático es dependiente de factores de crecimiento presentes en el mesenquima circundante (39), entre estos se ha encontrado la folistatina (40), un conocido antagonista de señales TGF- β , incluyendo activinas, que promueve la diferenciación celular exócrina y reduce la diferenciación de células endocrinas (41).

Poco después de la organización lobular-acinar, se diferencian numerosos capilares que se forman alrededor de los acinos. Los nodos linfáticos se forman en el tejido circundante; así como numerosos nervios y neuroblastos (15). Mientras avanza el desarrollo, la cantidad de mesenquima dentro del páncreas disminuye y el número de acinos se incrementa; el órgano se hace compacto (36).

Las células endocrinas precursoras están presentes desde muy temprano en el desarrollo del páncreas (11pc.) pero hasta el día 15.5 pc, se sitúan dentro del epitelio ductal después de una extensiva proliferación -Segunda transición del desarrollo- (42), (Figura 5).

En el día 18 pc. las células endocrinas forman agrupaciones tipo islote, los islotes se forman completamente hasta antes del nacimiento 20-21 pc. (15), se remodelan y maduran semanas después del nacimiento (33, 36, 38).

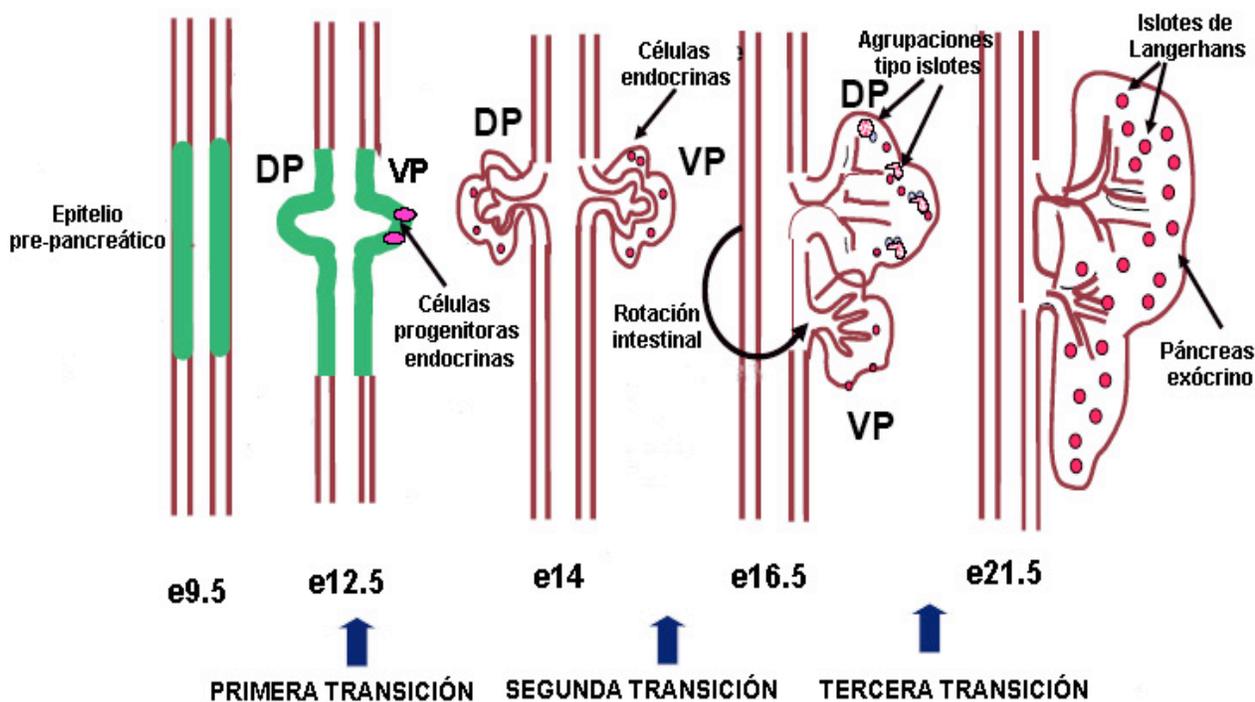


Figura 5. Diagrama esquemático del desarrollo del páncreas. DP: Primordio Dorsal, DV: Primordio Ventral. El número debajo del esquema indica el estado de desarrollo dpc. de rata (33).

En los días 11.5–12pc. las células precursoras endocrinas coexpresan glucagon e insulina que después se dividen en dos linajes celulares diferentes que expresan únicamente glucagon ó insulina (33, 41, 43).

Se ha detectado un estado multihormonal, en donde se pueden encontrar células que secretan insulina y glucagon, glucagon y PP, e insulina y somatostatina (44). Entre el día 15-17 del desarrollo en rata se pueden reconocer las células β por secreción de insulina y la presencia de RNAm de insulina (35). Para el día 16, células secretoras de somatostatina están presentes (45).

Son pocas las revisiones sobre la aparición de células secretoras de PP, algunos autores reconocen que se empieza a secretar entre el día 11-12 pc. en rata (46); mientras otros encontraron que se detecta entre los días 17-19.5 pc. (47).

Para el nuevo linaje de células endocrinas pancreáticas, pocos estudios han revelado su presencia durante el desarrollo; un solo estudio reporta que las células ϵ se presentan desde el día 17 de gestación hasta un mes después del nacimiento (48).

Los islotes se forman en un proceso de múltiples pasos que involucran diferenciación de células progenitoras desde el epitelio pancreático ductal (42), migración de estos precursores a través de la membrana basal dentro del mesenquima circundante (27, 49) y la asociación de células productoras de hormonas para formar islotes maduros (26, 38), por lo que el desarrollo de los islotes es realizado por agregación celular (49).

La migración de las células precursoras de islotes está parcialmente controlada por metaloproteinasas de matriz extracelular (MPME) (26, 27), una gran familia de enzimas que degradan proteínas de matriz extracelular incluyendo colágenas, gelatinas, fibronectinas y lamininas (50), (Figura 6).

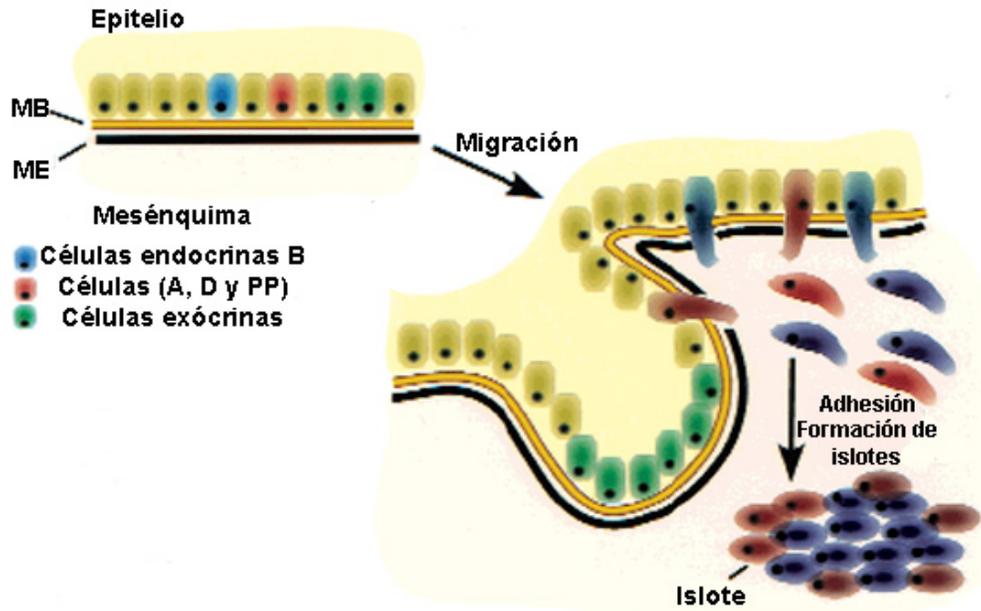


Figura 6. Esquema representando la migración de células endocrinas y la formación de islotes pancreáticos (26).

La actividad de las MPME puede ser regulada por la señalización de TGF- β . En el desarrollo normal en ratón, la ramificación epitelial está claramente disminuida, y los islotes permanecen en estrecha proximidad con los ductos pancreáticos (27).

Además del señalamiento matriz extracelular-célula, las interacciones célula-célula son también requeridas para establecer la arquitectura de los islotes individuales. Estas interacciones son mediadas vía moléculas de adhesión celular dependientes de Ca^{2+} como miembros de la familia de las caderinas dependientes de Ca^{2+} (23, 26).

En el estudio de Jiang y colaboradores (50), se demuestra que la láminina 1 puede inducir el desarrollo de células β ; y Lammert y colaboradores (51), deducen que en este mecanismo pueden estar involucradas señales de inducción secretadas por las células endoteliales.

En la Figura 7 se presentan los principales eventos de las organogénesis pancreática.

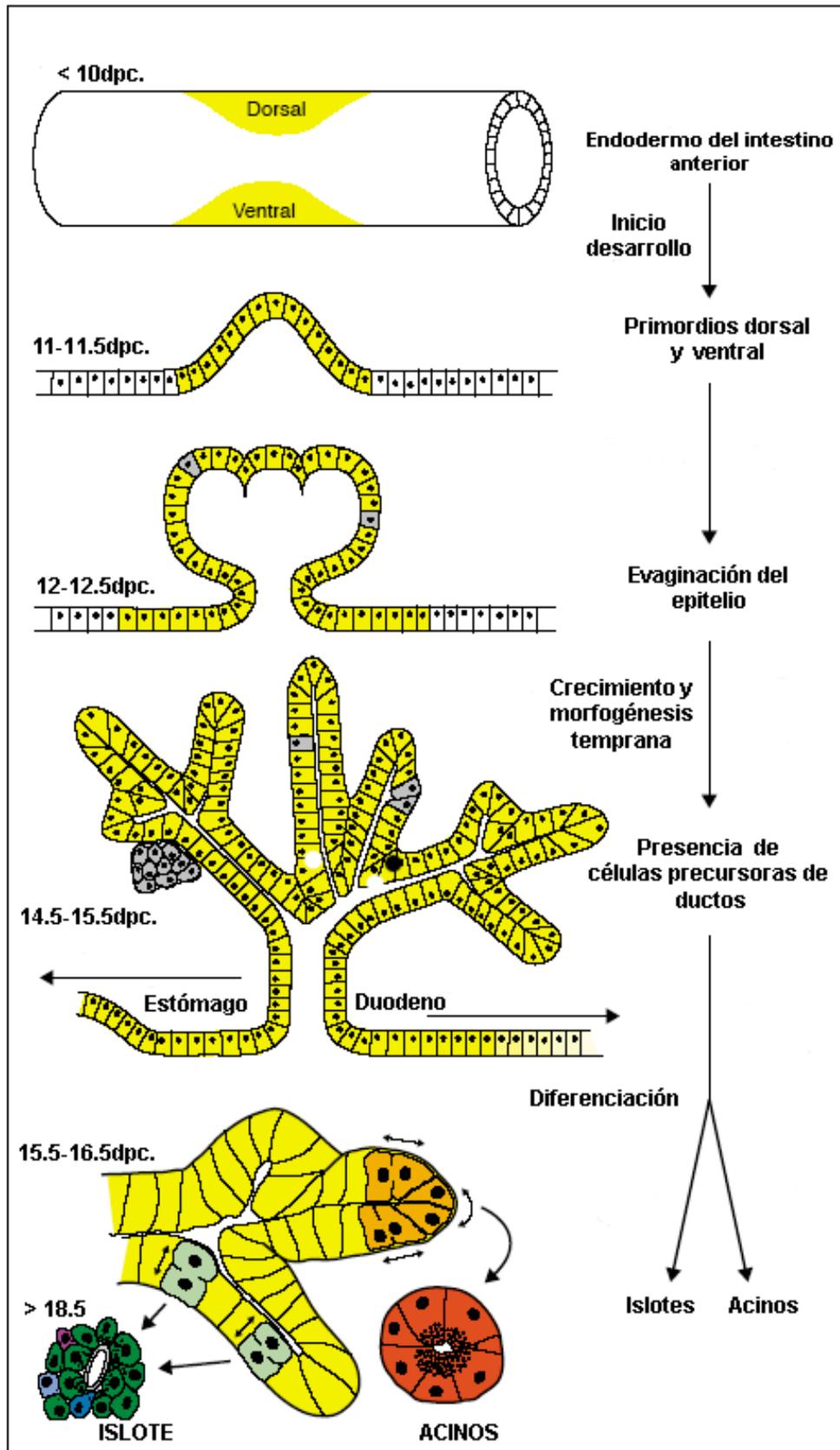


Figura 7. Eventos clave en la organogénesis pancreática. La sombra gris indica las agrupaciones celulares endocrinas tempranamente diferenciadas, dpc= días post-coito de rata (24).

2.5 Insulina.

Es una molécula conservada filogenéticamente en el reino animal, fue descubierta y aislada por F. G. Banting y C. Best en 1921.

Es una proteína pequeña de un peso molecular de 58.0 kDa, compuesta de 51 aminoácidos formando dos diferentes cadenas polipeptídicas, designadas como cadena A y cadena B; éstas dos cadenas unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A consiste de 21 aminoácidos y la cadena B consiste de 30 (52), (Figura 8).

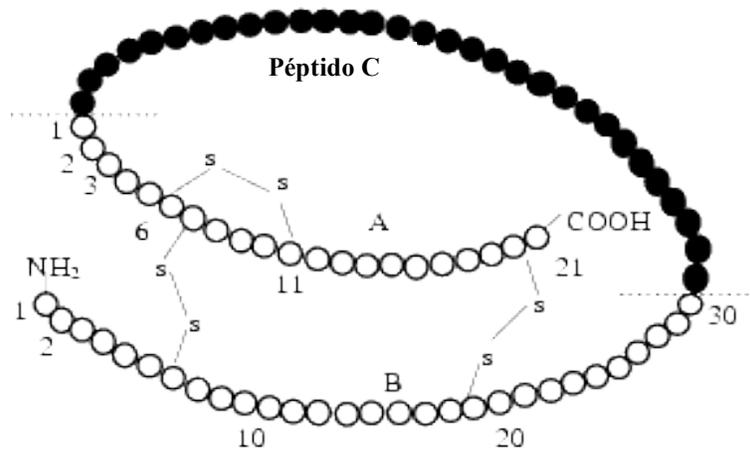


Figura 8. Estructura molecular de la proinsulina. En círculos blancos se representa la insulina, con sus respectivos puentes disulfuro (53).

La insulina se encuentra entre los más potentes agentes anabólicos, que promueve la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas inhibiendo su degradación y liberación dentro del torrente sanguíneo (16).

Las acciones fisiológicas de la insulina están caracterizadas por una gran variedad de efectos celulares, incluyendo la modulación del transporte de glucosa y aminoácidos; actividades de enzimas clave en el metabolismo, en la tasa de proteínas, síntesis de DNA y RNA, transcripción de genes específicos; diferenciación y crecimiento celular (52).

BIOSÍNTESIS

El gen que codifica la insulina, en humanos, se encuentra en el brazo corto del cromosoma 11, tiene una longitud de 1355 pares de bases y su región codificadora consiste de tres exones; el primero codifica el péptido señal en el extremo-N de la preproinsulina, el segundo codifica para la cadena B y parte del péptido C y el tercero codifica la parte complementaria del péptido C y la cadena A. Su transcripción produce un RNAm de 600 nucleótidos, y la traducción origina a la preproinsulina, un polipéptido de 11.5 kDa (54). Esta, es rápidamente descargada dentro del espacio cistérnico del retículo endoplásmico rugoso, donde enzimas proteolíticas inmediatamente cortan esta molécula para producir la proinsulina, removiendo el péptido señal (54).

La proinsulina contiene las cadenas A y B de la insulina unidas por el péptido C. Las conformaciones estructurales de la proinsulina y la insulina son similares, y una importante función del péptido C es el de alinear los puentes disulfuro que unen a las cadenas A y B para que la molécula este correctamente plegada para su liberación (55), (Figura 9).

La proinsulina es entonces transportada por microvesículas hacia el aparato de Golgi, donde es empaquetada en vesículas que están encerradas por una membrana que contiene una bomba de protones dependientes de ATP (54, 55).

La conversión de proinsulina a insulina es iniciada en el complejo de Golgi y continua su maduración en los gránulos secretorios a través de la acción secuencial de dos endopéptidasas (pro-hormonas convertasas 2 y 3) y carboxil peptidasa H juntas; estas enzimas actúan para remover la cadena del péptido C, produciendo así, la insulina (54), (Figura 9). La insulina tiene una baja solubilidad de esta manera se coprecipita con iones zinc para formar microcristales dentro de los gránulos secretorios.

Dentro de los gránulos, se han identificado polipéptidos poco abundantes, como la β -granina (0.1-0.3%) y la amílina (3%), (55).

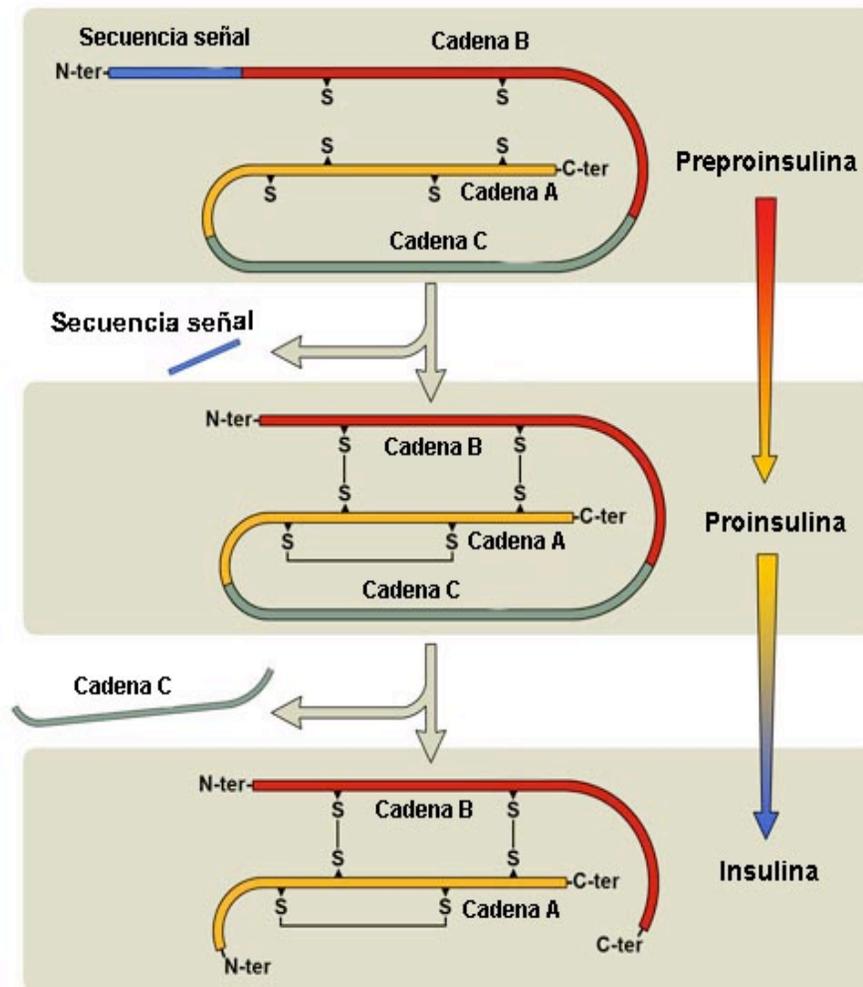


Figura 9. Esquema representando la biosíntesis de la insulina (52).

SECRECIÓN

Las células β liberan la insulina por el proceso de exocitosis, la glucosa juega un papel importante. En la célula β , la entrada de la glucosa es mediada por los transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT2) después para ser metabolizada en la vía glucolítica, la molécula de glucosa es fosforilada por la glucocinasa, así la molécula de glucosa modificada es metabolizada para producir ATP. El incremento en la tasa de ATP:ADP causa el cierre de canales de potasio sensibles a ATP en la membrana celular, previniendo que los iones potasio crucen la membrana celular. La resultante elevación de iones de potasio en el interior de la célula ocasiona la despolarización de la célula β (55). El siguiente paso es la activación de canales de calcio sensibles a voltaje, que transportan iones de calcio hacia el interior de la célula. El incremento activo en las concentraciones de calcio intracelular dispara el proceso de exocitosis de los gránulos de insulina (56).

Así la membrana de los gránulos se fusiona con la membrana celular, liberando el contenido de los gránulos. Se ha demostrado que el número de gránulos exocíticos se incrementa por la estimulación con glucosa (52, 56), (Figura 10).

La reincorporación de la membrana de los gránulos es parcialmente reabsorbida por la célula (membrana plasmática) y es reciclada por el aparato de Golgi para su re-uso. Para el final del proceso, se produce un reservorio de gránulos acumulados sobre la superficie de la membrana plasmática (52, 55, 56).

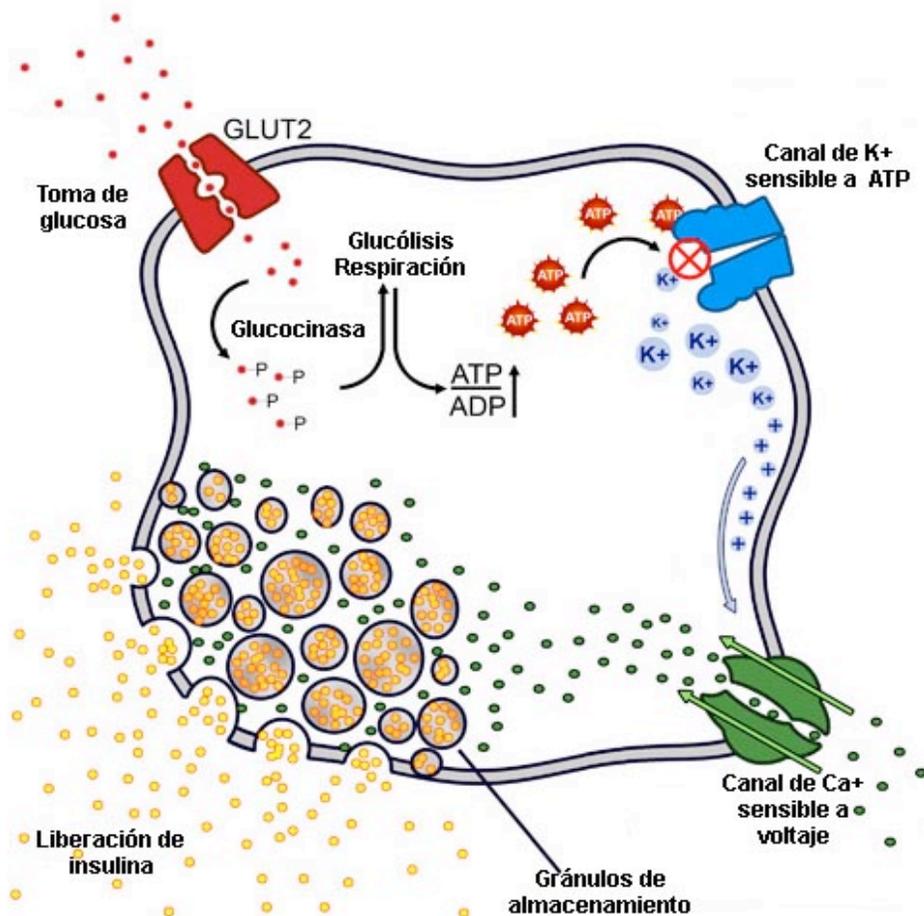


Figura 10. Esquema representando la secreción de insulina en una célula β (52).

2.5.1 Señalización celular y regulación.

Como muchas hormonas, la insulina ejerce sus acciones a través de la unión a receptores específicos presentes en muchas células del organismo, incluyendo células adiposas, hepáticas y musculares.

La insulina ayuda al control de los niveles de glucosa por tres vías. Inicialmente, la insulina actúa en las células de tejidos periféricos sensibles a insulina, el músculo esquelético, para incrementar la toma de glucosa. Después, la insulina actúa en el hígado donde promueve la glucogénesis y finalmente, la insulina simultáneamente inhibe la secreción de glucagón de las células α pancreáticas, de este modo su señalamiento en el hígado detiene la producción de glucosa por la vía de la glucogenólisis y gluconeogénesis (57).

Otros factores que estimulan la secreción de insulina en adición a la concentración de glucosa en sangre, son algunos aminoácidos como: la arginina, leucina, y la lisina; péptido tipo glucagón-1 (GLP-1) y péptido inhibitorio gástrico (GIP) liberados desde el intestino, después de una comida; y una estimulación parasimpática mediada por el nervio vago (58).

La insulina es una hormona pleitrópica con múltiples vías de señalización (59), (Figura 11).

El receptor de insulina (IR) pertenece a la familia de proteínas tirosin-cinasas. Esta, es una proteína transmembranal compuesta de dos subunidades extracelulares denominadas α y 2 subunidades transmembranales denominadas β (55, 59), (Figura 11).

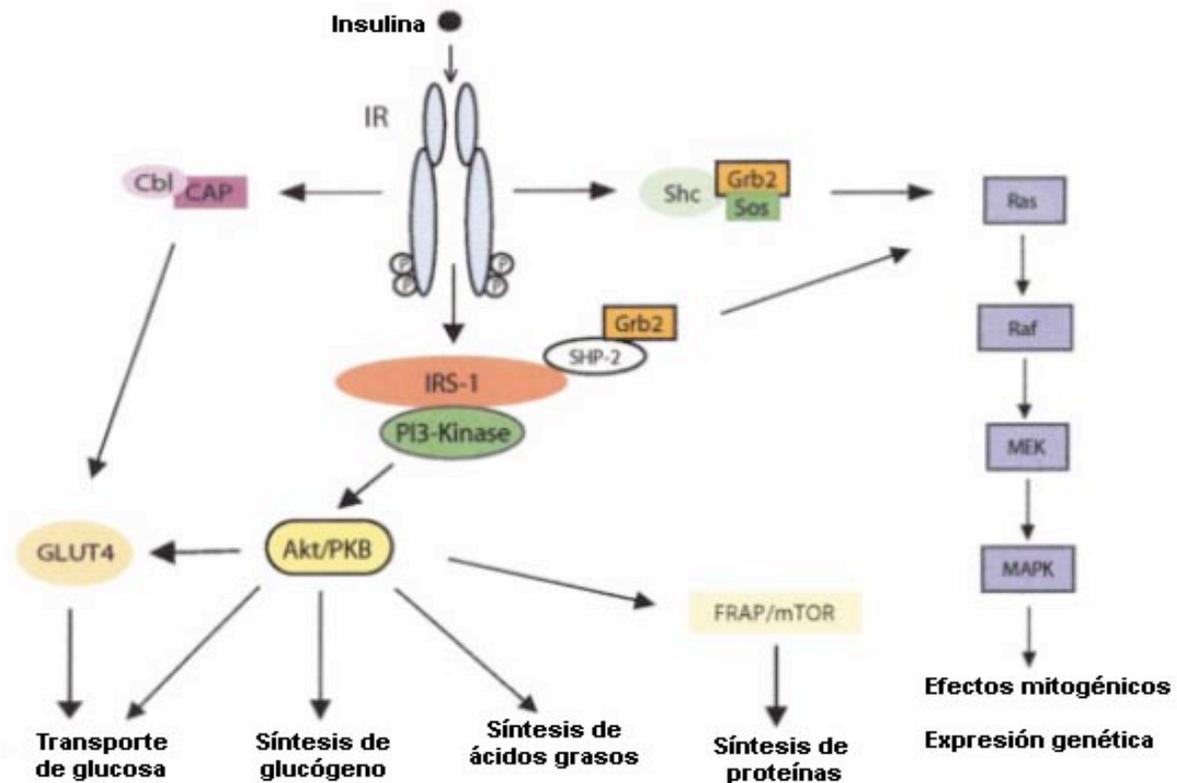


Figura 11. Esquema de las principales vías de señalización en respuesta a la insulina (59).

Después de la unión con la insulina, la actividad de la cinasa del receptor se incrementa, y el receptor de insulina sufre una autofosforilación en ciertos residuos de tirosina localizados en la porción citoplásmica de las subunidades β (59).

Subsecuentemente, estos residuos de fosfotirosina y sus secuencias cercanas, reclutan dominios de moléculas de señalización como SH2 (Homólogo 2 de Src) o PTB (conectores a fosfotirosinas) (59). Aunque no son limitados, muchas de las proteínas reclutadas pertenecen a una clase de proteínas adaptadas a la familia de los sustratos de receptor de insulina (IRS) (60).

Los ejemplos mejor caracterizados incluyen Shc, que está primeramente involucrado en la activación de la vía proteína-cinasa activadora de mitogéno (MAPK) para efectos mitogénicos; e IRS-1, que puede transmitir la señal de la insulina para procesos mitogénicos y metabólicos (61).

La función primaria de la insulina es la de mantener la homeostasis de la glucosa, ésta es llevada a cabo por el desplazamiento del transportador de glucosa GLUT4 desde vesículas intracelulares hacia la superficie celular (56). Después del reclutamiento de IRS-1 por la activación del IR, IRS-1 queda fosforilado por la tirosina y sirve como una gran proteína de plataforma para la unión de importantes proteínas que contienen SH2 (61), (Figura 11).

El ejemplo más importantes es el de la subunidad regulatoria p85 de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3-cinasa). La unión de p85 recluta la subunidad p110 de la PI3-cinasa, ocasionando la activación de la vía PI3-cinasa, un componente necesario involucrado en el desplazamiento de GLUT4 (59, 61), (Figura 11). Las proteínas tirosinas-fosfatasa son candidatos importantes en la acción negativa sobre la señalización insulínica (60).

2.5.2 Amilina.

Fue reportada por primera vez en 1987, es un péptido compuesto de 37 aminoácidos, es una hormona neuroendocrina coexpresada y cosecretada con la insulina por las células β pancreáticas en respuesta al estímulo alimenticio (16). Cuando es secretada por el páncreas, el ratio molar insulina-amilina en la circulación es de aproximadamente 50:1 (55).

La amilina detiene la secreción de glucagon posprandial, de tal modo que disminuye la salida de glucosa hepática estimulada por glucagon seguida de una ingesta nutricional. Esta inhibición sobre la secreción de glucagon es postulada para ser mediada por señales de vías aferentes del nervio vago. También disminuye la tasa de vaciamiento gástrico y, por lo tanto, retrasa la tasa por la cual los nutrientes son liberados desde el estómago hacia el intestino delgado para su absorción.

La señalización de la amilina se da primeramente a través del sistema nervioso central. Estudios en animales han identificado sitios receptores tipo de calcitocinas para la amilina en regiones del cerebro, predominantemente en el área postrema. El área postrema es una parte del complejo vagal dorsal del tallo cerebral. Una notable característica del área postrema es que ésta carece de barrera hematoencefálica, permitiendo una exposición rápida a los cambios en las concentraciones de glucosa plasmática, como también de los péptidos circulantes, incluyendo la amilina (58).

2.5.3 Glucagon

Es el agente glucogenolítico hepático más potente. Presenta también un alto grado de conservación estructural en el reino animal (14). Fue descrito por Roger Unger en la década de los años 50's. Tiene un peso molecular de 34.50KDa. El glucagon se compone de una simple cadena de 29 aminoácidos y libre de puentes disulfuro (16), (Figura 12).

Esta hormona es procesada al igual que la insulina desde una premolécula el: proglucagon. El proglucagon es expresado en varios tejidos (cerebro, páncreas, e intestino). En el páncreas, el glucagon es procesado a partir del proglucagon tipo 2 (PC2) en las células α (62).

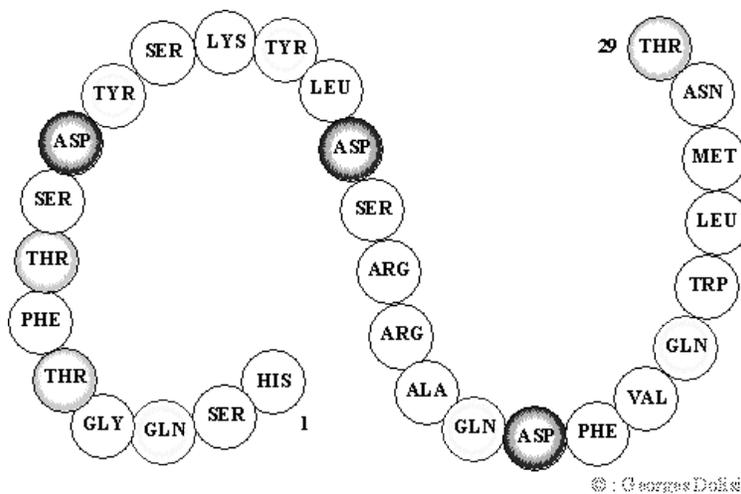


Figura 12. Estructura molecular del glucagon (63).

El glucagon es liberado hacia el torrente sanguíneo cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos, en condiciones de ayuno. El papel fisiológico característico del glucagon es el estimular la producción de glucosa hepática, originando así un incremento de la glucemia sanguínea (13). Es por tanto, la hormona contrareguladora de la insulina, el glucagon aumenta los niveles de glucosa plasmática en respuesta a la hipoglucemia inducida por insulina (14). Es decir, cuando los niveles de glucosa plasmática bajan por debajo del rango normal, la secreción de glucagon aumenta, resultando una producción de glucosa hepática y así regresan los niveles de glucosa a un rango normal, por lo que, cuando se ingiere un alimento, inmediatamente la secreción de glucagon es detenida (16).

2.5.3.1 Señalización celular y regulación.

El glucagon actúa por la vía de un receptor transmembranal de siete brazos acoplado a proteínas G, que consiste de 485 aminoácidos. Hasta hoy, se han identificado sitios de unión del glucagon en múltiples tejidos, incluyendo el hígado, cerebro, páncreas, riñón, intestino y tejido adiposo.

La unión del glucagon con los brazos extracelulares del receptor, resulta en cambios conformacionales que después, originan la activación subsiguiente de las proteínas G acopladas (62).

Se han reportado 2 clases de proteínas G asociadas en la señal de transducción del receptor de glucagon, proteína $G_{s\alpha}$ y proteína G_q . La activación de $G_{s\alpha}$ inicia la activación de la adenil-ciclase, que incrementa los niveles de AMPc intracelular, y en consecuencia la activación de la proteína-cinasa A (PKA). La activación de G_q inicia la activación de la fosfolipasa C, la producción de inositol 1,4,5-trifosfato, y después la liberación de calcio intracelular (62), (Figura 13).

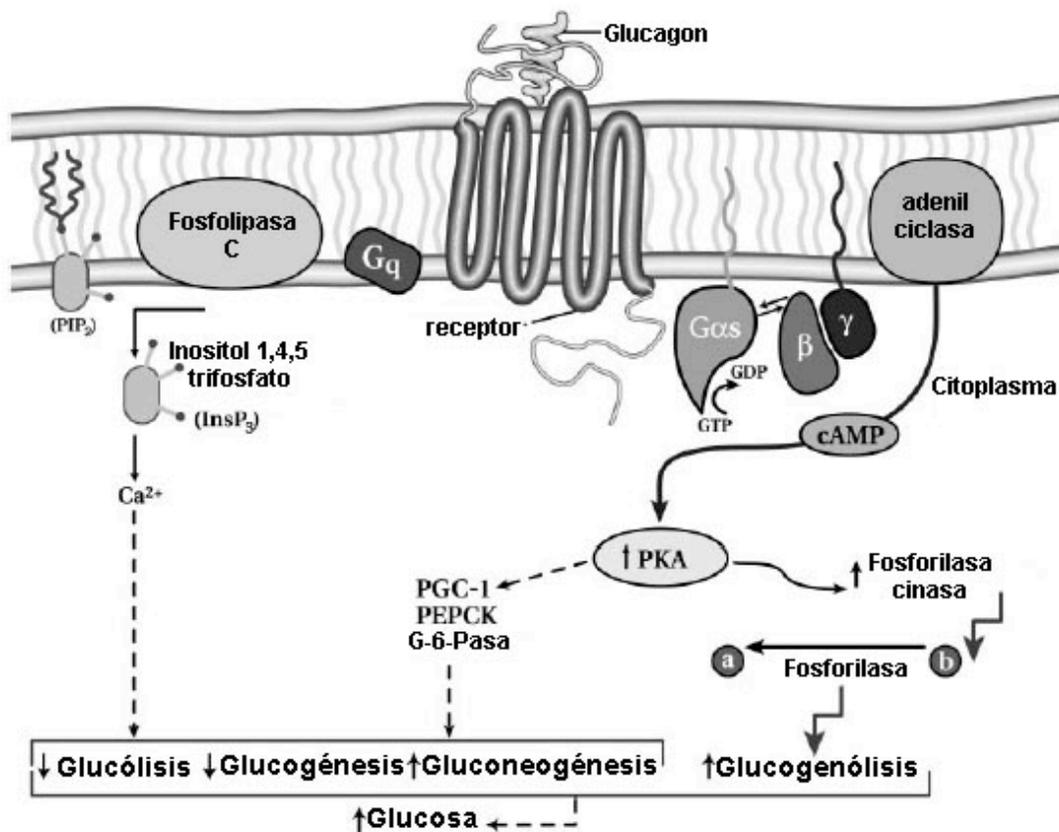


Figura 13. Vía de señalización del Glucagon: PIP₂: fosfatidinositol 4,5 bifosfato, PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxinasa; G-6-Pasa: Glucosa 6- fosfatasa (62).

Acción en la gluconeogénesis: El glucagon regula la glucosa sanguínea, afectando el metabolismo de ésta, especialmente incrementando la gluconeogénesis y disminuyendo la glucólisis (14, 58). Después la glucosa 6-fosfatasa (G-6-Pasa) promueve la gluconeogénesis por la conversión de glucosa 6-fosfato a glucosa, el último paso de la vía. La sobre regulación de la glucosa-6 fosfatasa podría promover la gluconeogénesis como también la glucogenólisis, (62).

Inhibición de la glucólisis: Además de incrementar la gluconeogénesis, el glucagon inhibe la glucólisis, el glucagon inhibe la actividad de la fosfofructocinasa-1, la cual es la encargada de fosforilar el carbono 1 de la fructosa 6-fosfato, convirtiéndola en la fructosa 1,6-bifosfato, un paso importante en el inicio de la glucólisis. Al igual, que también inhibe la piruvato cinasa activando la proteína-cinasa A, la cual, la fosforila, inhibiendo así la conversión de piruvato y ATP desde el fosfoenolpiruvato (58, 62), (Figura 14).

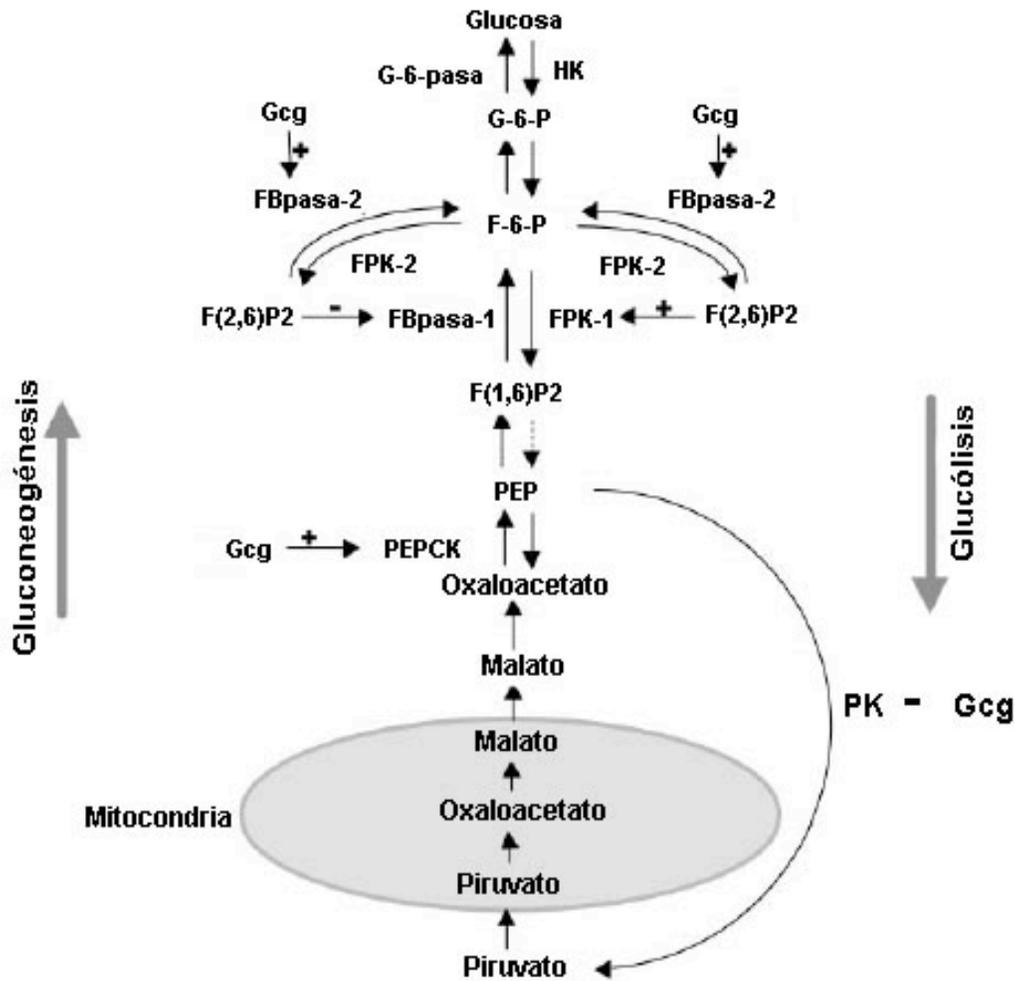


Figura 14 Diagrama sobre la regulación del metabolismo de la glucosa por el glucagón en hígado. Las flechas externas indican la dirección de los mecanismos por los cuales el glucagón regula la glucólisis y gluconeogénesis. F-6-P: Fructosa-6-fosfato; F(1,6)P2: fructosa 1,6 bifosfato; F(2,6)P2: Fructosa 2,6 bifosfato; PEP: Fosfoenolpiruvato; FPK1: Fosfofructocinasa 1; FBPasa-1: Fructosa 1,6 bifosfatasa; FPK2: 6-Fosfofructosa-2-cinasa; FBPasa 2: fructosa 2,6-bifosfatasa; PK: Piruvato cinasa. Gcg= glucagón (62).

Acción en la glucogenólisis: La señalización del glucagón promueve la glucogenólisis, y al mismo tiempo inhibe la síntesis de glucógeno en el hígado. La estimulación de glucagón activa la proteína cinasa A; que a su vez, activa la glucógeno fosforilasa cinasa, al estar activada ésta, subsecuentemente fosforila residuos de serina-14 y se convierte en glucógeno fosforilasa, causando su activación.

Finalmente, la glucógeno fosforilasa, fosforila glucógeno ocasionando un incremento en la degradación de glucógeno y por consiguiente la producción de glucosa 6 fosfato, que es convertida a glucosa por la glucosa-6-fosfatasa, incrementando la producción de glucosa desde el hígado (62).

Inhibición de la gluconeogénesis: Además de la acción sobre la glucogenólisis, el glucagón inhibe la síntesis de glucógeno regulando la acción de la glucógeno sintetasa en el hígado.

La glucógeno sintetasa juega un papel clave en la síntesis de glucógeno por la canalización del residuo transportador glucosílico de la glucosa-UDP que es un extremo no reducido de la molécula de glucógeno. Como la glucógeno fosforilasa cinasa, y la fosforilasa, la glucógeno sintetasa es regulada por fosforilación pero de un modo opuesto (62).

El glucagon induce la fosforilación de la glucógeno sintetasa e inhibe así su actividad sintetizadora en el hígado.

La inactivación de la glucógeno sintetasa reduce la síntesis de glucógeno y, por ende, incrementa la toma de glucosa hepática desde la sangre (16, 58).

Pocos son los estudios acerca de la inhibición de la secreción de glucagon, pero entre los mas conocidos están los siguientes:

- La secreción de amilina desde las células β pancreáticas: Es un mecanismo por el cual se postula que es mediado centralmente por vías eferentes de señales del nervio vago y su inhibición es post-pandrial seguida de una ingestión de alimentos (58).
- La secreción de GLP-1: Es secretado por las células L del intestino (ileum) y colon, que actúa de igual manera por vías de señalización del sistema nervioso por la vía del nervio vago después de un vacío gástrico (16).
- La propia secreción de insulina.
- La secreción de somatostatina: De forma paracrina las células δ regulan la síntesis del glucagon (64).
- Secreción de Zinc (62, 63).
- La secreción de GABA por células β : se ha reportado que las células β pancreáticas secretan ácido γ - aminobutírico (GABA) en microvesículas tipo-sinápticas. Estas son liberadas por exocitosis dependiente de Ca^{+} y voltaje, así, el GABA liberado, viaja cierta distancia suficiente para activar receptores de GABA en células vecinas, las cuales son células α . Estas presentan el receptor tipo $GABA_A$ (65).

2.5.3.2 Glucagon y diabetes.

La diabetes es también una de las enfermedades asociadas con glucagonoma, una tumor secretador de glucagon derivado de las células pancreáticas. La hiperglucagonemia crónica está correlacionada con la liberación de glucosa desde el hígado e hiperglucemia en la diabetes tipo 2 (58). En los pacientes con diabetes tipo 2, la secreción postpandrial de la insulina es atrasada y disminuida, por lo que la síntesis de glucagon no es suprimida totalmente o está en niveles altos (62).

Así la hiperglucagonemia juega un importante papel en el inicio y mantenimiento de la hiperglucemia cuando combinada con una deficiente y disminuida secreción insulínica ocasiona diabetes tipo 1 y 2 (54).

2.5.4 Somatostatina

La somatostatina está distribuida ampliamente en los sistemas nervioso y endocrino. Esta, se encuentra en dos formas activas, SST14 y la SST28 que son producidas por diferentes tipos celulares en todo el organismo (13).

La somatostatina en el páncreas se presenta comúnmente en la forma 14, formada por 14 aminoácidos y un puente disulfuro, (Figura 15) se deriva de un precursor llamado preprosomatostatina (14).

La función en el páncreas es de regular de una manera paracrina “local” la secreción de insulina y glucagon de las células α y β de los islotes pancreáticos (16).

La somatostatina fue originalmente descubierta en el hipotálamo y su función fue la de inhibir la secreción de la Hormona de crecimiento (HC) de la pituitaria. Hoy, se conoce que es un péptido multifuncional que inhibe la secreción de una gran cantidad de hormonas, incluyendo insulina, glucagon, gastrina y colecistocinina. Además de estas funciones se le han atribuido la inhibición de la secreción exocrina del páncreas y la movilidad de la vesícula biliar, y como neurotransmisor (64).

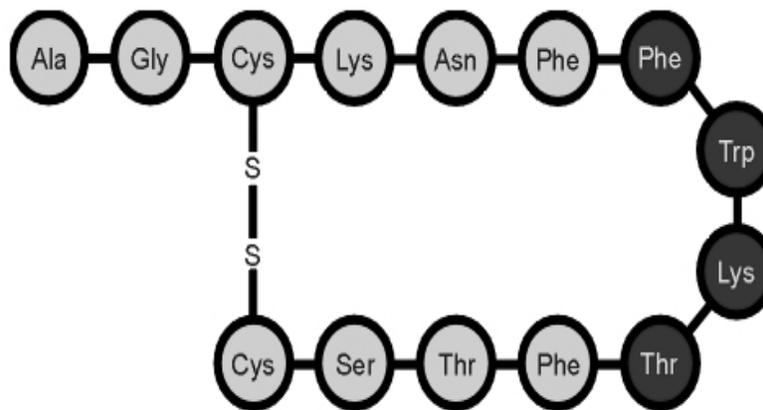


Figura 15. Estructura molecular de la somatostatina (SST), (66).

2.5.4.1 Señalización celular y regulación

Las actividades fisiológicas de la somatostatina son mediadas por interacciones altamente afines a una familia de receptores acoplados a proteínas G (64). Cinco diferentes subtipos de receptores a somatostatina han sido descubiertos ($sstR_{1-5}$) (67). Estos se diferencian por su especificidad farmacológica para diferentes análogos, su distribución tisular, su regulación y sus vías de señalización intracelular.

Estudios previos en ratas han mostrado que la SST inhibe la liberación de glucagon e insulina por la vía del $sstR_2$ y $sstR_5$, respectivamente (67).

2.5.5 Polipéptido pancreático (PP)

Pertenece a la familia de péptidos neuroendocrinos, como el neuropéptido Y (NPY) y péptido Y (PYY) (13). Es un péptido formado por 36 aminoácidos y su peso es de 42.0Kd (14). Su papel fisiológico es poco conocido. PP es liberado después de una ingesta proteica (16).

Las moléculas de PP pueden auto-asociarse como dímeros y, en presencia de iones de zinc, pueden formar grandes oligómeros. Las células productoras de polipéptido pancreático se encuentran comúnmente en los islotes de Langerhans del lóbulo duodenal del páncreas. Más del 95% se origina en este órgano.

El PP reduce la secreción del páncreas exócrino, disminuye la contracción de la vesícula biliar e inhibe la movilidad gástrica y del intestino delgado, la hormona puede marcar el paso de la entrada de nutrientes hacia la circulación de una forma lenta en el proceso digestivo. Parece estimular la secreción gástrica del HCl y pepsina (19).

2.5.5.1 Señalización celular y regulación.

Poco se conoce acerca de las señales involucradas en la secreción del PP.

Se ha encontrado que la liberación de PP desde el páncreas es iniciado por control vagal, y la concentración en el plasma se incrementa rápidamente después del consumo de alimento (68).

El efecto de la glucosa sobre la secreción de PP es complejo, se sabe que una infusión de glucosa inhibe la liberación de PP, pero esta acción puede ser indirectamente mediada por la supresión de la actividad colinérgica o por la estimulación en la secreción de somatostatina. En el estudio de Liu y colaboradores (68), se ha propuesto que la somatostatina enmascara un efecto estimulador directo de la glucosa sobre las células PP. En las células β y δ la elevación de $[Ca^{2+}]$, en respuesta a la glucosa, ha sido atribuida a una despolarización, con abertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje después del cierre de canales de K_{ATP} .

Sus resultados sugieren que las células PP, como los otros tipos de células de los islotes, tienen canales de K_{ATP} y canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y que las condiciones conocidas que estimulan la secreción de PP están asociadas con una despolarización dependiente de la elevación de $[Ca^{2+}]$.

2.5.6 Grelina y su señalización celular

La grelina es un péptido octanosilado de 28 aminoácidos, aparte de producirse en el páncreas se encuentra comúnmente en el estómago (mucosa oxíntica), en el antrum gástrico, el intestino delgado, hipotálamo, placenta, riñón, testículos, y en el pulmón en desarrollo. Se ha sugerido que la grelina es secretada primeramente desde el estómago, actuando como una hormona para estimular la liberación de la hormona de crecimiento (HC) en la pituitaria (21). En el páncreas es secretada por gránulos secretorios de 110nm. (Figura 16).

Recientes estudios han mostrado acciones adicionales de la grelina, como la estimulación de la toma de nutrientes al igual que causa una ganancia de peso corporal con un incremento en la adiposidad debido a cambios en el balance energético, incluyendo una reducción en la utilización de grasas, como se ha estudiado en ratas y ratones (22).

La grelina ha sido reportada que influye en la secreción de insulina. En algunos estudios, se ha observado que inhibe la secreción de insulina, tanto en humanos como en roedores (69). En otros se sugiere que puede ser un potenciador de la liberación insulínica y que el Ca^{2+} puede ser un mensajero para la grelina desde las células β (48). Por lo que la grelina puede servir como un regulador fisiológico de la liberación de insulina. Pues oscilaciones e incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]$ han sido implicadas no únicamente en la liberación insulínica pues también en la síntesis y expresión genética, por lo que la grelina puede servir como un factor trófico para las células β (48, 69).

Estas investigaciones sugieren que la grelina puede funcionar como una molécula señal anabólica durante la disminución energética. Aunque estudios adicionales son definitivamente necesarios para el entendimiento de su función y señalización celular.

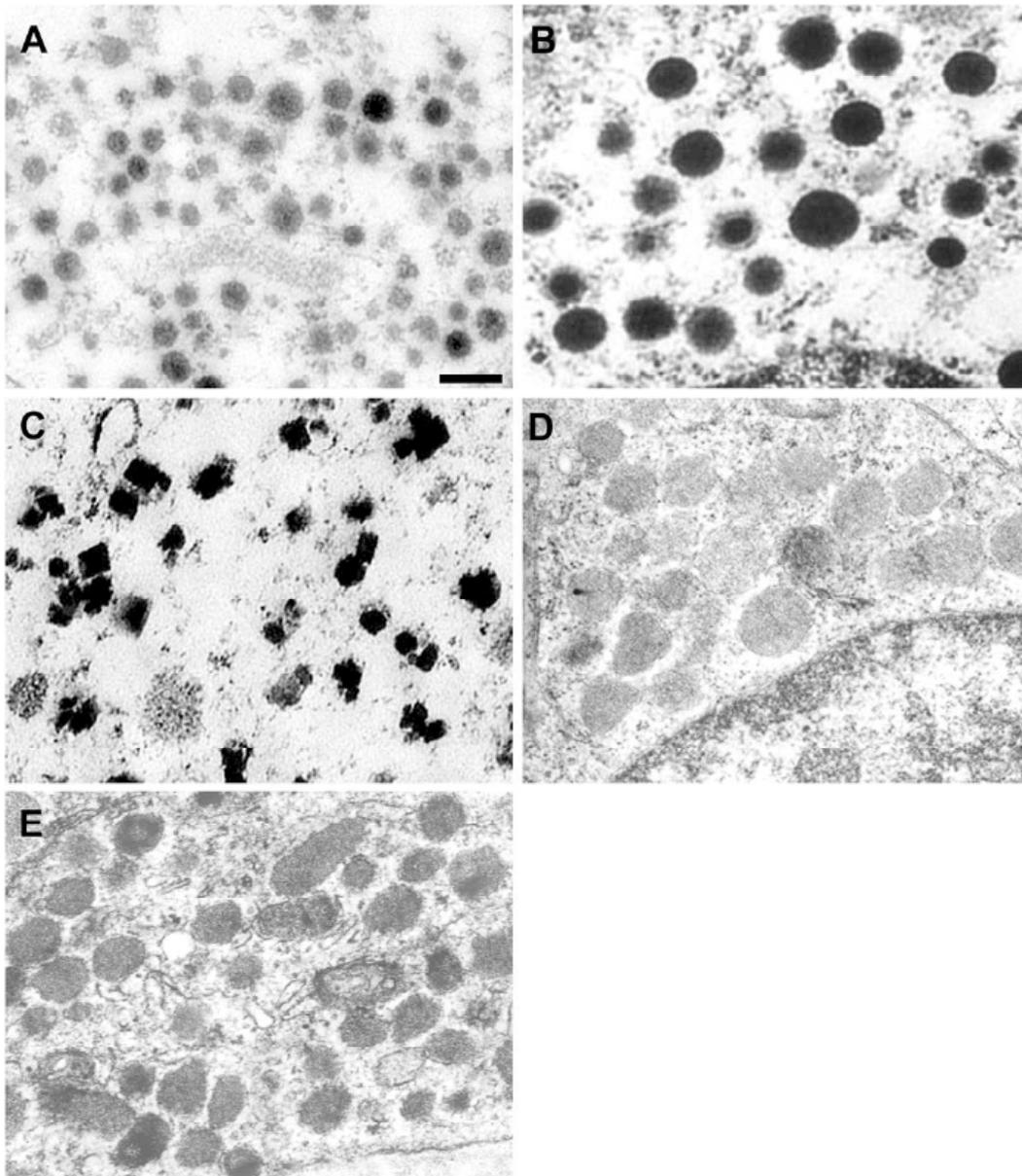


Figura 16. Fotografías por microscopía electrónica de los gránulos secretorios de los 5 tipos celulares endocrinos del páncreas. **A)** célula ϵ , **B)** Célula α , **C)** Célula β , **D)** Célula δ y **E)** Célula PP. Barra 250 nm (48).

III DIABETES EXPERIMENTAL

3.1 Modelos Animales

Para realizar cualquier tipo de investigación biomédica es necesario experimentar con animales. Las observaciones en éstos pueden extrapolarse al hombre después de un análisis riguroso (70).

Para el estudio de la diabetes mellitus existen diversos modelos animales que pueden ser utilizados de acuerdo a los requerimientos de la investigación.

3.2 Modelos de Diabetes espontánea

La Diabetes espontánea en animales es relativamente común. Desde 1851 Leblanc documentó el caso de diabetes espontánea en un mono. En los animales que desarrollan la diabetes tipo 1 intervienen 2 factores patogenéticos que se complementan: los defectos inmunológicos y la predisposición genética.

Esto quiere decir, que estos individuos pueden desarrollar la enfermedad, de forma que tras los cruces adecuados se obtienen cepas de animales que en un elevado porcentaje, desarrollaran diabetes. Esta puede ser caracterizada en los animales por obesidad, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. En el caso de animales no obesos las características son hipoinsulinemia, cetosis y dependencia a la insulina (71).

Los modelos genéticos que semejan a la diabetes mellitus son producidos por la selección de una mutación espontánea o por ingeniería genética (71). Son muchos los ejemplos de modelos animales incluyendo: al ratón db/db, ratón ob/ob, ratón kkk, ratón NZO, rata diabética Zucker, varios de estos modelos muestran diversos grados de glucemia, insulinemia y obesidad; los modelos de Diabetes tipo 1 incluyen al ratón NOD y la rata diabética BB (72). En el Cuadro 1 se muestran algunos modelos de animales con diabetes espontánea.

También se utilizan animales en los cuales, determinados genes o proteínas son borrados o están ausentes (knockouts) ó son sobreexpresados (73).

Para la observación, de que la resistencia a la insulina es heredable autosómicamente y que un simple gene puede estar involucrado, se han empleado animales knockout para diferentes moléculas involucradas en la señalización de la insulina y demostrar qué mecanismos están implicados en la resistencia a la insulina (72). Entre las moléculas involucradas están:

1. **Receptor de Insulina:** modelos en ratones homocigóticos para el receptor de insulina. El knockout presenta una severa hiperglucemia y cetosis, mientras los heterócigos han compensado su resistencia a la insulina y la tolerancia a la glucosa. La sobreexpresión de los receptores de insulina-cinasas provoca únicamente una resistencia media a la insulina y no diabetes. Las mutaciones en la diabetes tipo 2 en el receptor de insulina, son desconocidas.

Cuadro 1. Características de algunos modelos animales con diabetes espontánea.

NOMBRE	CONSTITUCIÓN	INSULINA PLASMÁTICA	TIPO DE DIABETES	CETOSIS	EFFECTO EN CÉLULAS β.
Rata BB (Biobreder)	Delgada	Muy baja	Tipo 1	+++++	Insulinitis. Necrosis de las células β .
Ratón NOD (diabético no obeso)	Delgada	Baja	Tipo 1	+++	Dstrucción autoinmune por las células T.
Ratón Chino (<i>Cricetulus griseus</i>)	Delgada	Normal a Baja	Tipo 1	+	Degranelación, bajo número de células β , con cetosis: necrosis
Hámster Sudáfrica (<i>Mysromys albicaudatus</i>).	Delgada	¿?	Tipo 1	++	Hiperplasia e infiltración de glucógeno, con cetosis: necrosis
Perro Keeshond	Delgada	Baja	Tipo 1	+++	Ausencia de células β ; células β solitarias.
Ratón C57BL/ 6J ob/ob	Muy obeso	Inicia alta después normal.	Tipo 2	-----	Inicio: degranulación; después hiperplasia y regeneración.
Ratón C57BL/ Ksj db/db	Muy obeso	Inicio: alta, después baja	Tipo 2	Ocasional	Inicio: degranulación, después necrosis de células β .
Ratón Obeso de Nueva Zelanda (NZO)	Obeso	Alta	Tipo 2	----	Inicio: Aumento de la insulina pancreática.
Ratón amarillo	Obeso	Alta	Tipo 2	----	Hipertrofia e Hiperplasia
Ratón KK	Obeso	Alta	Tipo 2	----	Hipertrofia e hiperplasia.
Ratón amarillo - KK	Obesidad moderada	Alta	Tipo 2	----	Hipertrofia e Hiperplasia.
Rata Obesa de la cepa Zucker (falfa Zucker)	Obesa	Alta	Tipo 2	-----	Inicio: Alargamiento de islotes, después baja insulina, bajo número de células β .
Rata de Arena (<i>Psammomys obesus</i>)	Obesa	Alta	Tipo 2	Ocasional	Alargamiento de los islotes, degranulación de las células β ; depósitos de glucógeno, con cetosis: necrosis
Ratón rápido (<i>Acomys cahirinus</i>)	Obeso	Alta	Tipo 2	Ocasional	Hipertrofia e hiperplasia masiva.
Ratón Híbrido Wellesley (C3hfXI)	Obeso	Alta	Tipo 2	-----	Hiperplasia, hipertrofia y degranulación de las células β .
Hámster Djungarian (<i>Phodopus sungorus</i>)	Obeso	Alta	Tipo 2	+	Hipertrofia e hiperplasia.
Tuco –Tuco (<i>Ctenomys talarum</i>)	Muy obeso	¿?	Tipo 2	----	Hipertrofia.
Simio negro (<i>Macaca nigra</i>)	Delgado	Normal	¿?	----	Amiloide.
Mono rehesus (<i>Macaca mulatta</i>)	Obeso	Inicio. Alta, después baja	Tipo 2	----	Alteraciones en la secreción de insulina.

2. **Substratos del receptor de insulina 1 y 2:** Ratones homocigos en la mutación de IRS1 presentan un retardo de crecimiento intrauterino y postnatal, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, y resistencia a la insulina y IGF-1, pero no son marcadamente diabéticos. Dobles homocigos para los alelos de los genes de IRS-1 mueren por cetoacidosis diabética, mientras los heterocigos muestran una resistencia a la insulina.
3. **Transportadores de glucosa:** Translocaciones y mutaciones en el GLUT-4, los knockouts presentan una resistencia a la insulina media, y una hiperglucemia media. Los heterocigos con deficiencia en GLUT-4 iniciaron como hiperinsulínicos y eventualmente hiperglucémicos.
4. **Factor α Necrosis tumor (TNF- α):** Es una citocina que frecuentemente es sobre expresada en tejido adiposo de humanos y modelos animales de obesidad. Los knockouts de uno o ambos receptores de TNF- α dan por resultado una significativa sensibilidad a la insulina (73).

3.3 Modelos de Diabetes Inducida.

La diabetes puede ser producida experimentalmente por cirugía, infección viral, administración de hormonas o de agentes químicos (70, 71, 72).

3.3.1 Inducción Quirúrgica

Los primeros intentos de inducir la diabetes experimental se realizaron en perros a través de la pancreatectomía parcial o total; y fue con este modelo que F. G. Banting y C. Best, en 1921, descubrieron la insulina. Este procedimiento también fue el primero que se utilizó para causar diabetes en ratas gestantes. Posteriormente mediante la lesión selectiva de las células del núcleo ventromedial del hipotálamo de ratas, se logró que éstas desarrollaran una diabetes experimental que semeja a la tipo 2, presentando obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (72).

3.3.1.1 Pancreatectomía

La extirpación total del páncreas da por resultado una diabetes tipo 1. Esta extirpación resulta del removimiento de la masa celular β , α , δ , y PP; así como la masa celular acinar necesaria para la propia digestión, por consiguiente, la dieta de los animales pancreatectomizados debe ser suplementada con enzimas pancreáticas (72).

El efecto de inducción de diabetes por pancreatectomía es dependiente del grado de identificación y la habilidad para identificar y preservar segmentos adecuados del órgano. En especies animales como perros, cerdos, y primates no humanos el páncreas es un órgano discreto y aislado; que en el caso de roedores como la rata, el páncreas es un órgano muy difuso, y la disección total del páncreas es muy difícil de realizar (71, 72).

3.3.2 Inducción Hormonal.

Las llamadas hormonas "anti-insulina" como la epinefrina, el glucagon, los glucocorticoides y la hormona de crecimiento, tienen un efecto antagónico al de la insulina, (Cuadro 2).

La epinefrina y el glucagon administrados en altas dosis a animales, tienen el mismo efecto anti-insulínico que el que se presenta en humanos. Incluso se ha reportado la presencia de hiperglucemia e hiperplasia de las células β del páncreas en animales a los que se les administró hidrocortisona (72).

Cuadro 2: Hormonas inductoras de Diabetes.

Anticuerpos Anti – insulina
Catecolaminas
Glucagon
Glucocorticoides (Dexametasona)
Somatostatina

3.3.2.1 Dexametasona.

Es un glucocorticoide de acción tardía que estimula la gluconeogénesis y la secreción de insulina e inhibe la toma de glucosa por las células adiposas. La dexametasona ha sido utilizada para producir modelos de diabetes tipo 2 y también, cuando se utiliza en altas dosis o en combinación con otros métodos, se puede producir un modelo de diabetes tipo 1 (71). El tratamiento en ratas produce una diabetes tipo 2 debido a una resistencia insulínica seguida de la administración del glucocorticoide (72).

La administración de la dexametasona disminuye la secreción de insulina estimulada por glucosa y reduce los niveles de GLUT2 en las células β , (Figura 17).

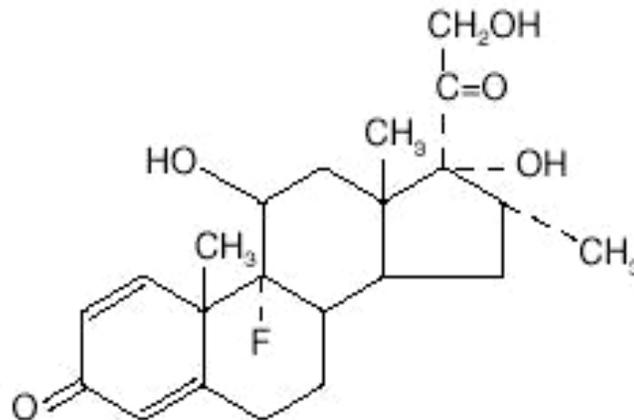


Figura 17. Estructura química de la dexametasona (74).

3.3.3 Inducción Viral

Los virus representan otro mecanismo de inducción de diabetes, están asociados con el desarrollo de la diabetes tipo 1 en humanos y animales, (Cuadro 3). Pueden destruir directamente las células β por efecto citolítico propio de los virus o bien actuar indirectamente por una respuesta autoinmune iniciada y aumentada por el virus, pero la susceptibilidad genética frente a la infección y la resistencia de las células β a las lesiones virales son un punto que hasta ahora no están bien clarificado (71, 75).

Cuadro 3. Virus que inducen el desarrollo de diabetes.

Virus	Tipo	Huésped	Factores Genéticos	Características
Encéfalo- Mio – Carditis (EMC)	RNA	Ratón Hámster	+ +	Producen degranulación de las células β y necrosis
Coxsackie B	RNA	Ratón Primates humanos	+ + No determinado	Inflamación focal exócrina con lesiones necrotizantes; alteraciones finas de células β sin necrosis.
Retrovirus	RNA	Ratón Humanos	+ No determinado	Necrosis de islotes poca a extensa.
Virus Bovino	RNA	Ganado	No determinado	Necrosis de células β .
Virus Kilham de la rata	DNA	Rata	+	Necrosis de células β .
Citomegalo-virus	DNA	Humanos	No determinado	
Epstein - Barr	DNA	Humanos	No determinado	
Varicela Zoster	DNA	Humanos	No determinado.	

Los modelos de Diabetes vírica presentan diversas dificultades experimentales, por lo que son poco utilizados en la investigación (75).

3.3.4 Inducción Química

La inducción de diabetes experimental en la rata utilizando agentes químicos que destruyen selectivamente las células β del páncreas es un método conveniente y simple de usar (70, 71, 72, 75). En el Cuadro 4 se muestran los diferentes agentes químicos inductores de diabetes.

Cuadro 4. Agentes químicos inductores de diabetes.

Agentes con efectos citotóxicos irreversibles en la célula β	Agentes con efectos citotóxicos reversibles en la célula β
Difenilthiocarbazona	2-deoxiglucosa
Estreptozotocina	Acido dehidroascórbico
Hidroxiquinolona	Aloxana
Oxine-9	Fluorida
Vacor	Iodoacetato
	Malonato
	Mannoheptulosa.
	L- asparginasa
	6- aminonocotinamida
	Cianida
	Azida
	Ciproheptamina

3.3.4.1 Estreptozotocina (STZ)

La estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-(metil-3nitrosourideo)-D-glucopiranososa) es un antibiótico sintetizado por el hongo *Streptomyces achromogenes* y es usado para inducir diabetes mellitus en modelos animales (71, 72, 75). Además de sus propiedades antibióticas y diabetogénicas, la STZ ha presentado propiedades genotóxicas en una variedad de ensayos, tales como: mutagénesis microbiana, síntesis de DNA no previstas, micronúcleos, aberraciones cromosómicas (CAs) e intercambio de cromátidas hermanas (SCEs) (76).

EL rango de la dosis no es muy claro como el caso de la aloxana. La dosis intravenosa frecuentemente usada en ratas adultas para inducir diabetes está entre 40 y 60 mg/Kg, pero altas dosis también son utilizadas. (77)

La acción de la STZ en las células β está acompañada por alteraciones en las concentraciones de insulina y glucosa sanguíneas (78). Después de 6 horas del tratamiento, ocurre hipoglucemia con altos niveles de insulina en la sangre. Finalmente, la hiperglucemia se desarrolla y los niveles de insulina sanguíneos disminuyen (79). La STZ perjudica la oxidación de la glucosa y disminuye la biosíntesis y secreción de la insulina (77, 78, 79).

COMPOSICIÓN QUÍMICA

La estructura química de la STZ es $C_8H_{15}N_3O_7$; está compuesta por isómeros α y β con respecto a la glucosa (76), (Figura 18). Es inestable a temperatura ambiente, por lo que hay que mantenerla congelada. La STZ se descompone rápidamente en solución acuosa a un pH neutro y su estabilidad óptima se consigue a pH 4 (72, 77, 79). La STZ tiene una vida media de 5 minutos y es eliminada de la circulación en un lapso de 4 a 6 horas (79).

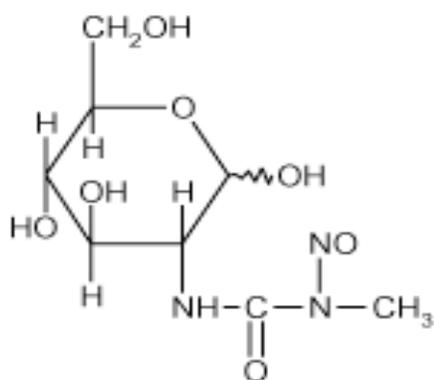


Figura 18. Estructura química de la estreptozotocina (STZ), (80).

3.3.4.2 Mecanismo de acción

La STZ es tomada por la Célula β vía transportador de glucosa GLUT2.

La acción intracelular de la STZ ocasiona cambios en el DNA de las células β resultando en la fragmentación de esta molécula. La actividad alquilante de la STZ está relacionada con su porción nitrosurea, especialmente en la posición O₆ de guanina (76).

Al ser metabolizada en la célula, la STZ sirve como donador de óxido nítrico (ON) el cual se ha propuesto que lleva a cabo la necrosis celular y daño al DNA (76, 77, 79).

En diversos experimentos, se ha demostrado que el ON no es la única molécula responsable del efecto citotóxico de la STZ, también genera especies de oxígeno reactivo, que contribuyen a la fragmentación del DNA y otros cambios que dañan a las células β (81).

La formación de aniones superóxidos resulta por la acción de la STZ en la mitocondria e incrementa la actividad de la xantin oxidasa, pues se ha demostrado que la STZ inhibe el ciclo de Krebs y substancialmente disminuye el consumo de oxígeno de la mitocondria (82). Estos efectos limitan fuertemente la producción de ATP mitocondrial y causan una disminución de esta molécula en las células β . La restricción en la generación de ATP mitocondrial está parcialmente mediada por ON (76, 81, 82).

El aumento en la defosforilación de ATP incrementa el abastecimiento del sustrato de la xantin oxidasa (las células β poseen una alta actividad de esta enzima) y dispara la producción de ácido úrico el producto final de la degradación del ATP (82), (Figura 19).

La xantin oxidasa cataliza la reacción y se forman los aniones superóxidos (70, 74). Como resultado de la generación del anión superóxido se forma el peróxido de hidrógeno y radicales de hidróxilo (82).

Esto puede indicar que las propiedades potentemente alquilantes de la STZ son la razón importante de su toxicidad.

El daño del DNA inducido por STZ activa la poli-ADP ribosilación. Este proceso origina una disminución del NAD⁺ celular, además de la reducción del contenido de ATP y subsecuentemente la disminución de la síntesis y secreción de insulina (81, 82).

Uno de los inhibidores de la poli ADP ribosilación es la 3-amino enzamida, potente inhibidor de la poli (ADP-ribosa) sintetasa; y el otro es la nicotinamida que es también una “limpiadora” de radicales libres y ejerce una protección para la STZ, pero es dependiente de ATP (82).

Se puede concluir que la activación de la poli-ADP ribosilación es de gran importancia para la diabetogenicidad de la STZ además de la generación de radicales libres y del daño al DNA (Figura 19). El calcio, que puede también inducir necrosis, no juega un papel importante en el efecto de la administración de STZ, pues se ha visto que los antagonistas de canales de calcio no protegen a las células β del daño de la STZ, como en el caso de la aloxana (75, 76, 77, 79, 81, 82).

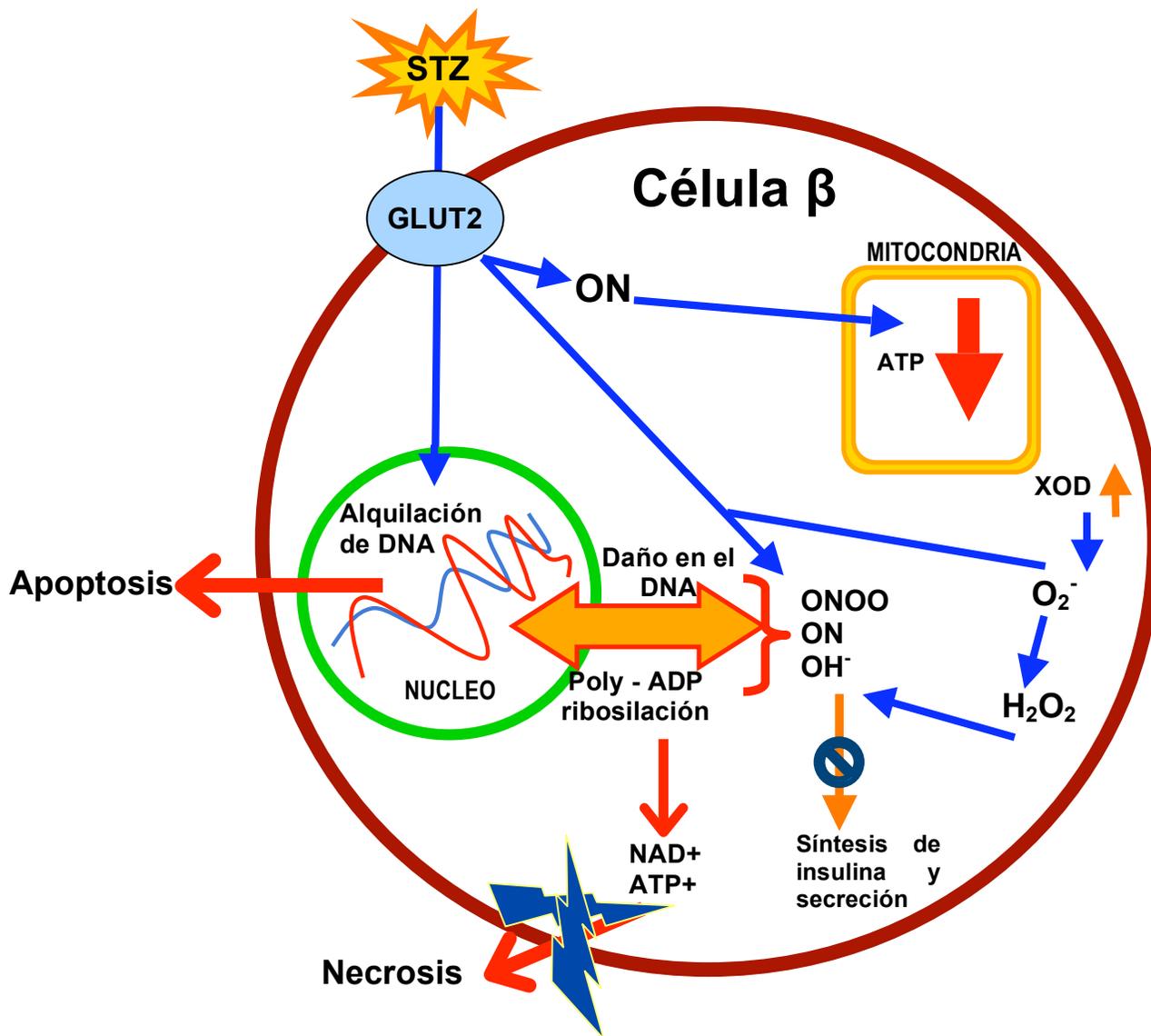


Figura 19. Esquema del mecanismo de acción de la STZ en una célula β (82).

IV DIABETES Y DESARROLLO

4.1 Diabetes inducida y Desarrollo

Los experimentos realizados en animales con diabetes inducida por STZ han demostrado la presencia de malformaciones congénitas y reabsorciones; retardo y aumento en el crecimiento de los productos, y un periodo de gestación mas largo de lo normal (78, 83, 84, 85).

Sybulski y Mughan en 1971, no observaron malformaciones congénitas en fetos de ratas diabéticas tratadas con STZ (86).

Deuchar en 1977, obtuvo un incremento en las frecuencias de reabsorciones y malformaciones congénitas en fetos de ratas tratadas con aloxana y STZ (87).

Ericsson en 1983 describió el síndrome de malformación (síndrome de regresión caudal) en ratas, similar a lo que presentan humanos de madres diabéticas (88).

Se sabe de una gran variedad de anormalidades afectan a los productos de madres diabéticas; entre las más comunes están: defectos cráneo-encefálicos, holoprosencefalia, defectos cardiacos, síndrome de regresión caudal, ágenesia renal, defectos gastrointestinales y la presencia de una sola arteria umbilical, entre otros (89, 90), (Cuadro 5).

La malformación que está mas estrechamente asociada con la diabetes materna es el síndrome de regresión caudal, este síndrome es definido como el subdesarrollo de las extremidades inferiores, y está a veces acompañado por un mal desarrollo de la cadera, sacro y tractos urinario y genital (91).

Los estudios sobre la alteración morfológica de la placenta en ratas diabéticas (92, 93, 94), han enfatizado el papel que juega ésta sobre la transferencia de grandes cantidades de glucosa a fetos de ratas diabéticas, donde se observa que las placentas de ratas diabéticas son más grandes y pesadas que las de ratas controles desde el día 16 hasta el 22, así como su contenido de DNA (83). Las placentas de madres diabéticas también acumulan grandes cantidades de glucógeno, por consecuencia de la hiperglucemia materna (95). Estas placentas presentan anormalidades estructurales como: degeneración cística del espongiotrofoblasto, aumento en el volumen de la capa laberíntica e hipervascularización, así como la presencia de células gigantes del trofoblasto en etapas que no deberían presentarse (83, 93, 94).

La hiperglucemia, inducida por STZ o por una infusión de glucosa, durante la gestación tiene profundos efectos sobre el metabolismo y desarrollo fetal. Las alteraciones en la homeostasis de la glucosa persisten hasta la vida adulta e incluso en la segunda y tercera generación (83).

Cuadro 5. Principales alteraciones de hijos de madres diabéticas (89, 96).

SISTEMA	ALTERACIONES
Músculo – Esquelético	<ul style="list-style-type: none"> ○ Síndrome de la Regresión caudal. (Sirenomelia) ○ Labio leporino con o sin paladar hendido. ○ Costilla Bífida. ○ Costilla “Ondulada”. ○ Polidactilia. ○ Sindactilia.
Sistema Cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> ○ Transposición de los grandes vasos con o sin defectos del septum ventricular. ○ Comunicaciones interventriculares (defecto del septum ventricular). ○ Coartación de la aorta. ○ Comunicaciones inter-auriculares (defectos del septum auricular) ○ Cardiomegalia.
Sistema Nervioso Central	<ul style="list-style-type: none"> ○ Defectos del tubo neural (Holoprosencefalia). ○ Anencefalia con ó sin hernias de elementos neurales. ○ Agenesia del cuerpo calloso ○ Hidrocefalia. ○ Microcefalia.
Sistema Renal	<ul style="list-style-type: none"> ○ Agenesia renal. ○ Riñón poliquístico ○ Displasia cística. ○ Duplicación del uréter. ○ Situs inversu. ○ Hidronefrosis.
Sistema Gastro-Intestinal	<ul style="list-style-type: none"> ○ Atresia duodenal. ○ Atresia anorectal. ○ Síndrome del colon izquierdo pequeño.
Otros.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Macrosomia ○ Retraso en el crecimiento fetal. ○ Pseudohermafroditismo. ○ Arteria umbilical única.

Se ha reportado que las crías de ratas diabéticas presentan alteraciones en el metabolismo después del nacimiento hasta la vida adulta debido a las adaptaciones funcionales durante el desarrollo fetal ocasionadas por la hiperglucemia materna; según varios autores éstas alteraciones en el metabolismo pueden ser un factor de riesgo para padecer, diabetes tipo 2 (97), obesidad, intolerancia a la glucosa; incluso se podrían sumar para ocasionar el síndrome metabólico (98, 99).

El mecanismo que ocasionan todas estas alteraciones en el desarrollo de fetos de madres diabéticas aún no se conoce, sin embargo, parece ser multifactorial.

4.2 Desarrollo del páncreas y diabetes inducida.

Las alteraciones en la relación materno fetal, resultado de la diabetes durante la gestación son frecuentemente citadas como evidencia de la importancia de la glucosa e insulina sobre la modulación del crecimiento fetal (97).

Aunque el incremento de la glucosa fetal y la disponibilidad de insulina resultado de la diabetes en la gestación está estrechamente asociado con el desarrollo de macrosomía fetal, poco se sabe acerca de los mecanismos por los cuales la diabetes materna severa limita el crecimiento fetal (78, 97).

La fetopatía diabética humana es caracterizada por un incremento en el peso fetal, hiperinsulinemia e incremento en el contenido pancreático de insulina (84). Los estudios en animales gestantes han sugerido varios mecanismos del páncreas fetal en desarrollo en respuesta a la diabetes inducida.

Se ha reportado que las porciones endocrinas del páncreas fetal en el último día de la gestación de ratas diabéticas son grandes, indicando una hiperactividad funcional aunque presentan una disminución de la granulación en las células β , que se debe a un agotamiento de la propia función endocrina (100, 101, 102). Eriksson en 1980 (84), reportó que en fetos de 20 días se presenta una alteración selectiva sobre las células β del páncreas en fetos de ratas diabéticas, y observó también que las reservas de glucagón y somatostatina, se mantienen en un rango normal.

Un medio intrauterino anormal, puede deberse a una deficiencia proteica en la alimentación ó a una mala transferencia de nutrientes maternos; como en la diabetes materna, que ocasiona diferentes alteraciones dependiendo de la cantidad de glucosa que llega al feto (99).

Una elevación moderada ($\pm 20\%$) en las concentraciones de glucosa materna y por ende en las concentraciones de glucosa fetal inducen un incremento en el número y actividad biosintética de las células β fetales. La respuesta de la insulina a las concentraciones de glucosa fetal *in vivo* e *in vitro*, se incrementa en ratas diabéticas moderadas (103).

En una hiperglucemia severa en ratas gestantes da por resultado una hiperglucemia e hipoinsulinemia en los fetos así como una retardación del crecimiento fetal. El peso pancreático es disminuido pero el porcentaje de tejido endocrino está incrementado.

Las células β son sobre estimuladas y muestran una degranulación por microscopía electrónica: un fenómeno de agotamiento celular β , que es, probablemente el causante de la disminución en las concentraciones de insulina pancreática y plasmática.

Las células β de fetos severamente hiperglucémicos son incapaces de secretar insulina *in vivo* e *in vitro*, indicando que el páncreas es insensible a la glucosa (103).

V JUSTIFICACION

La Diabetes materna provoca un ambiente intrauterino anormal que afecta la diferenciación y desarrollo del feto, provocando gestaciones prolongadas, un incremento en el número de reabsorciones, un menor número de crías y un incremento de malformaciones congénitas.

La diferenciación y desarrollo del páncreas, órgano implicado en la homeostasis de la glucosa, se ve severamente afectado por la hiperglucemia materna.

Sin embargo pocos estudios reportan el efecto de la hiperglucemia materna en las etapas tempranas de la diferenciación del páncreas. La mayoría analizan sus efectos en los últimos días de gestación (19, 20 y 21 días).

Teniendo en cuenta que el primordio dorsal del páncreas aparece en el día 12 de gestación en rata, y que el primordio ventral aparece un día después, para fusionarse entre los días 14-15 de gestación, es importante analizar el proceso de diferenciación desde esta etapa del desarrollo y hasta el final de la gestación (104).

VI HIPÓTESIS

La diabetes materna ocasionará alteraciones en la diferenciación del páncreas fetal que repercutirán en su funcionamiento.

VII OBJETIVOS

7.1 General

- Analizar los cambios estructurales del páncreas fetal de productos de madres con diabetes inducida con STZ los días 15, 17, 19 y 21 de gestación y 1er. día de vida extrauterina (1dV.E.U); y correlacionarlo con la producción de insulina.

7.2 Particulares

- Comparar la diferenciación del páncreas fetal de productos de ratas diabéticas y sanas en los días 15, 17, 19 y 21 de gestación y 1d V.E.U.
- Determinar el efecto de la diabetes materna sobre la producción de insulina del páncreas fetal de 15, 17, 19 y 21 días de gestación y 1d V.E.U y compararla con la de productos de ratas sanas en los mismos tiempos.

VIII MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Animales

Se utilizaron 13 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 200-300g que permanecieron en condiciones controladas de bioterio con una temperatura de 22°-25°C, con un periodo de luz-oscuridad de 12/12 hrs. con acceso a alimento y agua *ad libitum* en el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS).

Se aparearon con machos de fertilidad comprobada toda una noche en una relación de 3 hembras con un macho. Al día siguiente se les realizó un frotis vaginal, la presencia de tapón vaginal mucoso y/o espermatozoides en el frotis vaginal determinó a éste como el primer día de gestación.

Se formaron 2 lotes, los cuales estuvieron conformados por: 5 ratas lote control (LC); y 8 ratas lote experimental (LE).

A todos los animales en el tercer día de gestación, se pesaron y se les tomó la concentración de glucosa sanguínea de la vena caudal; y a las ratas del lote Control se les administró una dosis única intraperitoneal de acuerdo a su peso de amortiguador de acetatos 0.1M con pH 4.3 (Anexo 1).

8.2 Grupo Experimental

A las ratas del Lote Experimental, al tercer día de gestación se les administró una dosis única intraperitoneal de 50mg/Kg. de peso de STZ en amortiguador de acetatos 0.1M con pH 4.3, 48 horas después de la inyección, se les tomó la concentración de glucosa sanguínea y se determinaron diabéticas aquellas que presentaban una concentración de glucosa sanguínea ≥ 200 mg/dl. Todas las hembras gestantes se colocaron en jaulas individuales.

A cada rata de los 2 lotes, se les determinó glucosa basal y peso cada 3er. día por la mañana hasta el día de su sacrificio, la toma de glucosa se obtuvo por medio de una pequeña incisión en la vena caudal, la medición se realizó por medio de un Glucómetro Elite Marca Bayer® y con tiras reactivas Ascencia Elite Marca Bayer®, el peso fue obtenido por medio de una báscula marca Ohaus®.

Fueron sacrificadas a partir del día 15 de gestación por dislocación cráneo-cervical, realizándoles una disección abdominal.

Los días de sacrificio fueron equivalentes a los siguientes días de gestación utilizados en el estudio: 15, 17, 19, 21, y 1d V.E.U.

De las madres se obtuvo:

- muestra de sangre a partir de la aorta.
- el páncreas, que fue removido con parte del duodeno y otra del bazo.
- el útero para la localización y arreglo de los fetos y/o reabsorciones.

Se registró el número de fetos, su distribución en los cuernos uterinos, y número de reabsorciones. Los dos cuernos uterinos se fijaron en Formol Buffer con pH 7.2 (Anexo 1) y los fetos fueron numerados a partir del cuerno derecho.

Después de 24 horas fueron separados del útero, saco vitelino, placenta y cordón umbilical,

para registrar:

-Peso

-Tamaño (s):

Cabeza, cabeza-rabadilla, y cola.

-Alguna malformación congénita.

Los fetos y crías se fijaron en Formol Buffer con pH 7.2 (Anexo 1), y 3 de cada camada fueron fijados en solución de Bouin (Anexo 1).

8.3 Parámetros Bioquímicos.

La sangre obtenida fue centrifugada a 3500 r.p.m. por 10 minutos (en una centrífuga marca Beckman® GS-15R), se separó el suero y se congeló a -70°C para análisis posterior de glucosa sérica, triglicéridos, VLDL (Proteínas de muy baja densidad) y colesterol.

Las determinaciones de estos parámetros bioquímicos se realizaron por medio de química seca en el analizador Kodak® Ektachem DT 60II.

Glucosa: Reacción en la que la glucosa de la muestra reacciona con el oxígeno en presencia de glucosa oxidasa.

Triglicéridos: Separación de los triglicéridos de los acarreadores lipoprotéicos, los triglicéridos son hidrolizados por una lipasa y se retiran los residuos de ácido ascórbico con ascorbato oxidasa.

Colesterol: El colesterol se disocia de los acarreadores de lipoproteínas. Los ésteres de colesterol se hidrolizan a colesterol libre que se oxida con colesterol oxidasa. La reacción final produce color a través de la cual se calcula la cantidad de colesterol presente.

8.4 Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar (E.E). Se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías; se utilizó el programa estadístico SPSS ver.10 . Así como una post-prueba de Bonferroni para la comparación específica de los grupos. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de $p \leq 0.05$.

8.5 Microscopia de Luz

Para el análisis histológico las muestras tisulares se lavaron, se deshidrataron en alcoholes graduales y se incluyeron en paraplast (Sigma®). Se realizó la inclusión de los fetos de la siguiente manera:

Fetos de 15 y 17 días de gestación fueron incluidos completamente en paraplast; mientras los de 19, 21, y 1dV.E.U se les realizó una disección en la parte abdominal con un bisturí para la obtención del tracto gastrointestinal y después se extrajo el páncreas y se incluyó de igual manera en paraplast.

Se realizaron cortes en micrótopo de rotación de 5 μ m, que se tiñeron con:

-Hematoxilina-Eosina (Anexo 2): La cual, permite observar la estructura general del órgano.
-Método ó Tinción de Gomori para Islotes Pancreáticos (Anexo 2): permite observar la diversidad celular de los islotes de Langerhans, tiñendo las células α , β y δ de distintos colores.

8.6 Inmunohistoquímica

De los fetos obtenidos del lote Control y lote Experimental se tomaron 4 cortes de 5 μm que fueron procesados para este tipo de técnica.

Los cortes fueron montados en portaobjetos pre-tratados con Poly-L-lisina (Sigma®) en concentración 1:10, por 30 minutos a temperatura ambiente.

Los cortes para este método, se hidrataron e incubaron por 30 min. en H_2O_2 (peróxido de Hidrógeno) al 3% (Anexo 3), después fueron lavados en solución PBS-Tween al 0.1% (Anexo 3). Se realizó el bloqueo de proteínas no específicas por medio del bloqueador de proteínas (Dako® X0909); se decantó el exceso y se incubó el anticuerpo primario: Anti-insulina (Lt.1379P301) anti-ratón Cocktail Ab-6 (Lab Vision Fremont, CA) en una dilución 1:250 μl (PBS-Tween al 0.1%) por 40 min. a temperatura ambiente .

Se lavaron con sol. PBS-Tween al 0.1% y se incubó el segundo anticuerpo HRP⁺ (Dako® K1490, anticonejo), por 30 min. a temperatura ambiente. Se reveló con el método sustrato-cromógeno DAB⁺ (Cromógeno de Diaminobenzidina, Dako®. K3467). Los cortes fueron contrastados con hematoxilina. Se deshidrataron en alcoholes graduales y se montaron con Entellan (Sigma®).

El anticuerpo fue probado mínimo en un corte de cada porta objetos. Otro corte fue utilizado como control negativo para el anticuerpo primario para conocer su especificidad, el cual fue incubado con sol. PBS-Tween al 0.1%.

La obtención de fotografías de microscopia de luz e inmunohistoquímica se realizó por medio de un microscopio marca Nikon® Eclipse E400 y una cámara digital Cybershot de Sony® en objetivos de 20x y 40x. Las fotos obtenidas fueron editadas con el programa Photoshop de Adobe®.

IX RESULTADOS.

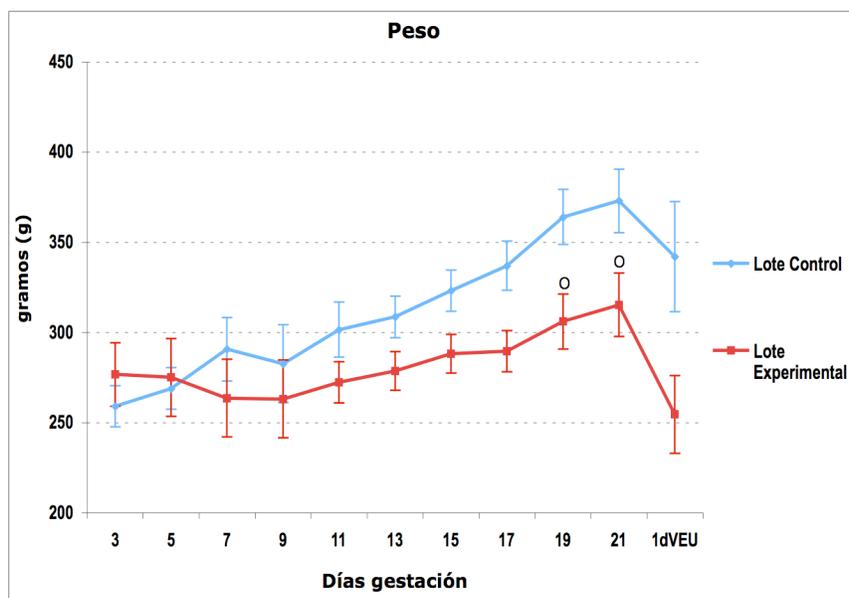
9.1 Peso

Conforme la gestación avanzó las ratas del LC presentaron una ganancia de peso progresiva hasta al final de la gestación; mientras que las ratas del LE iniciaron un aumento progresivo de peso a partir del día 11 de gestación, aunque siendo inferior con respecto al LC. Se presentó una diferencia estadísticamente significativa hasta los días 19 y 21 de gestación (control= 364 ± 15.246 g vs experimental= 306 ± 15.246 g; control= 373 ± 17.605 g vs experimental= 315.30 ± 17.605 g $p < 0.05$, respectivamente), (Tabla 1, Gráfica 1).

Día de Gestación	Peso (g)	
	Lote Control	Lote Experimental
3	259.00 ± 11.525	276.67 ± 17.605^{NS}
5	268.86 ± 11.525	275.00 ± 21.562^{NS}
7	290.67 ± 17.605	263.50 ± 21.562^{NS}
9	282.60 ± 21.562	263.00 ± 21.562^{NS}
11	301.50 ± 15.246	272.29 ± 11.525^{NS}
13	308.57 ± 11.525	278.63 ± 10.781^{NS}
15	323.14 ± 11.525	288.13 ± 10.781^{NS}
17	337.00 ± 13.637	289.57 ± 11.525^{NS}
19	364.00 ± 15.246	$306.00 \pm 15.246^{\circ\circ}$
21	373.00 ± 17.605	$315.33 \pm 17.605^{\circ\circ}$
1d.V.E.U.	342.00 ± 30.493	254.50 ± 21.562^{NS}

Tabla 1. Peso de las ratas durante la gestación. Datos expresados como promedio \pm E.E.
 $^{\circ\circ}P < 0.05$. LC vs. LE. NS No significativo.

Después del nacimiento, las ratas de los dos lotes disminuyeron de peso sin diferencia significativa (control= 342.00 ± 30.493 g; experimental= 254.50 ± 21.562 g) siendo más ligeras las del LE.



Gráfica 1: Peso materno durante la gestación. Datos expresados como promedio \pm E.E. LC vs. LE. $^0P < 0.05$.

9.2 Glucosa

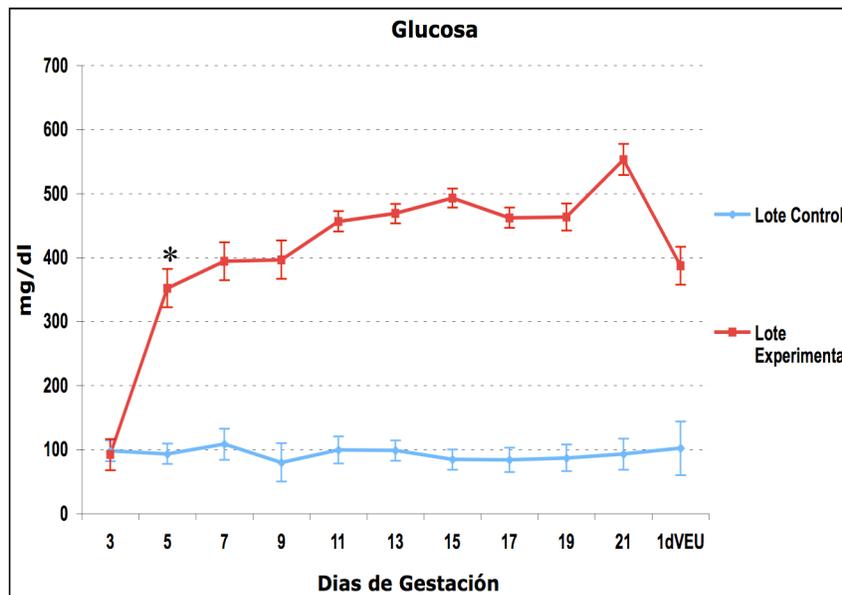
A partir del día 5 de gestación hasta el último día del experimento (1d.V.E.U.) los niveles de glucosa sanguínea en las ratas del LE fueron estadísticamente significativos con respecto a los niveles que presentó el LC, (Tabla 2).

Día de Gestación	Glucosa sanguínea (mg/dl)	
	Lote Control	Lote Experimental
3	98.29 \pm 15.919	92.00 \pm 24.316 ^{NS}
5	93.29 \pm 15.919	352.00 \pm 29.781*
7	108.33 \pm 24.316	394.00 \pm 29.781*
9	80.00 \pm 29.781	396.50 \pm 29.781*
11	99.50 \pm 21.059	456.43 \pm 15.919*
13	98.43 \pm 15.919	468.50 \pm 14.891*
15	84.43 \pm 15.919	492.50 \pm 14.891*
17	83.80 \pm 18.835	461.86 \pm 15.919*
19	87.00 \pm 21.059	463.00 \pm 21.059*
21	93.00 \pm 24.316	553.00 \pm 24.316*
1d.V.E.U.	102.00 \pm 29.781	387.50 \pm 29.781*

Tabla 2. Glucosa sanguínea durante la gestación. Datos expresados como promedio \pm E.E. LC vs. LE. * $P < 0.001$. ^{NS} No significativo.

En la gestación, las ratas del LE desde el día 7 presentaron un aumento progresivo en los niveles de glucosa hasta el día 15 de gestación llegando a niveles de 492.50 ± 14.891 mg/dl, aunque los siguientes dos días (17 y 19) disminuyeron (461.86 ± 15.919 y 463.00 ± 21.059 mg/dl, respectivamente), conforme progresó la gestación llegaron a alcanzar niveles de 553 ± 24.316 mg/dl (día 21).

Para el tiempo de 1d.V.E.U. después del parto, los niveles de glucosa del LC presentaron un ligero aumento, mientras que en el LE el nivel de glucosa descendió (control= 102.00 ± 29.781 vs. experimental= 387.50 ± 29.781 mg/dl; $p < 0.001$) sin dejar de representar un estado hiperglucémico, (Gráfica 2).



Gráfica 2. Niveles de glucosa sanguínea a través de la gestación. Datos expresados como promedio \pm E.E. *Desde este día. LC vs. LE. $P < 0.001$.

9.3 Química sanguínea

Los parámetros bioquímicos sanguíneos registrados fueron: glucosa sérica, colesterol, triglicéridos y VLDL y sólo en los días: 15, 17, 19, 21 de gestación y 1d.V.E.U. Las concentraciones obtenidas se muestran en la Tabla 3.

Día de Gestación	Glucosa sérica (mg/dl)		Colesterol (mg/dl)		Triglicéridos (mg/dl)		VLDL (mg/dl)	
	LC	LE	LC	LE	LC	LE	LC	LE
15	172	612	-----	-----	355	305	71	73
17	167	608	52	100.3	306	375	61	65.6
19	138	610	58	147	183	488.5	37	80
21	175	600	71	171	396	1775	79	355
1d.V.E.U.	151	544	74	55	355	223.5	71	45

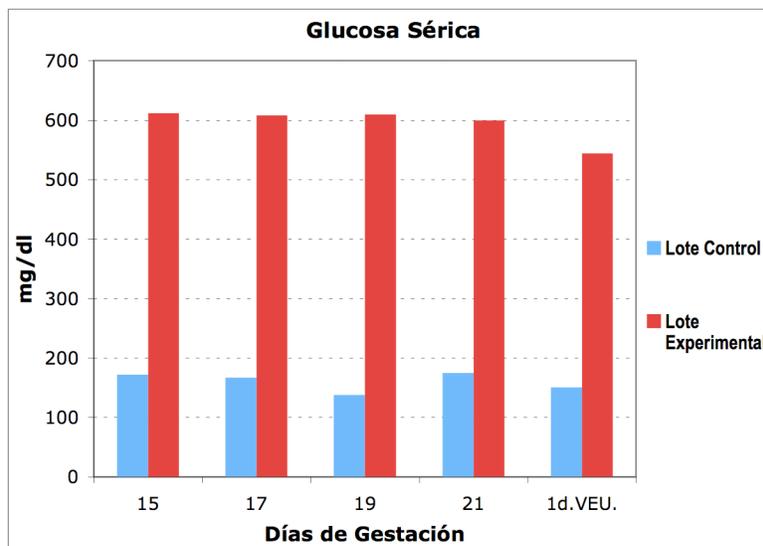
Tabla 3: Concentraciones de los cuatro parámetros bioquímicos obtenidos en la última semana de gestación. Datos expresados como promedio.

9.3.1 Glucosa Sérica

La glucosa sérica al igual que la glucosa sanguínea confirmó un estado hiperglucémico severo en los animales del LE en la última semana de gestación.

Las ratas del LE presentaron niveles ≥ 600 mg/dl en los días 15 (612mg/dl), 17 (608 mg/dl), 19 (610 mg/dl), y 21 (600 mg/dl). Mientras que los niveles del LC no rebasaron los niveles de 175mg/dl los días: 15 (172 mg/dl), 17(157 mg/dl), 19(138 mg/dl), y 21(175 mg/dl).

Para 1d.V.E.U. la glucosa sérica en las ratas del LC se mantuvo en niveles por debajo de los 175mg/dl (151mg/dl); mientras en el LE descendió a niveles de 544mg/dl. (Gráfica 3).



Gráfica 3. Niveles de glucosa sérica en la última semana de gestación. Datos expresados como promedio.

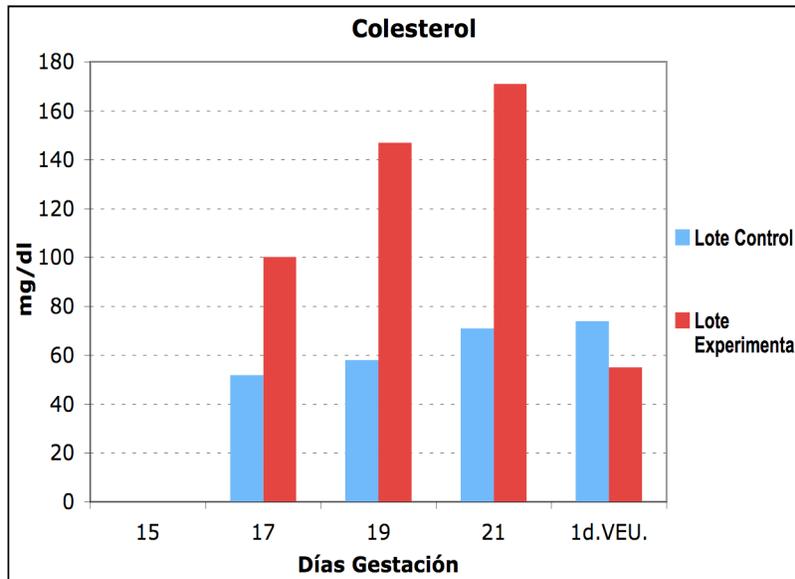
9.3.2 Colesterol

Las concentraciones de colesterol se elevaron conforme progresó la gestación. En el día 15 los niveles de este lípido fueron bajos para el rango de medición del analizador químico.

En el día 17, los niveles de colesterol en el LE fueron el doble de concentración del LC (control= 52 mg/dl , experimental= 100mg/dl).

En el día 19, los niveles aumentaron progresivamente en LE representando valores más del doble que los del LC (control= 58 mg/dl, experimental= 147mg/dl); sobre el día 21 el aumento en los niveles de colesterol del LE siguió representando valores del doble de concentración del LC (control= 71 mg/dl, experimental= 171mg/dl.)

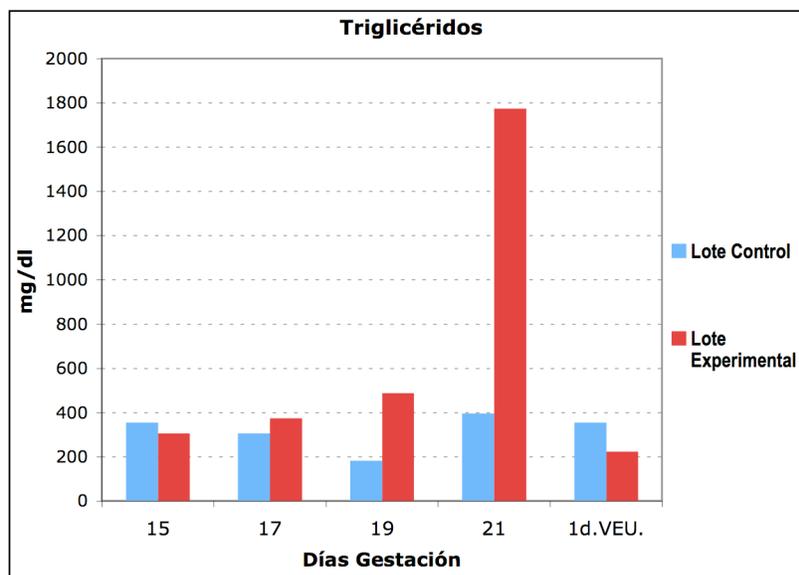
Al término de la gestación, en el 1d.V.E.U., los niveles de colesterol disminuyeron en los dos lotes (control= 74 mg/dl; experimental= 55 mg/dl) siendo mas bajos los niveles del LE. (Grafica 4).



Grafica 4. Niveles de colesterol hacia finales de la gestación. Datos expresados como promedio.

9.3.3 Triglicéridos

Las concentraciones de triglicéridos en el LC fueron en el día 15 de 355 mg/dl, en 17 días de 306 mg/dl, 19 días disminuyeron a 183 mg/dl y en 21 días de gestación se presentaron los niveles más altos de estos lípidos: 396 mg/dl. A diferencia del LC, en el LE los niveles de estos lípidos presentaron niveles arriba de los 300 mg/dl desde el día 15 de gestación: 305 mg/dl; aumentando de forma gradual los días 17: 375mg/dl y 19: 488.5mg/dl. En el día 21 de gestación los triglicéridos llegaron a alcanzar valores de 1775 mg/dl. Para el 1d.V.E.U. los triglicéridos descendieron a valores de 355 mg/dl para el LC y 223.5 mg/dl para el LE. (Grafica 5).



Grafica 5. Niveles de triglicéridos hacia el final de la gestación. Datos expresados como promedio.

9.3.4 VLDL

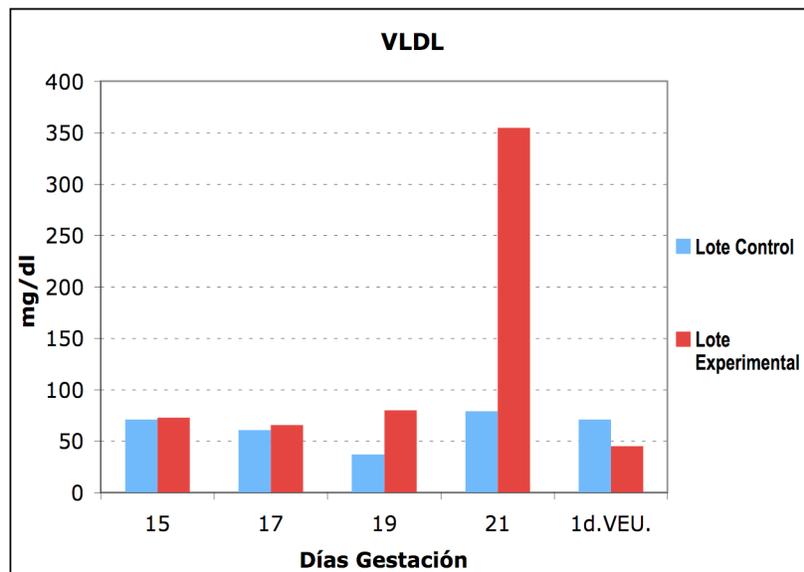
Las lipoproteínas de muy baja densidad, se calculan basándose en los niveles de triglicéridos, por lo que nos muestra, un comportamiento similar durante y después de gestación, aunque sus concentraciones fueron distintas.

Para el día 15 de gestación, el LE presenta niveles de concentración similares al del LC (control= 71mg/dl, experimental= 73mg/dl); y en el día 17 (control= 61mg/dl, experimental= 65.5 mg/dl).

En el día 19 de gestación se presentó un aumento en los niveles del LE (80 mg/dl) llegando a ser más del doble de la concentración del LC (37 mg/dl). Grafica 6.

En el último día de gestación (21) los niveles de VLDL aumentaron drásticamente llegando a valores de 79mg/dl en el LC y a 355 mg/dl para el LE, representando más del cuádruple de las concentraciones del LC.

En el 1d.V.E.U. en los dos lotes se observó un descenso en los niveles de estas lipoproteínas, llegando a ser más marcado en el LE que en el LC (control= 71 mg/dl, experimental= 45 mg/dl). (Grafica 6).



Grafica 6. Niveles de VLDL hacia el final de la gestación. Datos expresados como promedio.

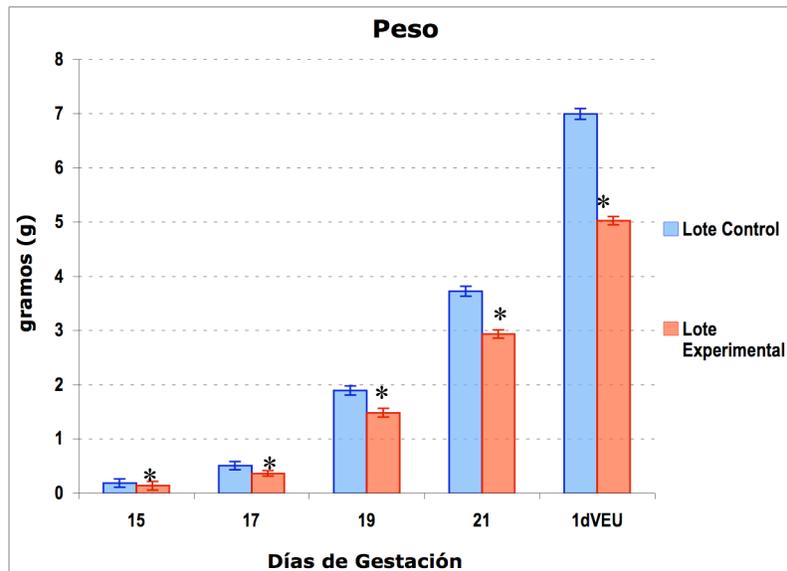
9.4 Fetos

9.4.1 Peso

El promedio de peso de los fetos fue significativamente bajo en el LE en comparación con los pesos de los fetos de LC $p < 0.001$. De manera similar el promedio de peso de las crías del LE fue significativamente menor que el que presentaron las crías del LC $p < 0.001$ (Tabla 4, Grafica 7).

Tabla 4 . Peso de fetos y crías de 1d.V.E.U. * $p < 0.001$ LC vs. LE.

Día Gestación	Lote Control (gramos)	Lote Experimental (gramos)
15	0.18 ± 0.077	$0.13 \pm 0.077^*$
17	0.50 ± 0.077	$0.36 \pm 0.05^*$
19	1.89 ± 0.084	$1.48 \pm 0.08^*$
21	3.72 ± 0.092	$2.93 \pm 0.077^*$
1d.V.E.U.	6.99 ± 0.098	$5.02 \pm 0.077^*$



Grafica 7. Peso de fetos en la última semana de gestación. Datos expresados como promedio \pm E.E. LC vs. LE. * $P < 0.001$.

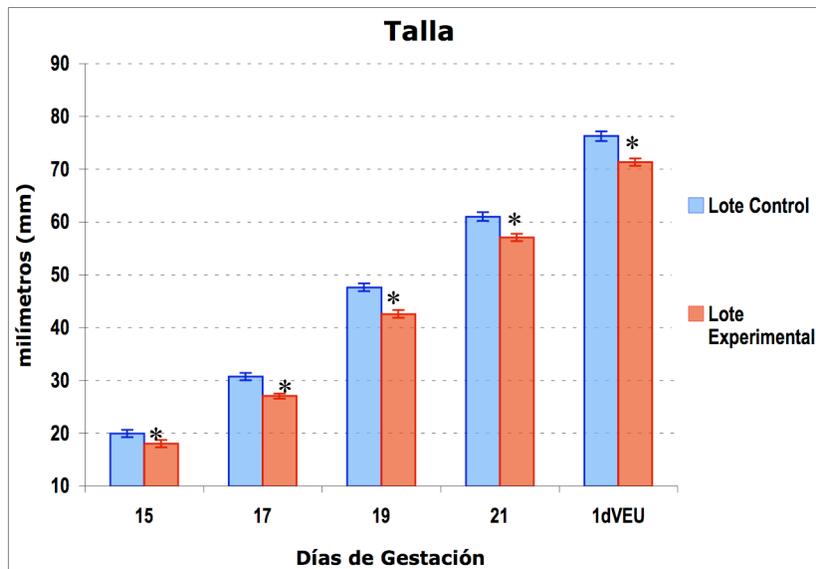
9.4.2 Talla

La talla de los fetos y crías de los dos lotes, fue obtenida sumando las medidas de: cabeza, cabeza- rabadilla y cola.

La talla de los fetos del LE fue significativamente menor a la que presentaron los fetos del LC $p < 0.001$. Al igual, las crías del LE fueron significativamente mas pequeñas que las crías del LC en el 1er. día de vida extrauterina, (Tabla 5, Grafica 9).

Tabla 5: Talla de fetos y crías de 1d.V.E.U. . * $p < 0.001$ LC vs LE.

Día Gestación	Lote Control (milímetros)	Lote Experimental (milímetros)
15	19.94 ± 0.694	18.03 ± 0.694*
17	30.68 ± 0.694	27.01 ± 0.45*
19	47.60 ± 0.755	42.55 ± 0.722*
21	60.99 ± 0.885	57.03 ± 0.694*
1d.V.E.U.	76.23 ± 0.885	71.33 ± 0.694*



Gráfica 8. Talla de los fetos al final de la gestación. Datos expresados como promedio ± E.E. LC vs. LE * $P < 0.001$.

Por lo que las crías de madres diabéticas fueron menos pesadas y más pequeñas en comparación con las crías de madres sanas en los tiempos respectivos, (Figura 20).

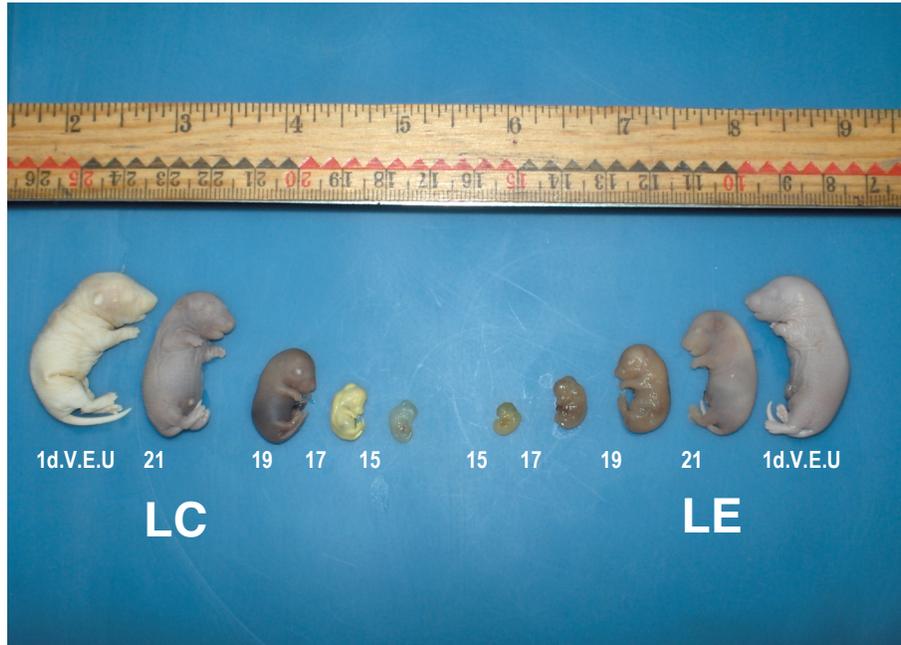


Figura 20. Comparación esquemática de fetos y crías obtenidos en este estudio. Los números debajo de los fetos representan el día de gestación.

9.4.3 Anomalías Congénitas

En el LC no se observó ninguna reabsorción al igual que ninguna presencia de malformación en los fetos y crías (n= 54).

En cambio, en el LE se observó la presencia de reabsorciones (n=18) en 4 gestaciones de las 8 analizadas, 9 reabsorciones en el día 17, 1 en el día 19 y 8 en 21 días.

La presencia de malformaciones congénitas en fetos y crías de gestaciones del LE fueron observadas; de los productos obtenidos en las gestaciones del LE (n=74); 3 presentaron una malformación congénita.

Los fetos con una malformación congénita, presentaron una deformidad en el cierre del tubo neural (fetos de 17 días), uno con una deformación parcial de la cabeza, (Figura 21 A y B); y otro con microcefalia, Figura 21 C y D. El otro caso, fue de un feto de 21 días que presenta una alteración de la región abdominal que se asocia a la diabetes materna: el síndrome de regresión caudal o sirenomelia, (Figura 21 E y F).

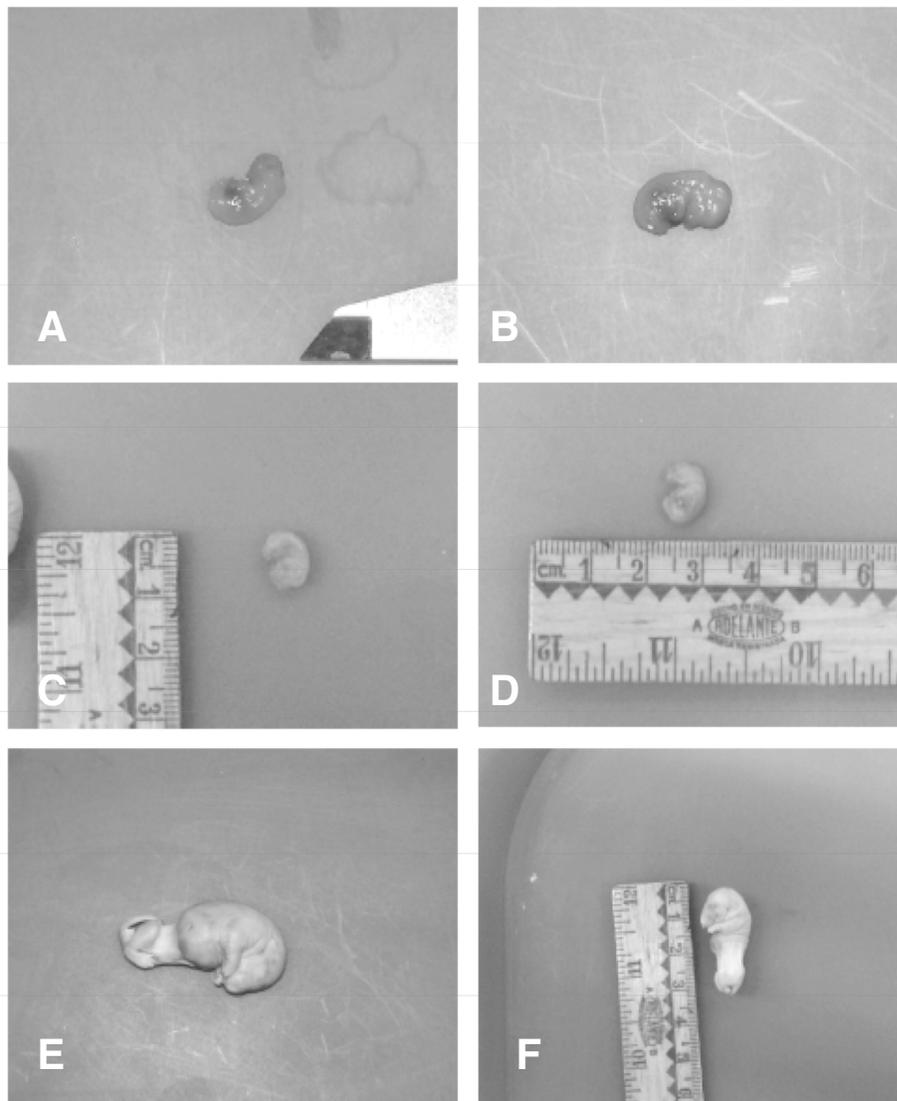


Figura 21. A y B) Feto de 17 días presentando una malformación en la cabeza. **C y D)** Feto de 17 días: Presenta una anencefalia. **E y F)** Feto de 21 días que presenta una anomalía en la parte inferior de la zona abdominal.

9.5 Descripción sobre el desarrollo del páncreas fetal.

Las técnicas de microscopía de luz (H/E y Gomori para islotes pancreáticos) nos permitieron describir y comparar las diferencias morfológicas espacio-temporales sobre el desarrollo de páncreas entre los dos lotes, en la última semana de gestación.

Durante la gestación entre los días 11-12, los dos primordios pancreáticos se presentan como dos protuberancias de tejido conjuntivo (mesenquima) que es un tipo de tejido indiferenciado, compuesto de células estrelladas, irregulares, con un núcleo esférico central y por una sustancia intercelular muy laxa, que forma fibras. Entre los días 14 y 15, los dos primordios se fusionan por la propia rotación del duodeno, originando el páncreas como un órgano único.

15 días de gestación.

Este tiempo se caracterizó por la presencia de dos tipos de tejido: el mesenquima y el tejido epitelial pre-ductal, que se presentó como una agrupación amorfa que estuvo rodeada por la gran masa de mesenquima, el epitelio pre-ductal inició su crecimiento típico de forma ramificadora en el LC, (Figura 22 A).

En el LE, se observó la fusión de los dos primordios pancreáticos. El primordio dorsal presentó agrupaciones de epitelio pre-ductal de diferentes tamaños con una ramificación poco evidente, (Figura 22 B). Los páncreas fetales teñidos con el método de Gomori para células α , β y δ , no mostraron ninguna diferencia entre los dos lotes, (Figura 23 A y B).

17 días de gestación.

En el LC; se observó que las células epiteliales pre-ductales proliferaron, se inició la diferenciación a células de ductos, que se caracterizan por ser un epitelio simple plano, ya que fue evidente la formación de ductos por mecanismos de fusión de asociaciones celulares pre-ductales. La masa de mesenquima disminuyó por la gran proliferación de células pre-ductales y ductales y la diferenciación de acinos pancreáticos, (Figura 22 C).

En el LE se observó un número menor de células ductales lo que implica un atraso en la diferenciación, las pequeñas agrupaciones de células pre-ductales iniciaban la fusión entre ellas, siendo esto un indicador del inicio de la formación de ductos, (Figura 22 D). Al igual que en el tiempo anterior (15 días) la tinción de Gomori para islotes pancreáticos, no presentó diferencias en ninguno de los dos lotes, (Figura 23 C y D).

19 días de gestación.

En el LC las células ductales, se localizaron entre la gran masa de los acinos pancreáticos ya diferenciados (por la presencia de gránulos secretorios). Y son ahora los dos tipos de tejido mas abundantes en el páncreas fetal. Se observa la formación de vasos sanguíneos y en relación estrecha con células ductales. Entre el epitelio ductal, se encontraron células endocrinas en desarrollo asociadas como agrupaciones tipo islotes entre la gran masa acinar, (Figura 22 E).

En el LE, no se observaron agrupaciones tipo islote, pero si la formación de vasos sanguíneos (Figura 22 F). Con la técnica de Gomori, en los páncreas de los LC y LE se pudo observar la diferenciación de las diferentes células endocrinas, siendo mas evidente en el LC que en el LE, (Figura 23 E y F).

21 días de gestación.

En el LC, se observó que los acinos están completamente desarrollados, la glándula presenta su forma típica lóbulo-acinar. Dentro de la población epitelial entre las células de ductos, se presentó una gran proliferación de células endocrinas asociadas a éstas y a capilares sanguíneos. Estas diversas agrupaciones epiteliales presentaron una intensa actividad proliferativa en diversos lugares entre la masa acinar para la formación de futuros islotes, (Figura 22 G).

En el LE se observó la maduración de los acinos pancreáticos, la proliferación de células endocrinas asociadas a epitelio ductal, y vasos sanguíneos, la única diferencia evidente fue

que la actividad proliferativa de células endocrinas fue menor que en el LC pues las células endocrinas estuvieron asociadas todavía a células ductales. Figura 22 H.

Con el método de tinción de Gomori, se observó que en el LC; las células α y células δ (células rojizas-rosadas) se presentaron al igual que las células β (células azul-púrpura), proliferando entre el tejido acinar. En algunos casos estas agrupaciones tenían la forma esférica del tejido endocrino pancreático, (Figura 23 G). En el LE, la presencia de células α , y células δ se encuentran diferenciadas entre el epitelio ductal y en algunos casos se presentan entre el tejido acinar, (Figura 23 H).

Un día de vida extrauterina (1d.V.E.U)

En el páncreas de las crías recién nacidas, del LC se observa la estructura típica de un islote como una agrupación de forma esférica, asociada a capilares sanguíneos y rodeada de tejido exócrino y los acinos presentan ya su forma característica.

Los diferentes tipos celulares del islote se observaron en su disposición característica: las células β se presentaron en el centro del islote, mientras que, el resto de las células endocrinas se arreglaron sobre la periferia, (Figura 22 I).

En los páncreas de recién nacidos del LE, se observó un atraso en la formación de los islotes, presentándose todavía células endocrinas asociadas a ductos, Los escasos islotes formados eran de menor tamaño, (Figura 22 J).

Con el método de tinción de Gomori en el LC se pudo observar la localización típica de los diferentes tipos celulares en los islotes; (Figura 23 I) en el LE no se observó la disposición celular característica en los islotes pues se observaron agrupaciones de células α y δ pero la de células β no estuvo bien distinguida, (Figura 23 J).

En la Tabla 6 se comparan las principales características observadas durante el desarrollo del páncreas entre los dos lotes en los 5 tiempos analizados durante la última semana de gestación de la rata.

Tabla 6. Características distintivas observadas en el desarrollo del páncreas fetal de rata.

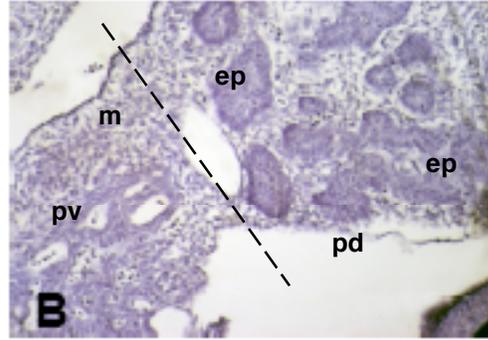
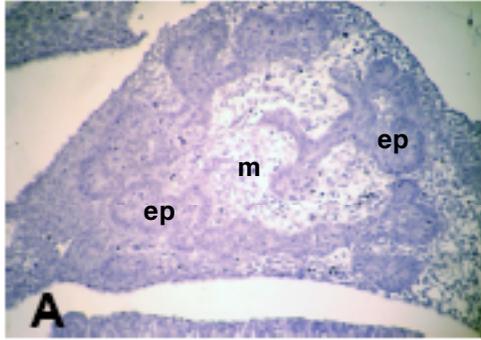
DÍA GESTACIÓN	LOTE CONTROL	LOTE EXPERIMENTAL
15	Primordios pancreáticos fusionados formando un órgano único. Presencia de mesenquima y tejido epitelial pre-ductal. Crecimiento del epitelio pre-ductal en forma ramificadora.	Fusión de primordios pancreáticos no finalizada. Mesenquima representa mayor volumen que el tejido epitelial pre-ductal. Agrupaciones de epitelio pre-ductal de varios tamaños y mecanismo de ramificación poco evidente.
17	Inicia proliferación de células ductales a partir del epitelio pre-ductal. Se observa la formación de ductos pancreáticos. Masa de mesenquima disminuye debido a la proliferación de células pre-ductales y ductales.	Se observa menor número de células de ductos, células pre-ductales inician apenas la diferenciación. Masa celular mesenquimatosa abundante en comparación a la masa de epitelio pre-ductal.
19	Acinos y ductos diferenciados, los dos tipos de tejido mas abundantes. Se observa la presencia de vasos sanguíneos y células endocrinas asociadas a células de ductos y en agrupaciones tipo-islote.	Diferenciación de la masa acinar y de ductos, se observan vasos sanguíneos. Pequeñas agrupaciones de células endocrinas asociadas al epitelio de ductos.
21	Acinos completamente desarrollados (estructura lóbulo-acinar) Aumento en la proliferación de células endocrinas asociadas a epitelio ductal y a vasos sanguíneos; y conformando varias agrupaciones tipo-islote.	Se presenta un retraso en la maduración acinar (sin estructura lóbulo-acinar) Epitelio de ductos y vasos sanguíneos presentes y rodeados por una masa celular endocrina. La proliferación celular endocrina se vio disminuida entre la masa acinar y pequeñas agrupaciones tipo islote fueron observadas.
1d.V.E.U.	Masa pancreática exócrina y endocrina desarrollada por completo, los islotes esféricos y delimitados, la estructura poblacional en éstos delimitada normalmente con células β en el centro resto de células endocrinas en la periferia.	Masa exócrina (acinos y ductos) desarrollada por completo. Atraso en la formación de islotes por la presencia de células endocrinas asociadas a ductos y pequeñas agrupaciones tipo islote son evidentes en comparación como las que se presentan en el LC.

Figura 22. Composición de fotografías del desarrollo del páncreas de rata. Tinción de Hematoxilina- Eosina (H/E). **A)** 15 días LC, 34x, **B)** 15 días LE, 38x, **C)** 17 días LC, 30x, **D)** 17 días LE, 26x, **E)** 19 días LC, 60x, **F)** 19 días LE, 60x. **G)** 21 días LC, 60x, **H)** 21 días LE, 60x. **I)** 1d.V.E.U. LC, 60x y **J)** 1d.V.E.U. LE, 60x. Abreviaciones: **ep**= epitelio pre-ductal, **m**= mesenquima, **pv**= primordio ventral, **pd**= primordio dorsal, **ap**= agrupaciones pre-ductales, **cd**= células de ducto, **d**= ducto, **cai**= células acinares inmaduras, **ce**= células endocrinas, **vs**= vaso sanguíneo, **ati**= agrupaciones tipo – islote, **ac**= acinos pancreáticos e **isl**= islote pancreático. Las flechas señalan las células que representan la abreviatura. La línea punteada en la figura 20B, representa la parte de unión de los dos primordios pancreáticos, para este tiempo.

Figura 23. Composición de fotografías del desarrollo del páncreas de rata. Tinción de Gomori para islotes pancreáticos. **A)** 15 días LC. 68x **B)** 15 días LE. 60x **C)** 17 días LC. 60x **D)** 17 días LE. 68x **E)** 19 días LC. 60x **F)** 19 días LE. 60x **G)** 21 días LC. 60x **H)** 21 días LE. 60x **I)** 1d.V.E.U. LC 60x y **J)** 1d.V.E.U. LE. 60x. Abreviaciones: **ep**= epitelio pre-ductal, **m**= mesenquima, **cd**= células de ducto, **cai**= células acinares inmaduras, **ce**= células endocrinas, α = células alfa, β = células beta, δ = células delta, **d**= ducto, **vs**= vaso sanguíneo, **ati**= agrupaciones tipo – islote, **ac**= acinos pancreáticos e **isl**= islote pancreático. Las flechas señalan las células que representan la abreviatura.

Figura 22

LC



LE

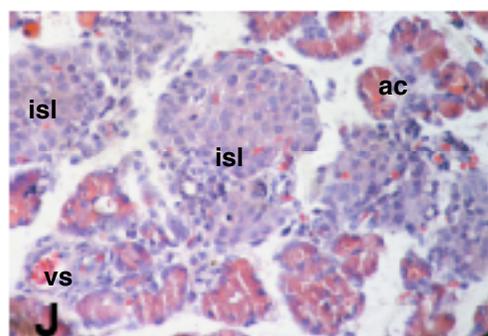
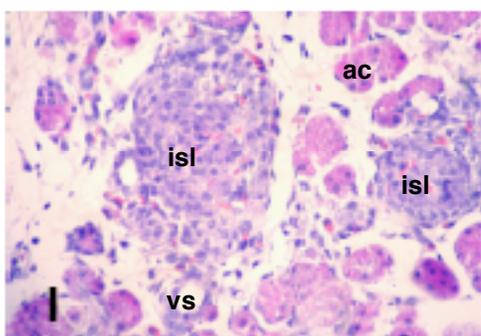
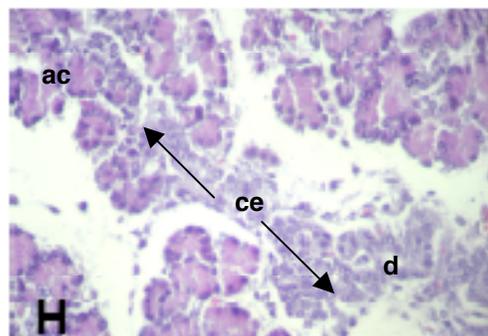
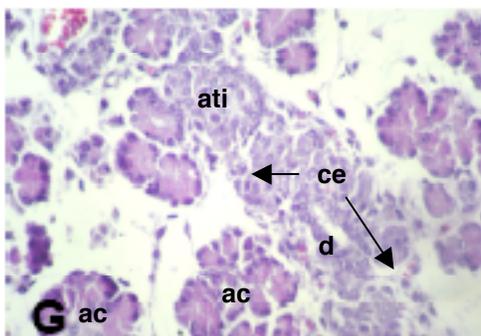
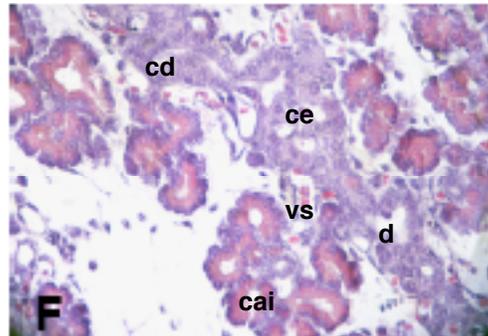
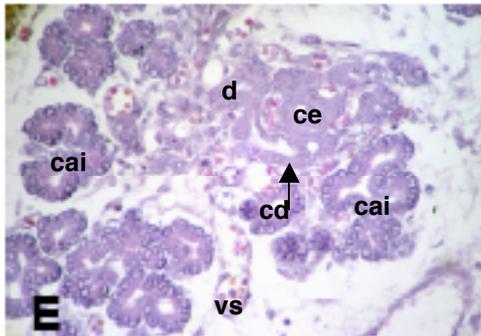
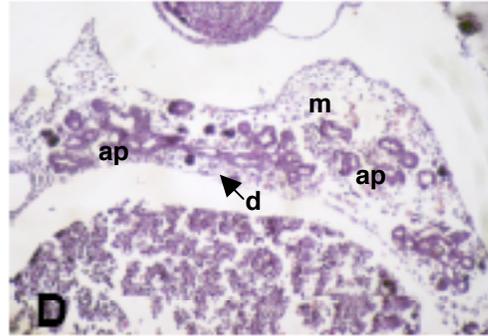
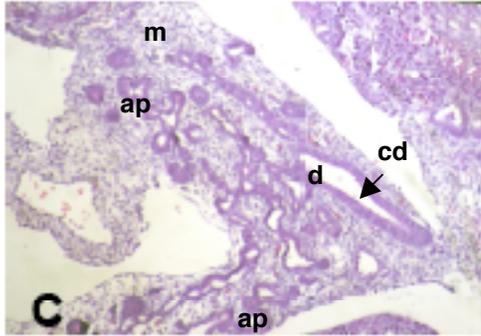
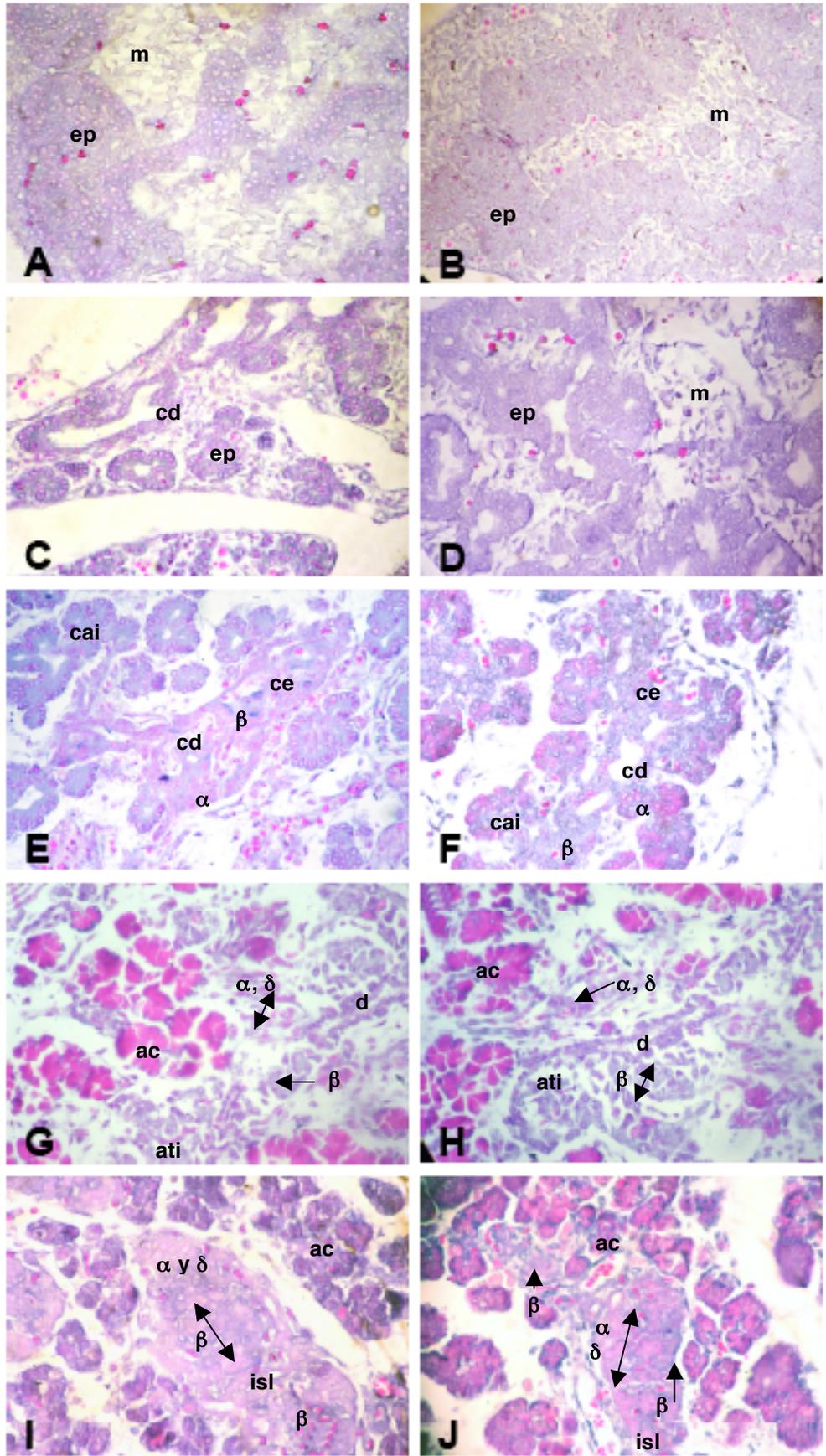


Figura 23

LC

LE



9.6 Inmunohistoquímica para insulina.

La técnica de inmunohistoquímica se realizó para determinar la localización de insulina, intracelular los días 15, 17, 19 y 21 de gestación y 1d.V.E.U, en los páncreas de fetos y crías de ratas de los dos lotes.

15 días de gestación.

La presencia de células positivas a insulina fue escasa en cortes de páncreas fetal del LC, (Figura 24 A y B). Mientras que en el LE se observa mayor cantidad de éste tipo de células (Figura 24 C y D); siendo en algunos casos más evidente la inmunotinción entre las células epiteliales pre-ductales, (Figura 24 E y F).

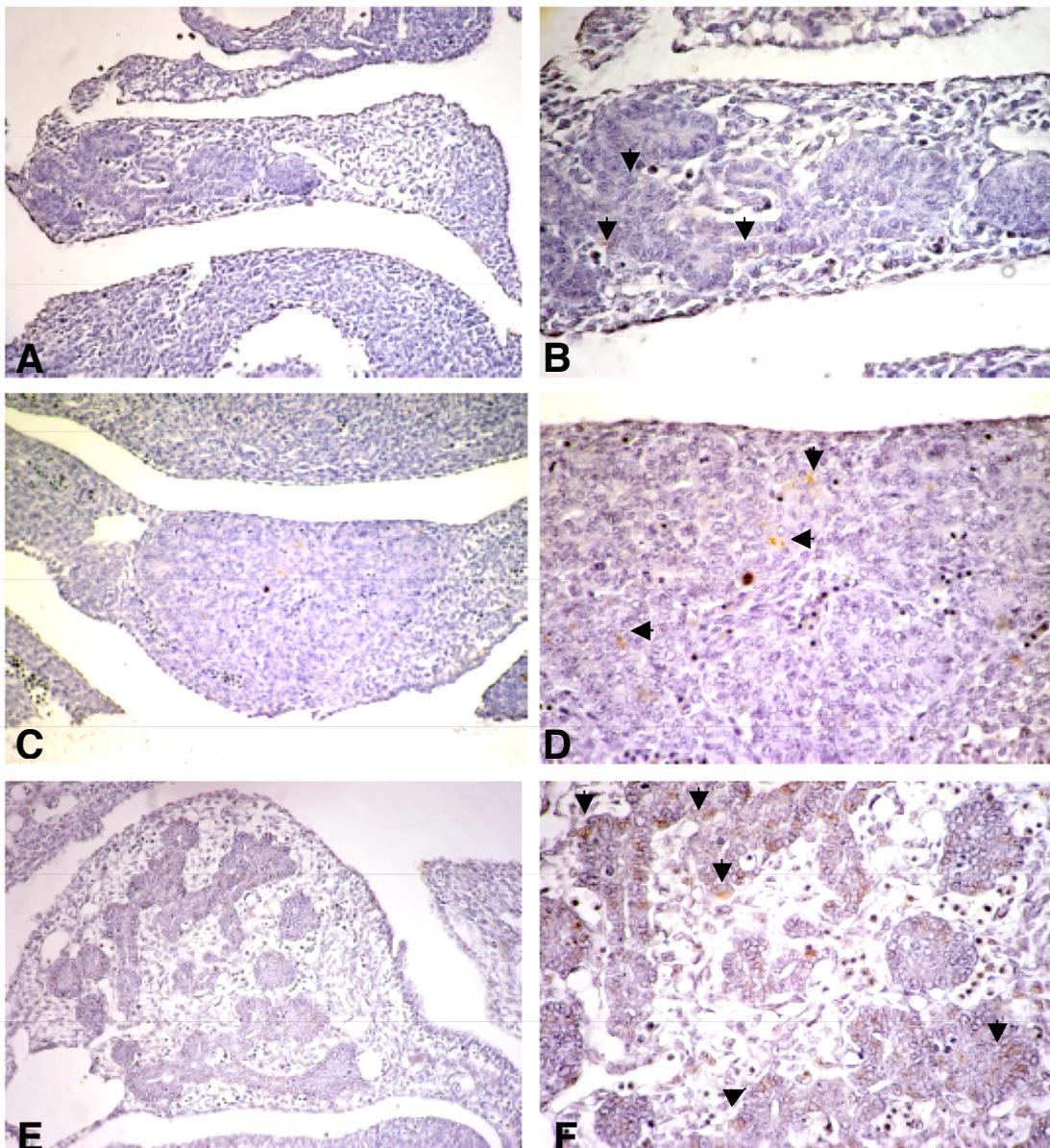


Figura 24. Fotografías de páncreas fetal de 15 días con anticuerpo: anti-insulina y HE. A)LC. 30x. B)LC. 60x, C)LE. 30x. D)LE.60x. E)LE. 30x y F)LE. 68x.

17 días de gestación.

De manera similar, que en el tiempo anterior, los páncreas fetales del LC presentaron pocas células positivas a insulina, (Figura 25 A y B), mientras que en el LE la inmunotinción para insulina fue mas evidente que en el tiempo anterior (Figura 25 C y D), las células endocrinas precursoras se encontraban dispersas entre el epitelio pre-ductal (Figura 25 E y F).

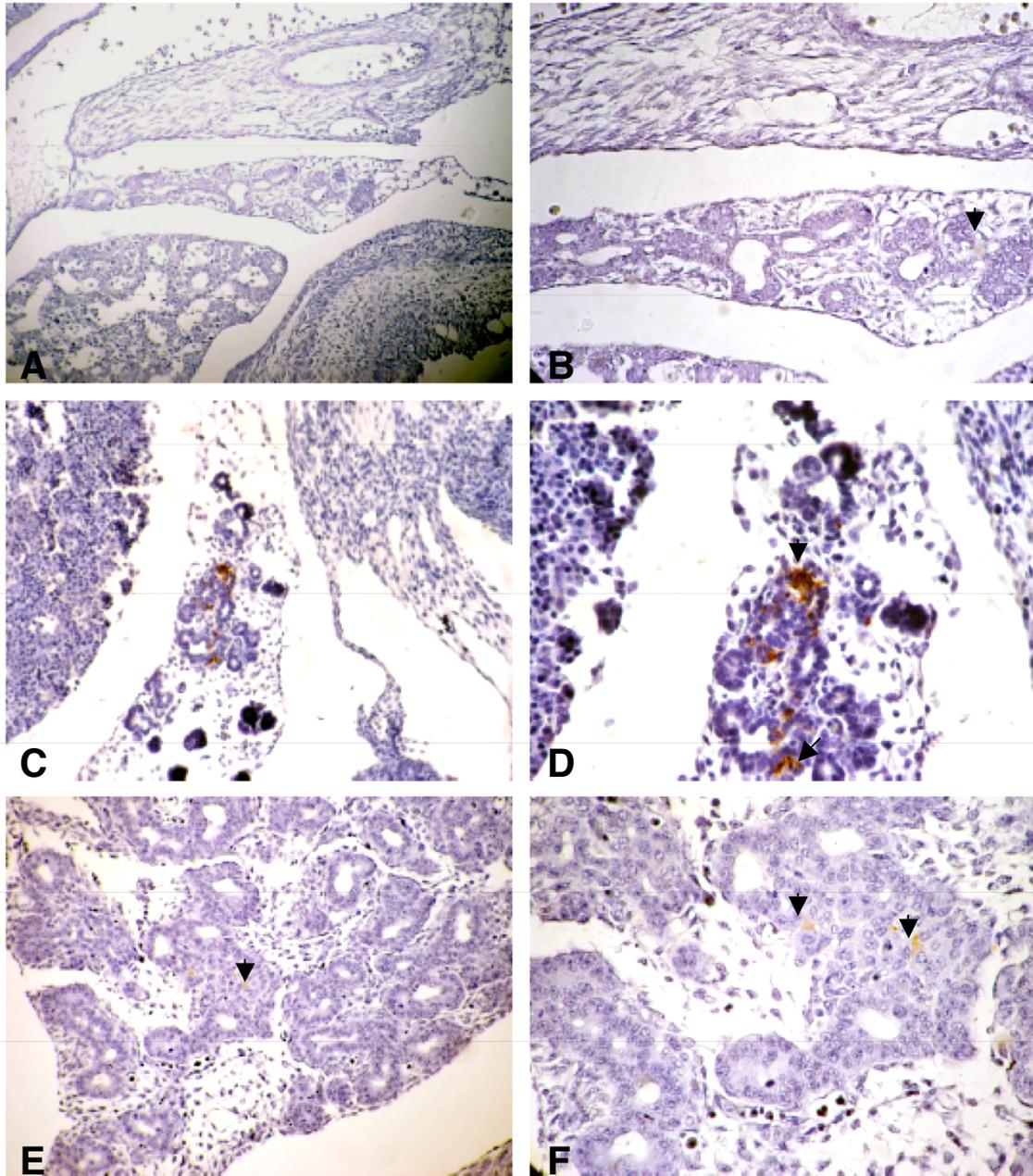


Figura 25. Fotografías de páncreas fetal de 17 días con anticuerpo: anti-insulina y HE.
A)LC. 20x. B)LC. 52x, C)LE. 26x. D)LE.60x. E)LE. 30x y F)LE. 68x.

19 días de gestación.

En este día; en los páncreas fetales del LC se observaron diversas células positivas a insulina entre los grupos de células endocrinas, asociadas a epitelio ductal. (Figura 26 A y B). En el LE observamos que entre las células ductales se encontraban algunas células endocrinas positivas a insulina, (Figura 26 C y E), pero las agrupaciones celulares positivas a insulina fueron menores (Figura 26 D y F).

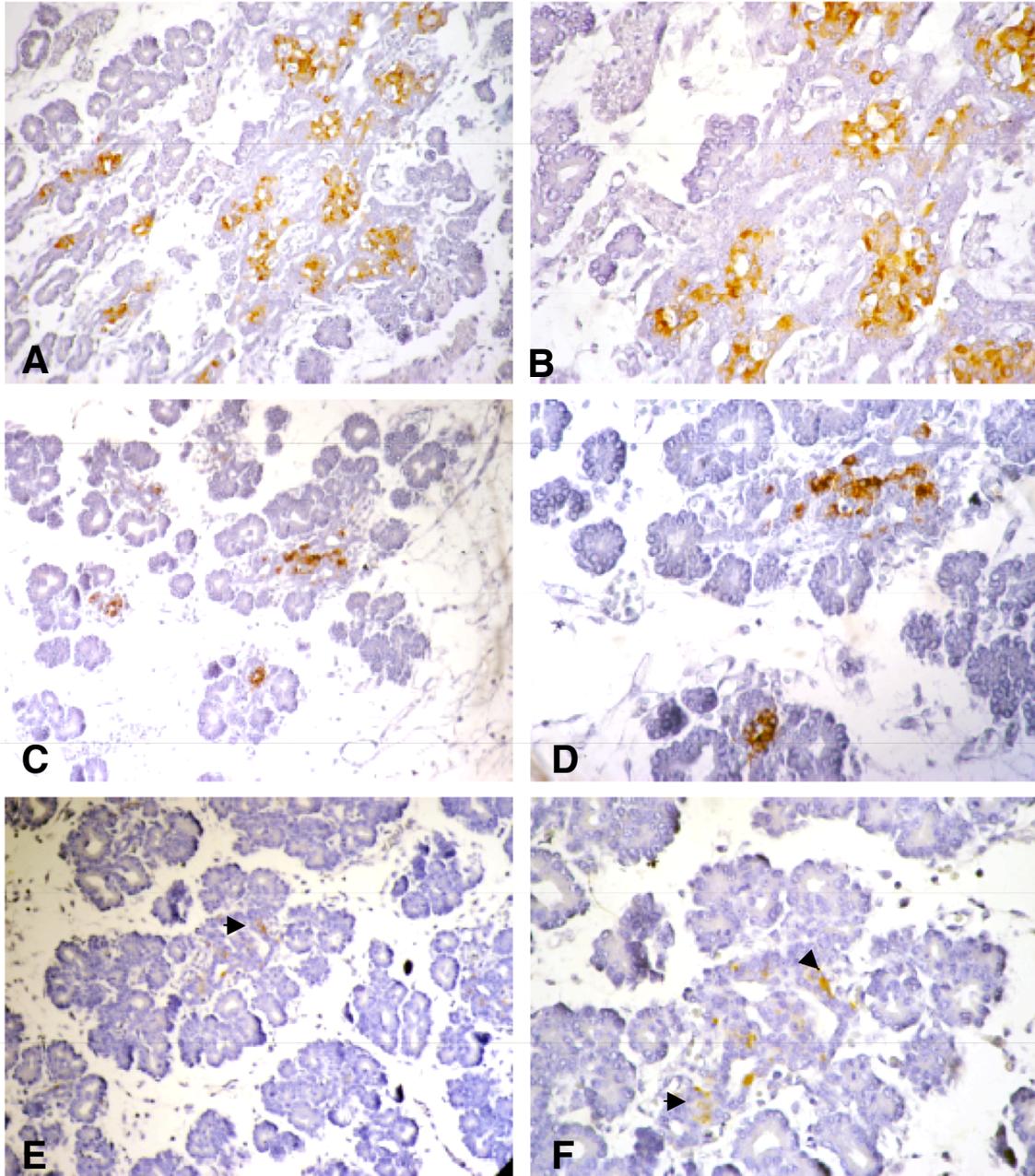


Figura 26. Fotografías de páncreas fetal de 19 días con anticuerpo: anti-insulina y HE. A)LC. 30x. B)LC. 60x, C) LE. 30x. D) LE.60x. E)LE. 30x y F)LE. 60x.

21 días de gestación.

En el día 21 de la gestación en el LC, se observó que las células β positivas a insulina, aumentaron entre el tejido epitelial, localizándose en agrupaciones tipo-islotos, (Figura 27 A), las células β se localizaron en el centro de la agrupación como lo indica la inmunotinción de insulina, (Figura 27 B).

En los páncreas de fetos de madres diabéticas del LE en este tiempo, las agrupaciones de células endocrinas fueron de menor tamaño y la cantidad de células positivas a insulina fue menor que en el LC, presentándose pequeños grupos celulares positivos a insulina asociados a ductos pancreáticos, (Figura 27 C).

En el Figura 27 D, se observan las células positivas a insulina, están dispersas entre el grupo de células endocrinas en diferenciación, y principalmente en la periferia de la agrupación tipo islote.

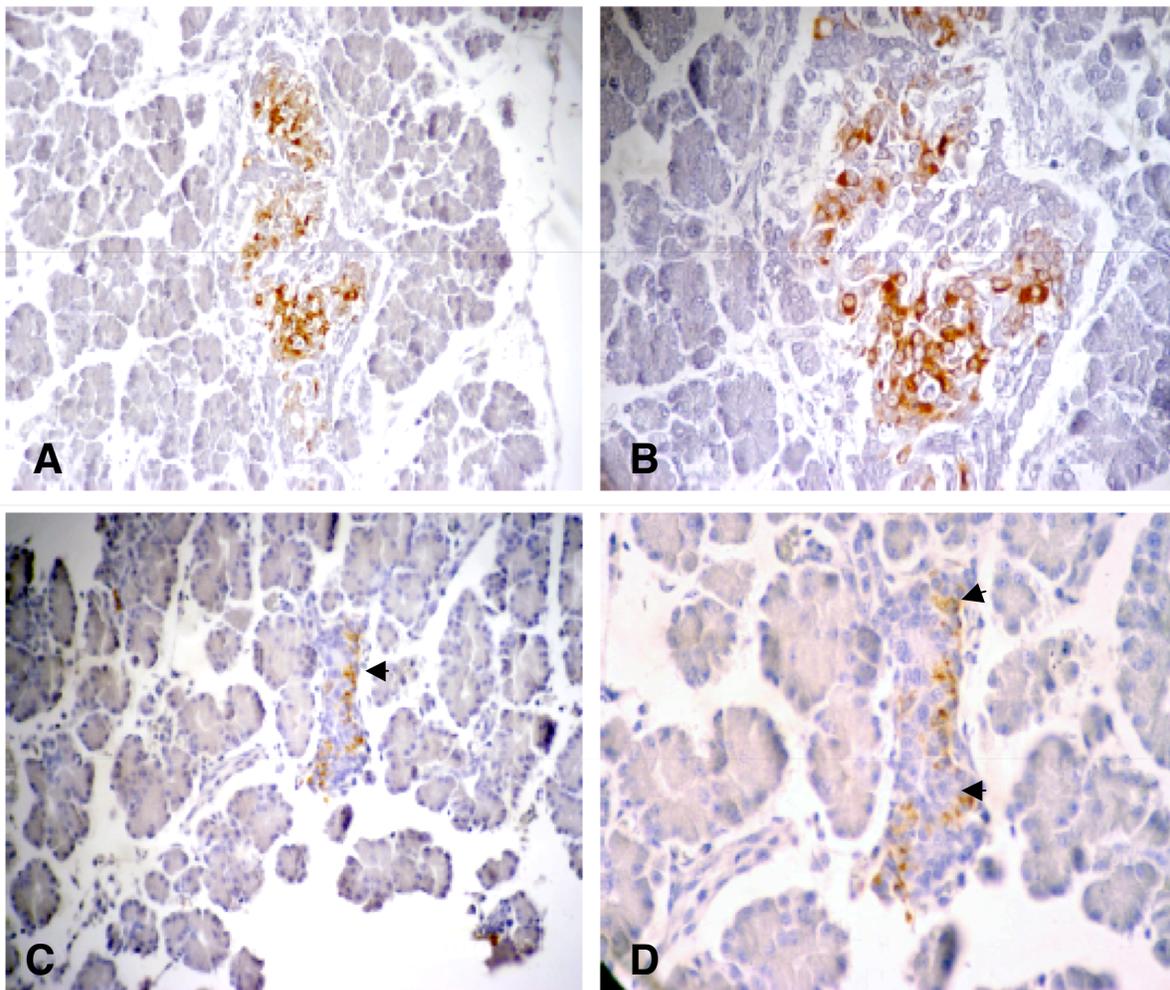


Figura 27. Fotografías de páncreas fetal de 21 días, con anticuerpo: anti-insulina y HE A)LC. 30x. B)LC. 60x, C) LE. 30x. y D) LE.68x.

1dV.E.U.

En el tejido pancreático de los recién nacidos observamos que en el LC, la conformación de islotes es ya evidente con las células β localizadas al centro (células positivas a insulina),

mientras que las α , δ , PP y ϵ se localizan en la periferia (células negativas a insulina), (Figura 28 A y B). En el LE observamos que los islotes son de menor tamaño que los islotes del LC pero ya con su arreglo celular típico (células β en el centro, células restantes en la periferia). Las células positivas a insulina se encontraron en menor número que en el LC, (Figura 28 C y D). En las figuras 28 E y F, se representa la condición de los páncreas de 3 crías del LE, que presentaron un incremento en la masa celular β .

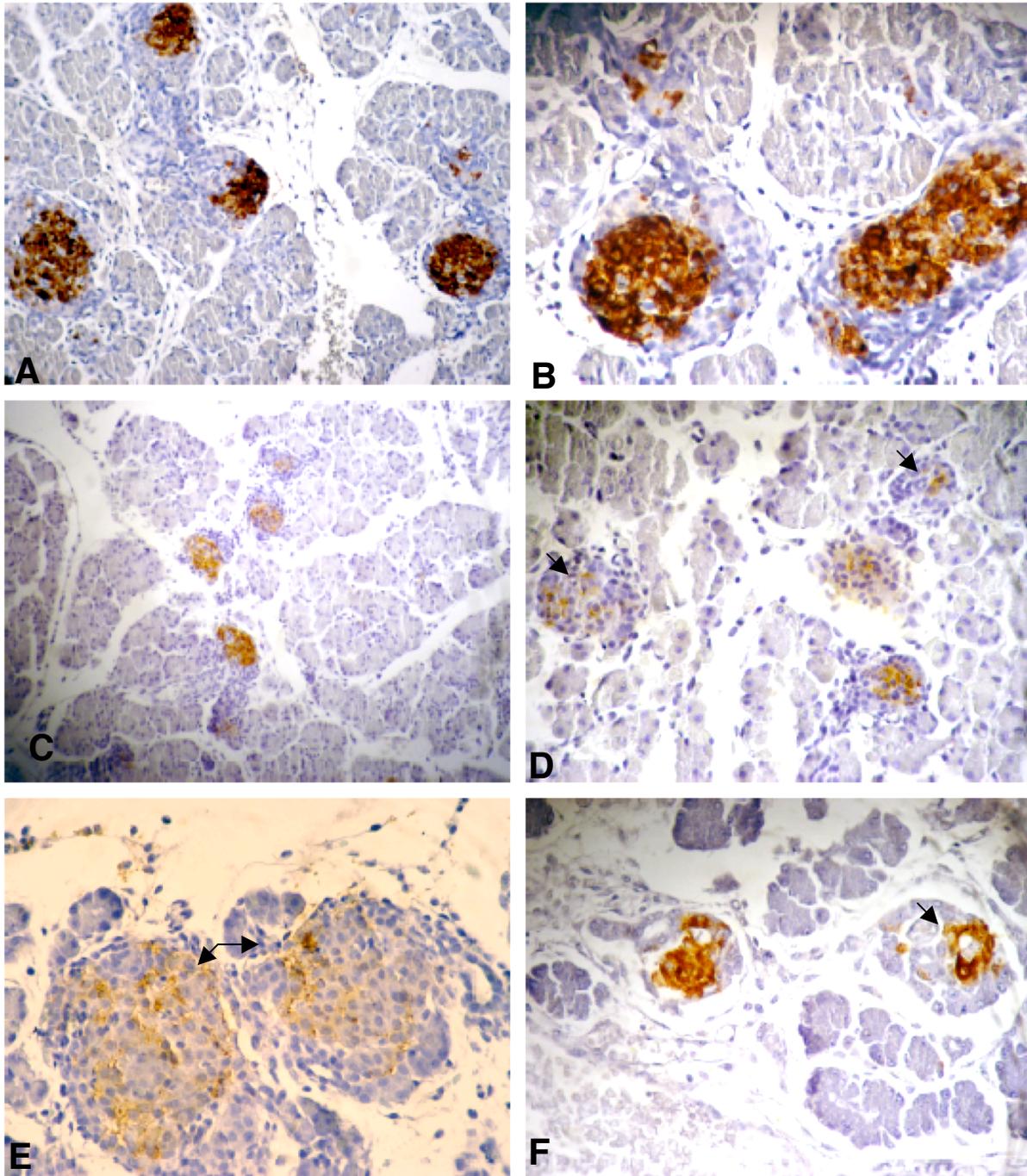


Figura 28. Fotografías de páncreas de crías de 1d.V.E.U, con anticuerpo: anti-insulina y HE A)LC. 30x. B)LC. 60x, C) LE. 30x. D) LE.60x. E) LE. 76x y F)LE. 68x.

X DISCUSIÓN

En la gestación ocurren cambios metabólicos que proveen un ambiente óptimo para el desarrollo y crecimiento de los fetos (1).

La diabetes gestacional, se caracteriza por una disminución en la sensibilidad a la insulina o un incremento de la resistencia a ésta.(1, 9); produciendo una disminución en la toma de glucosa en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado, como también una disminución en la suspensión de la producción de glucosa hepática, supresión de la lipólisis y la inhabilidad de conversión de aminoácidos, ocasionando una hiperglucemia aguda (1, 8, 9,).

No existe actualmente un modelo animal que reproduzca exactamente las condiciones de la diabetes gestacional humana. Sin embargo varios modelos pueden proporcionar una aproximación para estudiar la patogénesis de esta enfermedad. Existen diferentes métodos para inducir diabetes: inducción quirúrgica, hormonal y química (STZ) que son entre los más utilizados, ya que provocan un alteración en el medio intrauterino semejante al de la diabetes gestacional humana (105).

Se ha demostrado que la STZ es uno de los agentes químicos más eficaces en la inducción de la diabetes en modelos experimentales (69, 75, 77, 78, 79). Las dosis utilizadas van de un rango de los 25 a los 100mg/kg y se ha comprobado que existen efectos diabetogénicos que varían en intensidad y en la aparición de las complicaciones (106). Las dosis más utilizadas son las de 45-70 mg/kg de peso (93, 106).

La forma de acción inicial de la STZ para inducir hiperglucemia, es la destrucción de las células β ocasionando una disminución en la secreción de insulina, produciendo una hipoglucemia temprana (antes de las primeras 48 hrs.) que puede tener como resultado un efecto letal sobre los animales. Los animales que sobreviven pasan a un estado de hiperglucemia a largo plazo, permitiendo la aparición de las complicaciones propias de la diabetes.

En este estudio, los niveles de glucosa en ratas del LE se elevaron a las 48 hrs. después de la inducción (día 5 pc.); produciendo un estado hiperglucémico durante la gestación, con valores de glucosa mayores de los 350 mg/dl llegando a alcanzar 550 mg/dl al final de la gestación. Los cuales confirmaron el efecto permanente de la inducción de la hiperglucemia.

Al igual que los niveles de glucosa, la pérdida de peso en ratas de LE durante la gestación evidenció la condición metabólica alterada que se indujo en las ratas, iniciándose esta reducción en el peso dos días después de la inducción con STZ.

La pérdida de peso es debida principalmente a dos factores: 1) el metabolismo bifásico durante la gestación, (fase anabólica al inicio de la gestación y una fase catabólica hacia el final de la gestación) siendo la segunda la más intensa para la madre (107) y 2) la condición diabética que se indujo; que implica un alto gasto energético que usualmente ocasiona un estado compensatorio de hiperfagia.

En el estudio de Yamada y colaboradores, (108) se demuestra que la diabetes inducida con STZ en ratas Wistar gestantes ocasiona un alto gasto energético, en comparación con ratas gestantes no diabéticas y diabéticas no gestantes. Encontraron que la diabetes inducida ocasiona una reducción en el peso del útero, así como en el peso de los fetos; concluyen, que el estado hiperglucémico puede estar involucrado en un bloqueo del proceso de la eficiencia alimentaria, y en el depósito de grasas que es común en la gestación, ocasionando una pérdida de peso o energía en las ratas gestantes diabéticas. Los niveles hiperglucémicos están también relacionados con el gasto energético, debido al alto catabolismo proteico (107) acompañado de una hiperglucagonemia que como consecuencia aumenta el gasto energético por el disparo de la gluconeogénesis durante la gestación (10, 109).

Al igual que la glucosa sanguínea, los niveles de glucosa sérica en los días (15, 17, 19 y 21) confirmaron el estado hiperglucémico severo en las ratas del LE. Los elevados niveles de glucosa ocasionaron, en los animales diabéticos gestantes, alteraciones en sus vías metabólicas aumentando los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y VLDL.

En humanos, el colesterol durante la gestación, aumenta progresivamente hasta el último trimestre y sus concentraciones no aumentan tan drásticamente (<25%) como otros metabolitos (110). El disparo en las concentraciones de colesterol en este periodo de tiempo, es necesario para el crecimiento de los fetos y placentas ya que el colesterol es un componente básico en la formación de membranas placentarias y la producción de hormonas esteroideas.(111).

Los niveles de colesterol registrados en este estudio, aumentaron progresivamente en la última semana de gestación, en las ratas gestantes de los dos lotes; aunque los animales del LE presentaron niveles 2 veces mayor que el que presentaron las ratas del LC. Lo cual se debe a las alteraciones metabólicas que se presentan en la diabetes, pues está registrado que las concentraciones de este lípido aumentan considerablemente debido al ya incrementado metabolismo lipolítico (112).

Los niveles de triglicéridos séricos presentaron un aumento drástico durante la gestación en comparación con otros metabolitos. En mujeres embarazadas se ha determinado que aumentan un 200% al final de la gestación, mientras que en la diabetes gestacional las concentraciones pueden aumentar unas 3 veces al final de la gestación (110, 111).

Las concentraciones de triglicéridos aumentaron en la última semana de la gestación (15, 17, 19 y 21 días), en las ratas del LE, siendo los metabolitos con mayor concentración en la circulación materna, la concentración que se presentó para el día 21 de gestación, fue 7 veces más, indicando una abundancia de estos en la sangre materna. Sin embargo, en 1er.V.E.U, los niveles descendieron drásticamente en las ratas del LE con valores de 223.5 mg/dl. Al igual que los triglicéridos, los niveles de VLDL se incrementaron los días 19 y 21 de gestación, en 15 y 17 no hay diferencia comparadas con las en las ratas del LC. Mientras que para el 1d.V.E.U. observamos un descenso marcado en los niveles de VLDL en ratas de LE en comparación con los niveles de las ratas del LC.

Estos datos sugieren que durante la gestación diabética y en particular, al final de ésta, hay un incremento en la movilización de triglicéridos, y que una proporción proviene del hígado a través de las VLDL (como se muestran en los resultados), y que involucra el abastecimiento de energía en la madre, por medio de la producción de ácidos grasos libres; mientras otra parte es transportada hacia la placenta, donde se utilizan como almacenadores de energía, para su utilización en el crecimiento fetal. En gestaciones complicadas como las diabéticas, la transferencia es incrementada por el aumento en el gradiente de concentración (112). Estas alteraciones metabólicas, indican que el metabolismo en ratas del LE se caracterizó por un intenso estado catabólico, durante la última semana de gestación (tiempo del estudio).

La gestación es una condición que también incrementa la susceptibilidad al estrés oxidativo, que es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante de las células (113).

La presencia de malformaciones congénitas en fetos de gestaciones de madres diabéticas ha sido atribuida al estrés oxidativo. En los modelos animales se ha encontrado que están involucrados: especies reactivas de oxígeno inducidas por hiperglucemia, oxidación mitocondrial y glucosilación inducida no enzimáticamente junto con deficiencias de ácidos grasos esenciales debido a la peroxidación, alteraciones en posglandinas y posiblemente otros mecanismos aún no conocidos (113, 114).

La hiperglucemia *per se* tiene gran poder teratogénico en etapas tempranas del desarrollo. La glucosa puede dañar el DNA y provocar mutaciones que impidan la expresión de genes específicos para la embriogénesis.(83).

En las gestaciones de ratas diabéticas de este estudio, se observó la presencia de fetos con malformaciones congénitas (n= 3) y con una alta frecuencia de reabsorciones (n=18) indicando que el estado hiperglucémico está involucrado; como lo han reportado varios estudios (77, 83, 91, 92). Otros autores, han demostrado que el exceso en las concentraciones de cuerpos cetónicos (3-hidroxibutirato), aminoácidos y triglicéridos que se presentan en gestaciones diabéticas descontroladas pueden ser teratogénicas.

Eriksson y colaboradores, (115) realizaron un estudio de las alteraciones morfológicas que se presentan en embriones de ratón de 9-11 días, cultivados en medios con altas concentraciones de glucosa (50mM) y con 3mM de β -hidroxibutirato (HBT) que es un cuerpo cetónico que se produce en mayor cantidad en animales con diabetes inducida. Ellos encontraron que tanto la glucosa como los cuerpos cetónicos (en especial β -hidroxibutirato) actúan sinérgicamente para producir retraso en el crecimiento e inducir malformaciones.

La incidencia de malformaciones que se presentaron con mayor frecuencia (n=2) estuvieron relacionadas con el desarrollo del sistema nervioso, que se ha reportado están asociadas con la hiperglucemia como lo reporta Phelan y colaboradores, en ratones (116). El uso de multivitamínicos (en particular vitamina A y E) ha sido asociado con una disminución en el riesgo de desarrollar malformaciones en la descendencia, por lo que esto hace evidente que el estrés oxidativo en gestaciones diabéticas juega un papel central en la patogénesis (117).

La placenta desempeña un papel crucial en la gestación, regula el transporte de nutrientes entre la madre y el feto, elimina los productos de desecho fetal a la corriente sanguínea materna y regula los suministros metabólicos mediante la producción de hormonas (1). El deterioro del metabolismo materno, una toma inapropiada de alimento y una alteración en el flujo materno/fetal inducen adaptaciones funcionales y estructurales en ésta que tienen efectos variables sobre el desarrollo del feto (97).

Las placentas en gestaciones complicadas por diabetes, sufren alteraciones que provocan cambios en sus funciones biológicas. Entre estas están: estados de inmadurez del trofoblasto (118), la placentomegalia que se caracteriza por un incremento de células que almacenan glucógeno y por tanto, un incremento en la masa placentaria (83, 102), degeneración cística de células esponjosas, adelgazamiento de lámina basal y alteraciones vasculares (83, 119) entre otros.

Grewolb y colaboradores, (112) analizaron por medio de microscopia de luz y electrónica las placentas de ratas con diabetes inducida con STZ los días 14, 18 y 22. Concluyeron que las modificaciones que presenta la membrana interhemal en la zona laberíntica de placentas diabéticas incrementa la distancia entre la circulación materna y la fetal teniendo un efecto placentar adverso a su funcionamiento resultando en un retardo en el crecimiento.

En el estudio de Loredó (93) se analizó la estructura placentaria en ratas diabéticas en el día 20 de gestación, encontrando que la región laberíntica presentó un adelgazamiento de las vellosidades, que deduce, se debió a una probable disminución en la cantidad de tejido conjuntivo. La vascularización de la región laberíntica se haya incrementada, y los vasos sanguíneos presentan un menor grosor y se encuentran dilatados, la región del espongiotrofoblasto es extensa y aumenta el número de capas, en la región de las células gigantes del trofoblasto se observó un aumento en la cantidad de células ricas en glucógeno. Se observó placentomegalia y los fetos presentaron un crecimiento retardado.

Aunque en este estudio no se analizaron específicamente las alteraciones en la estructura placentaria durante las gestaciones diabéticas, se pudo corroborar que éstas presentaron un aumento considerable de peso en los 4 tiempos analizados.

El peso y la talla de los fetos de las ratas del LE, fueron significativamente más bajos, al compararlos con ratas del LC, lo cual concuerda con los resultados de otras investigaciones que han reportado que la diabetes materna causa un retardo en el crecimiento fetal (77, 85, 94, 102, 103, 119).

Hasta hoy no es claro como actúa la diabetes materna sobre el desarrollo y ocasiona un retardo en el crecimiento fetal. Diversos estudios han relacionado al flujo sanguíneo útero-placentario con esta situación (77, 83, 92, 94), concluyendo que el flujo sanguíneo útero-placentario se encuentra disminuido.

En el estudio de Wentzel y colaboradores, (119) realizado en ratas gestantes diabéticas inyectadas con 40mg/kg de peso de STZ, encontraron que en los días 9 y 10pc. el flujo sanguíneo se incrementó en el tejido uterino más que en el tejido decidual, mientras que al día siguiente (11pc.) el flujo sanguíneo disminuyó, y volvió a aumentar para el día 12 pc.

El hallazgo de diferentes patrones del flujo sanguíneo en este estudio puede indicar que estos son regulados independientemente, aunque si estimulados por la diabetes materna. Concluyen que el incremento en la disponibilidad de sustratos está asociado con un incremento en el riesgo embrionario de desarrollar alteraciones en la gestación diabética.

En el estudio de Takenaka y colaboradores, (120) en ratas diabéticas inyectadas con 35mg/kg de peso de STZ en el día 20 de gestación se estudió el efecto de la diabetes materna sobre el flujo sanguíneo y el efecto de un vasodilatador (urapidil) en el flujo placentario. Ellos demuestran una disminución del flujo sanguíneo en úteros, placentas y riñón. Los fetos de las ratas presentaron una disminución del peso corporal y un aumento en sus niveles de glucosa sanguínea. Las ratas diabéticas gestantes tratadas con urapidil presentaron una restauración de su flujo sanguíneo y el peso de los fetos aumentó, sin alterar los niveles de glucosa sanguínea. Concluyendo que la disminución del flujo sanguíneo uteroplacental es uno de los factores importantes en el retraso del crecimiento fetal en ratas diabéticas.

Los datos que obtuvimos sobre el tamaño fetal (microsomia), concuerdan con los resultados que obtuvieron en este estudio, podríamos suponer entonces, que el aumento en el peso de las placentas es ocasionado como un mecanismo compensatorio sobre la disminución del flujo placentario, pero no podemos deducir que es la única alteración que induce la disminución en el crecimiento.

Es bien conocido que el sustrato energético universal en los fetos de mamíferos es la glucosa. Aunque el lactato y aminoácidos también se presentan (121, 122). Los fetos en un medio diabético tiene acceso a una amplia cantidad de nutrientes, entre estos, sustratos oxidativos (glucosa, cuerpos cetónicos, aminoácidos ramificados, ácidos grasos, etc.)

Diversos estudios han mostrado que los fetos de ratas con diabetes severa presentan niveles elevados de glucosa, lo que se relaciona con un retraso en el crecimiento (83, 84, 93, 123).

En el estudio de Atkins y colaboradores, (124) donde utilizaron ratas diabéticas gestantes inyectadas con 55mg/kg de peso de STZ, se observó en el día 21 de gestación, el efecto de la hiperglucemia sobre la regulación del transportador de glucosa GLUT1 en tejidos fetales. Encontraron que los fetos presentaron un retardo en el crecimiento. La hiperglucemia no provocó una disminución en transporte de glucosa en cerebro y músculo esquelético, lo que significa que el transporte de glucosa no está directamente relacionado con el bajo crecimiento fetal. Sus observaciones sugieren que múltiples factores controlan el transporte de glucosa fetal y crecimiento de los órganos.

Existen pocos estudios que analizan el efecto de la diabetes materna sobre el desarrollo del páncreas fetal desde su morfogénesis hasta su crecimiento y maduración. Los que se han publicado resaltan solamente los efectos al final de la gestación (últimos 2 días en rata) y reportan sus efectos solamente en el tejido endocrino y en particular sobre las células β .

La citodiferenciación del páncreas en desarrollo no ocurre antes de los días 14-15 de gestación en rata y la adaptación de éste al metabolismo de la madre es establecida durante los últimos días de gestación (125).

En nuestros resultados, sobre el desarrollo del páncreas se evidenció que la citodiferenciación se presentó en el día 15 de gestación en los dos lotes, aunque esta fue menos evidente en los páncreas del LE. Esto puede estar asociado por la restricción del crecimiento fetal, presente en los fetos del LE, es decir, el desarrollo del páncreas fetal presentó un retraso con respecto a los páncreas controles, siendo evidente por la fusión de los primordios pancreáticos que fue observada en éste día, y por la baja actividad proliferativa del tejido epitelial pre-ductal en los primordios pancreáticos. En el día 17 de gestación, en LE se observó una disminución en la proliferación y diferenciación de células de los ductos en los páncreas y la presencia de mayor masa mesenquimatosa, sugiriéndonos un atraso en el mecanismo de diferenciación celular en comparación con el LC donde es ya evidente la presencia de ductos, y la masa mesenquimatosa es menos abundante que los tejidos en maduración (células ductales y acinares).

Se ha reportado que el páncreas en desarrollo entre los días 18-19 de gestación de la rata presenta un aumento en la neogénesis celular endocrina, que es conocida como segunda transición del desarrollo y éste aumento y diferenciación endocrina prepara al organismo a adaptarse a la función homeostática en particular al de glucosa en los últimos días de la gestación, la cual es una consecuencia importante para el buen funcionamiento de ésta durante la vida neonatal y adulta.

En el día 19 de gestación se observó una intensa proliferación y aumento de la masa pancreática y particularmente en la masa endocrina en el LC, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, y es común la presencia de agrupaciones tipo islote en este tiempo. En cambio, en los páncreas fetales del LE se observa poca diferenciación de células endocrinas asociadas al epitelio ductal y no se observaron estructuras tipo islotes entre la masa pancreática.

A partir del día 21 de gestación en los páncreas del LC se observó una intenso incremento celular endocrino entre la masa acinar del páncreas fetal sugiriendo una intensa actividad sobre la formación de islotes y se evidenció que en la formación de los islotes participan diferentes tipos celulares. En los páncreas de fetos de 21 días se observó una disminución en la actividad proliferativa de células endocrinas, comúnmente se presentaron todavía asociadas a epitelio ductal, deduciendo un retraso en la conformación de islotes pancreáticos.

Las observaciones realizadas en las zonas restantes del páncreas (acinos, ductos y vasos sanguíneos) no presentaron una alteración evidente sobre su morfología, sólo un atraso en la maduración acinar fue evidente en los últimos días de gestación (19 y 21).

En 1d.V.E.U. se observó que el páncreas en las crías del LC estaba completamente desarrollado diferenciando claramente la típica estructura de los tejidos pancreáticos, mientras que en las crías del LE está maduración se vio atrasada principalmente sobre el tejido endocrino, pues se presentó todavía un incremento celular asociado entre el epitelio

ductal. Se observaron pocas asociaciones tipo islote y fueron comúnmente mas pequeñas que los islotes del LC, representando un atraso en la formación y diferenciación de los islotes de Langerhans.

Uno de los objetivos de este trabajo fue el determinar el efecto de la diabetes materna sobre la producción de insulina en el páncreas fetal.

El tiempo de aparición de las células β , no está bien establecido, algunos estudios reconocen que las células β se forman a partir de los días 12-13 de gestación en rata (36, 123), mientras otros demuestran que es hasta el final de la gestación (18 días) (15, 126). Además varios autores reconocen que la expresión *per se* de insulina no marca en particular una célula β . La expresión de muchos otros marcadores de células β (PDX-1, GLUT2, y glucocinasa) son factores importantes para determinar este fenotipo celular (126, 127).

Algunos estudios han tratado de aclarar esta condición. Por ejemplo en el trabajo de Rorsman y colaboradores (128), se demuestra que las células β en el día 21 de gestación ya presentan la maquinaria necesaria para la liberación de insulina (canales de K^+ sensibles a ATP, glucocinasa, y canales de Ca^+ sensibles a voltaje) aunque la liberación de insulina se ve afectada en grandes concentraciones de glucosa *in vitro*.

En el estudio, de Bergsten y colaboradores (127), utilizando células de páncreas fetal de 12-14 días de gestación, que después incubaron en cultivos de 5-15mM de glucosa se observó que estas células aumentaron su secreción de insulina cuando las concentraciones de glucosa se incrementaron, además de que también demostraron por el seguimiento del desarrollo del páncreas fetal en rata la acumulación de insulina desde el día 13-19 de gestación. A partir del día 13 ellos encontraron que la secreción de insulina es muy baja y aumenta considerablemente en el día 17 y 19 días en concentraciones de 5 mM de glucosa. Al utilizar tolbutamida y diazóxido dos moduladores de los canales de K^+ sus resultados indican que los canales ya son operacionales en explantes de células β en el día 14 de gestación. Ellos sugieren que el factor limitante en la secreción de insulina es la relación de concentración de ATP/ADP, pues sus resultados indican que los componentes principales en la secreción de insulina (canales de K^+ , canales de Ca^+ , glucocinasas) están presentes en el desarrollo temprano de las células β .

De acuerdo al estudio de Bergsten, en los primeros tiempos analizados de este estudio pudimos corroborar la aparición temprana de células β en los días 15 y 17 de gestación en los páncreas fetales de los dos lotes, las cuales están estrechamente asociadas entre células pre-ductales; y en el día 17 se observaron que son evidentes entre células de ductos diferenciadas. Sobre el aumento en la proliferación de células positivas a insulina en los días 15 y 17 de gestación en los páncreas fetales del LE, nosotros deducimos, que fue ocasionado por la condición hiperglucémica de la madre, pues hubo una transferencia mayor de glucosa hacia el feto, induciendo sobre estas, un incremento en la síntesis de insulina en respuesta a los niveles de glucosa como lo demostraron en el trabajo anterior.

En los fetos de rata, el área celular positiva a insulina aumenta 2 veces justo antes del nacimiento, ocasionada por el aumento en la replicación celular β y neogénesis celular a partir del epitelio ductal (104).

En el día 19, se observaron entre el tejido ductal asociaciones positivas a insulina en los páncreas del LC que fueron más evidentes que en el LE, en este último se observó que estuvieron estrechamente asociadas a el epitelio ductal y con una menor cantidad de células endocrinas. Para el día 21 de gestación, en el LC las agrupaciones tipo islote se observó una mayor cantidad de células positivas a insulina y el arreglo de las células β fue evidente en el centro de la agrupación. En los páncreas del LE, las agrupaciones tipo islote son pequeñas y la presencia de células positivas a insulina fue menor sin la formación de agrupaciones como se observó en los páncreas del LC. En los páncreas del LE las células positivas a insulina estaban asociadas en la periferia de la agrupación.

Con respecto a lo observado en el 1d.V.E.U. en los páncreas de crías del LC se presentó la localización típica de las células β (positivas a insulina) en el centro del islote con una inmunotinción positiva muy evidente, sugiriéndonos un alto contenido intracelular de insulina, mientras en los páncreas de crías del LE, la inmunotinción de éstas fue menor y pequeños islotes fueron observados en el tejido pancreático. En algunos casos, se presentó un incremento celular β asociado estrechamente al epitelio ductal ya que fueron positivas a insulina.

Hasta hoy existe una gran controversia acerca de los cambios morfológicos que se observan en el páncreas endocrino fetal de la rata. Los fetos de madres con diabetes moderada ($\pm 20\%$ de las concentraciones de glucosa materna) se caracterizan por una hipertrofia e hiperplasia de los islotes, ocasionando un alto contenido de insulina (103, 129, 130).

La capacidad proliferativa *in vivo* e *in vitro* de estos islotes se incrementa, algunos islotes son más sensibles a glucosa que islotes fetales de madres sanas.

En situaciones de diabetes materna severa, las células β están degranuladas y el contenido de insulina es bajo. En respuesta a una concentración muy alta de glucosa, estos islotes secretan menos insulina, la masa del islote y la replicación celular β están disminuidas (84, 129).

Calvo y colaboradores, (130) realizaron un estudio morfométrico e inmunohistoquímico en los páncreas de fetos de 21 días de gestación de ratas diabéticas (45mg/kg de peso de STZ) y se comparó el efecto de la administración de insulina (1U/100) demostrando que los páncreas de ratas diabéticas presentaban hipertrofia (aumento de la masa insular), una degeneración de células β con microvacuolas en el citoplasma, degranulación e hiperplasia de las células β . La inmunotinción para insulina en estos fetos fue marcadamente menor con respecto al tejido control y el número de células negativas a insulina se incrementó. En el lote tratado con insulina no se revirtieron los efectos de la hiperglucemia materna, pero ocasionó una disminución de la hiperplasia de las células β y un aumento en la secreción de insulina fetal. Concluyen que la hiperglucemia extrema de la madre tiene completamente exhausta la capacidad secretoria de la células beta fetales en desarrollo.

De acuerdo con el estudio de Calvo y colaboradores (130), aunque se realizó únicamente con páncreas fetal de 21 días, nosotros encontramos un fenómeno similar de agotamiento celular, y un incremento de células β en páncreas de crías recién nacidas del LE. El día 21, observamos asociaciones tipo islotes que presentaban células β positivas a insulina en menor proporción y en algunos casos pequeñas agrupaciones positivas a insulina asociadas a ductos pancreáticos.

Cabe aclarar, que los resultados observados en estos tiempos (21 días y 1d.V.E.U) en el LE difieren por un lapso mayor de tiempo, debido a que las gestaciones utilizadas en este estudio presentaron una mayor duración (gestaciones diabéticas= 23 días, gestaciones normales= 22), presentando una diferencia de un día con respecto al tiempo caracterizado de la especie que es de 22 días, posiblemente esta condición está asociada con el retardo del crecimiento intrauterino presente en gestaciones diabéticas.

Sobre las observaciones hechas en los páncreas fetales y de crías teñidas con el método de Gomori para islotes pancreáticos, los resultados obtenidos no muestran una diferencia evidente sobre las células endocrinas en los días 19 de gestación, 21 y 1d.V.E.U por ello nosotros no pudimos especificar del todo con claridad los resultados obtenidos sobre las diferencias entre las masas celulares endocrinas negativas a insulina (células α y δ) y la especificidad a las células β . A pesar de esto, nosotros deducimos que cambios drásticos en la masa celular no β (células α y δ) en los islotes de páncreas del LE no fueron evidentes; únicamente vimos un retraso en la composición celular de los islotes, debido a la actividad migratoria de las células endocrinas observadas en los días 21 y 1d.V.E.U. pudiendo aseverar con otros trabajos al igual que el de Calvo y colaboradores, que el efecto de la diabetes materna es específico sobre el desarrollo de células β fetales (84).

Los resultados aquí expuestos sobre la producción de insulina en los 5 tiempos analizados demuestran primeramente que se presentó una sobre estimulación en la síntesis de insulina (15-17 días), a medida que progresó la gestación (19 y 21 días) hubo una disminución en su síntesis por parte de las células β y para el tiempo de 1d.V.E.U. ésta prosiguió y estuvo acompañada de un incremento de células β caracterizada por la inmunotinción de insulina. Estos hallazgos podrían indicar que los fetos de madres diabéticas (LE) fueron hiperglucémicos.

Podemos suponer, que el contenido celular de insulina en las células β en los páncreas fetales del LE, en particular hacia el final de la gestación (19 y 21 días) y en 1d.V.E.U estuvo disminuido. Esto podría sugerir que en este tiempo (final de la gestación) se presentó un aumento en la actividad secretora de insulina ya que a diferencia de los páncreas del LC en los mismos días, vimos un gran contenido de insulina intracelular debido a la síntesis y almacenamiento de la insulina. En los páncreas fetales del LE al final de la gestación, la inmunotinción representaría a la insulina que se está sintetizando y almacenando para la siguiente liberación extracelular de la hormona, debido a las altas concentraciones de glucosa fetal está es secretada de forma abundante.

Varios trabajos afirman que la cantidad de glucosa que llega al feto ó que es absorbida por éste llega a ser el 70-80% de la concentración que se presenta en la sangre materna (97, 98, 109). Como lo demuestran los trabajos de Takenaka y colaboradores (120) y Atkins y colaboradores (124) está situación es evidente en ratas diabéticas.

Los resultados de estos autores son un apoyo sobre esta hipótesis en las observaciones sobre el desarrollo del páncreas en este estudio y en particular sobre la producción de insulina.

Podemos deducir, que en la gestación, existen factores que están involucrados en el control del crecimiento fetal. Como lo hemos descrito anteriormente uno de ellos es el flujo placentario que juega un papel esencial y parece ser uno de los más importantes como lo demuestran Bergsten y Takenaka, por ser indispensable para la cantidad de metabolitos que llegan al feto desde la placenta, como son: la propia glucosa, aminoácidos, lactato y ácidos grasos libres.

Los aminoácidos son necesarios para la formación de proteínas además contribuyen como reguladores para diversas vías y respuestas hormonales. En la diabetes materna severa la concentración de aminoácidos en el feto está disminuida, como lo demuestra Aerts y colaboradores (131), en ratas diabéticas. Una falta de aminoácidos claramente afecta la tasa de crecimiento fetal.

Otros trabajos han demostrado que varios factores de crecimiento sintetizados por la placenta y el propio feto son necesarios para su crecimiento normal. Entre estos los IGF-I y IGF-II juegan un papel clave durante la embriogénesis (132). En el lado fetal, la insulina también ha sido reportada que juega un papel complementario, aunque tiene efectos insignificantes en la diferenciación tisular o maduración *in utero*, su función principal es el disparo en el aumento tisular vía efectos anabólicos sobre el metabolismo fetal y por la estimulación de la secreción de IGF-I. Se sabe que IGF-I es un mediador en la acción de la HC posnatal (133), por tanto en la vida fetal, la insulina es una hormona promotora del crecimiento, que actúa como molécula señalizadora de abundancia de nutrientes.

Sobre el efecto de la hiperglucemia en las células β fetales se desconoce el mecanismo que ocasiona una disminución en la síntesis y secreción de insulina provocando una hipoinsulinemia hacia el final de la gestación y en crías recién nacidas de madres diabéticas.

Algunos autores han propuesto que hay una alteración sobre el transportador GLUT2 en la célula β ocasionando un paro en la toma de glucosa, provocando una disminución en la relación intracelular de ATP/ADP; así se inhibe la apertura de canales de K^+ sensibles a ATP, inhibiendo la liberación de insulina (134, 135).

Mientras otros proponen que hay un efecto similar de glucotoxicidad y lipotoxicidad como en las células β adultas, predisponiendo al organismo a padecer diabetes tipo 2 en la vida adulta (136, 137).

XI CONCLUSIONES

La diabetes materna severa inducida con STZ en ratas, ocasiona un retardo en la morfogénesis del páncreas evidenciado por:

1. Fusión de primordios pancreáticos posterior al día 15.
2. Presencia de epitelio preductal y mayor masa mesenquimatosa en el día 17.
3. Ausencia de agrupaciones tipo islote en el día 19.
4. Menor cantidad de células endocrinas en las agrupaciones tipo islote en el día 21.
5. Atraso en la formación de islotes en 1d.V.E.U.
6. Mayor inmunopositividad a insulina en los páncreas de fetos de 15 y 17 días.
7. Menor inmunopositividad a insulina en los páncreas de fetos de 19, 21 días de gestación y crías de 1d.V.E.U.

XII REFERENCIAS

1. Islas Andrade Sergio A, Revilla Monsalve Ma. Cristina. **Diabetes mellitus**. Tercera Edición. McGraw-Hill Interamericana. 2005. México D.F. 500 pp.
2. Sheetz M.J. King L. George. **Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications**. JAMA, 2002. Vol. 27(20): 2579-2588.
3. American Diabetes Association: www.diabetes.org
4. Wild Sarah, Roglic Gojka, Green Anders, Sicree R. and King Hilary. **Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030**. Diabetes Care, 2004. Vol. 27(5): 1047-1053.
5. Kumate Jesús. **Diagnóstico oportuno Prediabético, II Congreso Internacional de Especialidades Médicas**. Bol. de Prensa No. 460. IMSS. Sábado 6 de Septiembre del 2003.
6. Lifshitz G. Alberto, Arrela Francisco, Castro Martínez María Guadalupe, Fiorelli Sergio, Islas Andrade Sergio, Méndez Francisco D. José, Partida Hernández Guadalupe, Revilla Monsalve María Cristina y Vázquez Estupiñán Felipe. **A propósito de la diabetes en México**. Rev. Med. IMSS, 1996. Vol. 34(5): 343-344.
7. Mensaje del doctor Julio Frenk Mora, Secretario de Salud, en la inauguración del 15° Congreso Nacional de la Federación Mexicana de Diabetes. León, Guanajuato, 20 de marzo de 2003.
8. Setji I. Tracy, Brown J. Ana and Feinglos N. Mark. **Gestational Diabetes Mellitus**. Clinical Diabetes, 2005. Vol. 23(1): 17-24.
9. Buchanan A. Thomas and Xiang H. Anny. **Gestational diabetes mellitus**. The Journal of Clinical Investigation, 2005. Vol. 115(3):485-491.
10. Catalano M. Patrick, Kirwan P. John, Mouzon H. Sylvie and King Janet. **Gestational Diabetes and Insulin Resistance: Role in short and long- term implications for mother and fetus**. J. Nutr. 2003. Vol.133: 1674S-1683S.
11. Turok K. David, Ratcliffe D. Stephen and Baxley G. Elizabeth. **Management of Gestational Diabetes mellitus**. American Family Physician, 2003. Vol. 68(1): 1767-1772.
12. Torres-García Ma. P., Sosa Rodríguez T. **Aparato Digestivo**. In Atlas de Histología de Vertebrados, Estrada Flores E. Uribe Aránzabal M.C. Eds. 2002. Coordinación de Servicios Editoriales, Fac. de Ciencias. UNAM. pág: 76-78.
13. Hadley E. Mac. **Endocrinology**. Fourth Edition. 1996. Prentice Hall. Inc. USA pag: 231-254.
14. Norris O. David. **Vertebrate Endocrinology**. Third Edition 1997. Academic Press Inc. USA. pag: 506-535.
15. Slack J.M.N. **Developmental Biology of the Pancreas**. Development, 1995. Vol 121:1569-1580.

16. Norman W. Anthony. **Hormones**. Second Edition. 1997. Academic Press. USA. pag: 193-226.
17. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Liver/Images/pan40he.jpg>
18. Rivas Manzano Patricia. **Sistema Endocrino**. In Atlas de Histología de Vertebrados, Estrada Flores E., Uribe Aranzábal M.C. Eds. 2002. Coordinación de Servicios Editoriales, Fac. de Ciencias, UNAM. pág. 176-177.
19. Elayat Ahmed, El-Naggar M. Mostafa and Tahir Mohamed. **An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets**. J. Anat. 1995. Vol. 186: 629-637.
20. Wierup N. Yang S., McEvilly R.J. Mulder H., and Sundler F. **Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in the Developing rats islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells**. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2004. Vol. 52(3): 301-310.
21. Kojima Masayasu, Hosoda Hiroshi, Date Yukari, Nakazato Masamitsu, Matsuo Hisayuki and Kangawa Kenji. **Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptid from stomach**. Nature. 1999. Vol. 402: 656- 660.
22. Beta Cell Biology Consortium: <http://www.betacell.org>
23. Wells J., Melton D. **Vertebrate Endoderm Development**. Annual Review Cell Developmental Biology. 1999. Vol. 15: 393-410.
24. Kim K. Seung and Mc Donald J.R. **Signaling and Transcriptional control of Pancreatic Organogenesis**. Current Opinion in Genetics & Development. 2002. Vol. 12: 540-547.
25. Rawdon B. Benjamin. **Early Development of the gut: New light and old hypothesis**. Cell Biology International, 2001. Vol. 25(1): 9-15.
26. Kim K. Seung and Hebrok Matthias. **Intercellular signals regulating pancreas development and function**. Genes & Development, 2001. Vol. 15: 111-127.
27. Scharfmann R. **Control of early development of the pancreas in rodents and humans: implications of signals from the mesenchyme**. Diabetologia, 2000. Vol. 43: 1083 - 1092.
28. Cleaver Ondine and Krieg A. Paul. **Notochord Patterning of the Endoderm**. Developmental Biology, 2001. Vol. 234: 1-12.
29. Duncan S.A. **The pancreas and its heartless beginnings**. Nature Genetics, 2001. Vol. 27: 355-356.
30. Hebrok M., Kim S., St-Jaques B., McMahon A., Melton A.D. **Regulation of pancreas development by Hedgehog Signaling**. Development, 2000. Vol. 127: 4905-4913.
31. Hebrok M. **Hedgehog signaling in pancreas development**. Mechanisms of Development, 2003. Vol. 120:45-57.
32. Hogan Brigid L.M. **Morphogenesis**. Cell, 1999. Vol. 96: 225-233.

33. Habener F. Joel, Kemp M. Daniel and Thomas K. Melissa. **Transcriptional regulation in pancreatic development.** *Endocrinology*, 2005. Vol. 146(3): 1025-1034.
34. Deutsch G., Jung J., Zheng M., Lorá J., Zaet K.S. **A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm.** *Development*, 2001. Vol. 128: 871-881.
35. Larsson I.L. **On the Development of the islets of Langerhans.** *Microsc. Research Tech.* 1998. Vol. 43: 284-291.
36. Böck Peter, Abdel - Moneim Mohammed and Egerbacher Monika. **Development of Pancreas.** *Microscopy Research and Technique*, 1997. Vol. 37: 374 - 383.
37. Sander Maik and German S. Michael. **The B-Cell transcription factors and development of the pancreas.** *J. Mol. Med.* 1997. Vol. 75: 327-340.
38. Percival Anja C., Slack M.W. Jonathan. **Analysis of pancreatic Development using a cell lineage label.** *Experimental Cell Research*, 1999. Vol. 247: 123-132.
39. Gittes K. George, Galante E. Philip, Hanahan Douglas, Rutter J. William and Debas T. Haile. **Lineage-specific morphogenesis in developing pancreas: role of mesenchymal factors.** *Development*, 1996. Vol. 122: 439-447.
40. Miralles F., Czernichov P., Scharfman R. **Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development.** *Development*, 1998. Vol. 125: 1017-1024.
41. Debas Haile .D. **Molecular Insights into the development of the Pancreas.** *The American Journal of Surgery*, 1997. Vol. 174: 227-231.
42. Silver K. and Yao F. **ARIP cells as a model for pancreatic beta cell growth and development.** *Pancreas*, 2001. Vol. 22 (2): 141-147.
43. Sosa - Pineda B., Chowdhury K., Torres M., Oliver G., Gruss P. **The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing B cells in the mammalian pancreas.** *Nature*, 1997. Vol. 386: 399-402.
44. Øster A. Jensen, Serup P., Galante Philip, Madsen D. Ole, Larsson Lars-Inge. **Rat Endocrine Pancreatic development in relation to two Homeobox Gene products (PDX-1 and Nkx-6).** *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1998. Vol. 46(6): 707-715.
45. Edlund H. **Developmental Biology of the Pancreas.** *Diabetes*, 2001. Vol. 50: 55-59.
46. Herrera Pedro Luis. **Adult insulin and glucagon producing cells differentiate from two independent cell lineages.** *Development*. 2000. Vol. 127: 2317-2322.
47. Dohrmann C., Gruss Peter and Lemaire Lydia. **PAX Genes and differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas.** *Mechanisms of Development*, 2000. Vol. 92: 47-54.

48. Wierup N. and Sundler F. **Ultrastructure of islet ghrelin cells in the human fetus.** Cell Tissue Res. 2005. Vol. 319: 423-428.
49. Soria B., Skoudy A., Martín F. **From stem cells to beta cells: New strategies in the cell therapy of diabetes mellitus.** Diabetologia, 2001. Vol. 44: 407-415.
50. Jiang Fang-Xu, Cram S. David, DeAizpurua J. Henry and Harrison C. Leonard. **Laminin 1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic B-cells.** Diabetes, 1999. Vol. 48: 722-730.
51. Lammert E., Cleaver O., Melton D. **Role of endothelial cells in Early pancreas and liver development.** Mechanisms of Development, 2003. Vol. 120: 50-64.
52. Beta Cell Biology Consortium Artículo1
:<http://www.betacell.org/content/articles/print.php?aid=1>
53. Querejeta Villagómez Enrique. **Fisiología del as células beta pancreáticas.** In Síndrome Metabólico y Enfermedad Cardiovascular. González Chávez A, Lavallo González J. F., y Ríos González J. J. Eds. 2004, Intersistemas Editores. México D.F. pág: 25.
54. Pickup John, Goreth Williams. **Textbook of Diabetes.** Second Edition. 1997. Vol. 1 Blackwem Science. Chapter 8 and Chapter 10.
55. Saltiel R. Alan. **Diverse signalling pathways in the cellular actions of insulin.** Endocrinol. Metab. 1996. Vol. 33: E375-E385.
56. Hinke A. Simon, Hellemans Karine and Schuit Frans. **Plasticity of the B cell insulin secretory competence: preparing the pancreatic B cell for the next meal.** Journal of Physiology, 2004. Vol. 558 (2): 369-380.
57. Michal Gerhard. **Biochemical pathways: An atlas of Biochemistry and Molecular Biology.** John Wiley & Sons, Inc. 1999. New York, USA. pp 260.
58. Aronoff L. Stephen, Berkowitz Kathy, Shreiner Baub and Want Laura. **Glucose metabolism and regulation: Beyond Insulin and Glucagon.** Diabetes Spectrum. 2004. Vol. 17(3):183-190.
59. Cheng Alan, Dubé Nadia, Gu Feng and Tremblay L. Michel. **Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction.** Eur. J. Biochem. 2002. Vol. 269: 1050-1059.
60. Stoker W. Andrew. **Protein tyrosine phosphatases and signalling.** Journal of Endocrinology, 2005. Vol. 185: 19-33.
61. Bevan Paul. **Insulin Signalling.** Journal of Cell Science. 2001. Vol. 111(8): 1429-1430.
62. Jiang Guoqiang and Zhang B. Bei. **Glucagon and regulation of glucose metabolism.** Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2003. Vol. 284: E671 -E678.

63. <http://georges.dolisi.free.fr/Diabete/Insuline.htm&h=302&w=488&sz=13&hl=es&start=60&tbnid=iM3OjWO8iuGsHM:&tbnh=80&tbnw=130&prev=/images%3Fq%3Dglucagon%26start%3D54%26ndsp%3D18%26svnum%3D10%26hl%3Des%26lr%3D%26client%3Dsafari%26rls%3Des%26sa%3DN>
64. Cejvan Kenan, Coy H. David and Efendic Suad. **Intra-islet somatostatin regulates glucagon release via type 2 somatostatin receptors in rats**. Diabetes, 2003. Vol. 52: 1176-1181.
65. Wendt Anna, Birnir Bryndis, Buschard Karsten, Gromada Jesper, Salehi Albert, Sewing Sabine, Rorsman Patrik, and Braun Matthias. **Glucose inhibition of glucagon secretion from rat α cells is mediated by GABA released from neighboring β -cells**. Diabetes, 2004. Vol. 53: 1038–1045.
66. <http://shelx.uni-ac.gwdg.de/~fabio/pictures/scheme.jpg>
67. Ludvigsen Eva, Olsson Richard, Stridsberg Mats, Janson T. Eva and Sandler Stellan. **Expression and Distribution of somatostatin receptor subtypes in the pancreatic islets of mice and rats**. Journal of Histochemistry and Histochemistry. 2004. Vol. 52(3): 391-400.
68. Liu Yi-Jia, Hellman Bo and Gylfe Erik. **Ca⁺ Signalling in mouse pancreatic polypeptide cells**. Endocrinology, 1999. Vol. 140(12): 5524–5529.
69. Date Yukari, Nakazato Masamitsu, Hashiguchi Suzuko, Dezaki Katsuya, Mondal Muhtashan S., Hosoda Hiroshi, Kojima Masayasu, Kangawa Kenji, Arima Terukatsu, Matsuo Hisayuki, Yada Toshihiko, Matsukura Shigeru. **Ghrelin is present in pancreatic α - cells of humans and rats and stimulates insulin secretion**. Diabetes, 2002. Vol. 51: 124-129.
70. Hugues Hernandorena Beatriz, Rodríguez González Julio César y Rodríguez García Julio César. **Animales de Laboratorio en la Endocrinología: Biomodelos de la Diabetes mellitus tipo 1**. Rev. Cubana Endocrinol. 2001. Vol. 12(3): 168-177.
71. Hugues Hernandorena Beatriz, Rodríguez González Julio César, Rodríguez García Julio César y Marrero R. Ma. Teresa. **Animales de Experimentación como modelos de la Diabetes tipo 2**. Rev. Cubana Endocrinol. 2002. Vol. 13(2): 160–168.
72. Batell L. Mary, Yuen G. Violet, Verma Subodh, and McNeill H. John. **Other models of Type I Diabetes**. In Experimental models in Diabetes. Eds. McNeill J. Ed. 1999. CRC Press. USA. Pag: 219 – 229.
73. JAX® Research Models for Diabetes & Obesity Research at jaxmice.jax.org/models/diabetes_obesity
74. http://www.libreriamedica8a.com/productos/2479_archivos/image004.jpg
75. Rodriguez B., Poucheret P., Battel M.L. Mc. and Neill J. **Streptozotocin - Induced diabetes Induction mechanism (s) and dose dependency**. In experimental Model in Diabetes; Mc Neill J. Ed. 1999. CRC Press. USA. pag 3-17.
76. Bolzán Alejandro, and Bianchi S. Martha. **Genotoxicity of Streptozotocin**. Mutation Research, 2002. Vol. 512: 121-134.

77. Kalter Harold. **Reproductive Toxicology in animals with induced and spontaneous Diabetes**. Reproductive Toxicology, 1996. Vol. 10(6): 417-438.
78. Arulmozhi D.K., Veeranjanyulu A., Bodhantar S.L. **Neonatal streptozotocin-induced rat model of Type 2 Diabetes mellitus: A Glance**. Indian Journal of Pharmacology, 2004. Vol. 36: 217-221.
79. McIntosh H.S. Christopher, Pederson R.A. **No insulin Dependent Animal Model of Diabetes mellitus**. In: Experimental Models of Diabetes. Eds. John H. McNeill, 1999. CRC Press LLC, Flor. USA. Pag: 338-398.
80. <http://www.axxora.com/files/formula/ALX-380-010.gif>
81. Takasu N. Komiya I., Asawa T., Nagasawa Y., Yamada T. **Streptozotocin and Alloxan - Induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets**. Diabetes, 1991. Vol. 40: 1141-1145.
82. Szkudelski T. **The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas**. Physiol. Res. 2001. Vol. 50: 536-546.
83. Polanco Ponce Ana Cecilia, Revilla Monsalve María Cristina, Palomino Garibay Miguel Ángel, Islas Andrade Sergio A. **Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas**. Ginecol. Obstet Mex. 2005. Vol. 73: 544-552.
84. Eriksson J. Ulf Andersson Arne, Efendic Suad, Elde Robert and Hellerström Claes. **Diabetes in pregnancy: effects on the foetal and newborn rat with particular regard to body weight, serum insulin concentrations and pancreatic contents of insulin, glucagon and somatostatin**. Acta Endocrinologica, 1980. Vol. 94: 354-364.
85. Uriu-Hare Y. Janet, Stern S. Judith, Reaven M. Gerald, and Keen L. Carl. **The effect to Maternal Diabetes on trace elements status and fetal Development in the rat**. Diabetes, 1985. Vol. 34: 1031-1040.
86. Sybulski S. and Maughan G.B. **Use of streptozotocin as diabetic agent in pregnant rats**. Endocrinology, 1971. Vol. 89(6): 1537-1540.
87. Deuchar E.M. **Embryonic malformations in rats, resulting from maternal diabetes: preliminary observations**. J. Embriol. Exp. Morphol. 1977. Vol. 41: 93-99.
88. Eriksson U.J., Dahlstrom E. and Hellerstrom C. **Diabetes in pregnancy: Skeletal malformations in the offspring of diabetic rats after intermittent withdrawal of insulin in early gestation**. Diabetes, 1983. Vol. 32(12): 1141-1145.
89. Reece E. A. and Eriksson U.J. **The pathogenesis of diabetes associated congenital malformations**. Obstet. Gynecol. Clin. North. Am. 1996. Vol. 23(1): 29-45.
90. García J. Heladia, Rodas López María del Carmen. **Morbilidad en el recién nacido con fetopatía diabética**. Rev. Med, IMSS. 2002. Vol. 40(1): 5-10.

91. Eriksson J. Ulf, Karlsson Mats-Göte and Styruð Johan. **Mechanisms of congenital malformations in diabetes pregnancy.** Biol. Neonate, 1987. Vol. 51: 113-118.
92. Eriksson J. Ulf and Jansson Leif. **Diabetes in pregnancy: decreased placental blood flow and Disturbed fetal development in the rat.** Pediatric Research, 1984. Vol. 18(8): 735 – 737.
93. Loredó Nuñez Elidia. **Efecto de la Diabetes Materna sobre la estructura de la placenta de 20 días de desarrollo.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F. 2003. 72 pp.
94. Palacín M., Lasunción M.A., Herrera Martín. **Decreased uterine blood flow in the diabetic pregnant rat does not modify the augmented glucose transfer to the fetus.** Biol. Neonate. 1985. Vol. 48: 197-203.
95. Barash V., Gutman A. and Shafrir E. 1985. **Fetal Diabetes in rats and its effect on placental glycogen.** Diabetologia. Vo. 28: 244-249.
96. Su Ching- Hiu and Rouse A. Glen. 2004. **Congenital Malformations: Diabetic embryopathy versus Trisomy 13.** JDMS. 20: 124-130.
97. Aerts L., Van Assche F.A. **Intra-uterine Transmission of Disease.** Placenta, 2003. Vol. 24: 905-911.
98. García-Carrapato Manuel. **The offspring of gestational diabetes.** J. Perinat. Med. 2003. Vol. 31(5): 5-11.
99. Fowden A.L., Forhead A.J. **Endocrine mechanisms of intrauterine programming.** Reproduction, 2004. Vol. 127: 515-526.
100. Kim J.N., Runge W., Wells L.J., Lazarow A. **Pancreatic islets in blood sugar in prenatal and postnatal offspring from diabetic rats: beta granulation and glycogen infiltration.** Anat. Rec. 1960. Vol. 238: 239-259.
101. Pitkin R.M., Van Orden D.E. **Fetal effects of maternal streptozotocin-diabetes.** Endocrinology, 1974. Vol. 94(5): 1247-1253.
102. Giavini E., Broccia M.L., Prati M., Roversi G.D. and Vismaria C. **Effects of streptozotocin-induced Diabetes on Fetal Development of the rat.** Teratology, 1986. Vol. 34: 81-88.
103. Hølemans K., Aerts L. and Van Assche F.A. **Life consequences of abnormal fetal pancreatic development.** Symposium Report. J. Physiol. 2003. Vol. 547 (1): 11-20.
104. Madsen O.D., Jensen J., Blume N., Petterson J., Lund K., Karlson C., Andersen Frank, Jensen B., Larson L., Serup P. 1996. **Pancreatic Development and maturation of the islet B cell. Studies of pluripotent islet cultures.** Eur. J. Biochem. Vol. 242: 435- 445.
105. Hellerström C, Swenne I. and Eriksson U.J. **Is their animal model of gestational diabetes?** Diabetes, 1985. Vol. 34 (suppl 2): 28-31.

106. Islas Andrade S., Revilla Monsalve Ma. C., Escobedo de la Peña J., Polanco Ponce A.C., Palomino Garibay M.A. and Feria Velasco A. **Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: Comparison of the two models in rats.** Acta of Histochemistry & Cytochemistry, 2000. Vol. 33(3): 201-208.
107. Naismith D.J. and Morgan B.L.G. **The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat.** British Journal of Nutrition, 1976. Vol. 36: 563-566.
108. Yamada Ruth, Griggio Mauro A. and Luz Jaqueline. **Energy balance of pregnant diabetic rats.** British Journal of Nutrition, 2002. Vol. 87: 509-515.
109. Butte F. Nancy, Hopkinson M. Judy, Mehta Nitesh, Moon K. Jon, and O'Brian Smith E. **Adjustments of energy expenditure and substrate utilization during late pregnancy and lactation.** Am. J. Clin. Nutr. 1999. Vol. 69: 299-307.
110. King C. Janet. **Physiology of pregnancy and nutrient metabolism.** Am. J. Clin. Nutr. 2000. Vol. 71(suppl): 1218S-1225S.
111. Magnusson A.L., Waterman I.J., Wennergren M., Jansson T. And Powell T. L. **Triglyceride hidrolase activities and expression of fatty acids binding proteins in the human placenta in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and Diabetes.** The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004. Vol. 89: 4607-4614.
112. Kilby D. M., Neary H. R., Mackness I. M. and Durrington N. P. **Fetal and maternal lipoprotein metabolism in human pregnancy complicated by type 1 Diabetes mellitus.** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1998. Vol. 83: 1736-1741.
113. Clapés Hernández Sonia. **Diabetes mellitus, estrés oxidativo y embarazo.** Rev. Cub. Invest. Biomed. 2000. Vol. 19(3): 191-195.
114. Casanueva E. and Viteri E. F. **Iron oxidative stress in pregnancy.** Journal of Nutrition. 2003. Vol. 133(6): 1700S-1708S.
115. Eriksson J. Ulf and Borg L.A. Hakan. **Role of substrate-induced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos.** Diabetes, 1993. Vol. 42: 411-419.
116. Phellan A.S., and Ito M.M.R. **Loeken: Neural tube defects in embryos of diabetic mice. Role of the Pax-3 gene and apoptosis.** Diabetes, 1997. Vol. 46: 1189-1197.
117. Pergsson Bengt. COMMENTARIES: **Prevention of fetal malformation with antioxidants in diabetic pregnancy.** Pediatric Research, 2001. Vol. 49(6): 742-743.
118. Gewolb I.H., Barret C., Warshaw J.B. and Enders A. C. **Fine structural abnormalities of placenta in diabetic rats.** Diabetes, 1986. Vol. 35: 1254-1261.
119. Wentzel P., Jonsson L., Eriksson J. **Diabetes in pregnancy: Uterine blood flow and embrionic development in the rat.** Pediatric Research, 1995. Vol. 38: 598-606.

120. Takenaka Yukiko and Toyoda Nagayasu. **The effect of alpha1-blocking vasolidator on fetal growth and uteroplacental blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats.** Life Sciences, 1995. Vol. 56(13): 1127-1134.
121. Mayes A.P. y Bender A.D. **Carbohidratos de importancia fisiológica.** In Harper Bioquímica Ilustrada. 16a Edición. 2004. Ed. Manual Moderno. México D.F. pág: 155-132.
122. Ballabriga A., Carrascosa A. **Nutrición en la infancia y en la adolescencia.** Ediciones Ergon S.A. 1998. Madrid, España. Capítulo 1, pág: 1- 32.
123. Eiksson U. and Swenne I. **Diabetes in pregnancy: Growth of the fetal pancreatic B cells in the rat.** Biol. Neonate, 1982. Vol. 42: 239-248.
124. Atkins Valerie, Flozak S. Annette, Ogata S. Eduard. and Simmons A. Rebecca. 1994. **The effects of severe maternal Diabetes on glucose transport in the fetal rat.** Endocrinology.135(1): 409-415.
125. Alvarez C., Martín M.A., Goya L., Bertin E., Portha B and Pascual-Leone A.M. **Contrasted impact of maternal rat food restriction on the fetal endocrine pancreas.** Endocrinology, 1997. Vol. 138: 2267- 2273.
126. Lechner Andreas and Habener F. Joel. **Stem/progenitor cells derived from adult tissue: potential for treatment of diabetes mellitus.** Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2003. Vol. 284: E259-E266.
127. Bergsten P., Aoyagi K., Persson E. Eriksson U.J. and Hellerström C. **Appearance of glucose - induced insulin release in fetal rat B - cells.** Journal of Endocrinology. 1998. Vol. 158: 115-120.
128. Rorsman Patrik, Arkhammar Per, Bokvist Krister, Hellerström Claes, Nilsson Thomas, Welsh Michael, Welsh Nils and Berggen Per-Olof. **Failure of glucose to elicit a normal secretory response in fetal pancreatic beta cells results from glucose insensitivity of the ATP-regulated K⁺ channels.** Proc. Natl. Acad. Sci. 1989. Vol. 86: 4505-4509.
129. Aerts L. and Van Assche F.A. **Rat fetal endocrine pancreas in experimental diabetes.** Journal of Endocrinology, 1977. Vol. 73: 339 - 346.
130. Calvo Rosa María, Forcen Rosa, Obregón María Jesús, Escobar del Rey Francisco, Morreale de Escobar Gabriella and Regadera Javier. **Immunohistochemical and morphometric studies of the fetal pancreas in diabetic pregnant rats. Effects of insulin administration.** The Anatomical Record, 1998. Vol. 251: 173-180.
131. Aerts L., Van Bree R., Feytons V., Rombauts W, and Van Assche F.A. **Plasma aminoacids in diabetic pregnant rats and in their fetal and adult offspring.** Biol. Neonate, 1989. Vol. 56(1): 31-39.
132. Baker Julie, Liu Jeh-Ping, Robertson J. Elizabeth and Efstratiadis. **Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth.** Cell, 1993. Vol. 75: 73-82.

133. Regnault R.H T., Limesand W.S. and Hay W.W. **Factors that influencing in the fetal growth.** Neoreviews, 2001. Vol. 2: E119-E128.
134. Hill J. David and Duvill  Bertrand. 2000. **Pancreatic Development and adult Diabetes.** Pediatric Research. Vol. 48 (3): 269 -271.
135. Wu Guoyao, Bazer W. Fuller, Cudd A. Timothy, Meininger J. Cynthia and Spencer E. Thomas. **Maternal nutrition and fetal development.** J. Nutr. 2004. Vol. 134: 2169-2172.
136. Cnop Miriam, Hannaert Jean Claude, Hoorens Anne, Eizirik L. D cio and Pipeleers G. Daniel. **Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islets cells and cellular triglyceride accumulation.** Diabetes, 2001. Vol. 50: 1771-1777.
137. Poirout Vincent and Robertson R. Paul. **Minireview: Secondary B-cell failure in Type 2 Diabetes –A convergence of glucotoxicity and lipotoxicity-.** Endocrinology, 2002. Vol. 143: 339-342.

XIII.-ANEXOS

ANEXO 1: SOLUCIONES AMORTIGUADORAS Y DE FIJACIÓN.

1.- Buffer de acetato de sodio a 0.1 M con pH 4.3

- Agua destilada -----> 100 ml.
- Acetato de sodio (a 0.1 M) -----> 1.3608 g.

2.- Solución buffer de formaldehído al 10% con pH 7.2.

- Formol a 37 - 40 % -----> 100 ml.
- Agua destilada -----> 900 ml.
- Fosfato de sodio monobásico -----> 4 g.
- Fosfato de sodio dibásico -----> 6.5 g.

3.- Solución de Bouin

- Solución acuosa saturada de ácido pícrico -----> 750 ml.
- Formol a 37 -40% -----> 250 ml.
- Acido acético glacial -----> 50 ml.

ANEXO 2: SOLUCIONES PARA TÉCNICAS DE TINCION.

1.- HEMATOXILINA - EOSINA

Solución de Hematoxilina de Harris.

- Hematoxilina de Harris -----> 250 ml.

Solución de Eosina Acuosa.

- Eosina azulosa -----> 1g.

- Orange G -----> 1g.

- Agua destilada -----> 100 ml.

Resultados:

Núcleos celulares → Azul

Citoplasma → Rojo a naranja

2.-METODO DE GOMORI PARA ISLOTES PANCREATICOS

Solución de Bouin (Ver Anexo 1)

Solución de permanganato de potasio.

Permanganato de potasio0.3g

Agua destilada..... 100ml.

Acido sulfúrico concentrado.....0.3ml.

Solución de bisulfito de sodio al 5%.

Bisulfito de sodio.....5g.

Agua destilada.....100ml.

Solución de Hematoxilina - Cromo.

Hematoxilina, 1% solución acuosa.....50ml.

Sulfato de potasio - cromo, 3% solución acuosa50ml.

Para 100ml. de hematoxilina - cromo se adiciona 0.1g de yoduro de potasio. La mezcla se deja madurar, y se filtra antes de usar.

Solución ácido alcohol al 1%.

Alcohol al 70%.....100ml.

Acido clorhídrico concentrado.....1ml.

Solución de floxina B al 0.5%.

Floxina B.....0.5g.

Agua destilada.....100ml.

Solución de ácido fosfotungstico al 5%.

Acido fosfotungstico.....5g.

Agua destilada.....100ml.

Resultados: Células α → Rojas.

Células β → Azules.

Células δ → De rosas a rojo e indistinguibles de las células α .

ANEXO 3: INMUNOHISTOQUÍMICA

SOLUCIONES:

Solución amortiguadora PBS a pH 7.2

- Fosfato de sodio dibásico8.5176g.
- Fosfato de sodio monobásico.....3.4834g.
- Cloruro de sodio.....11.9462g.
- Agua destilada.....1000ml.

Solución PBS - Twin a 0.1%

- Solución PBS a pH 7.2300ml.
- Solución Twin 20 (Dako KS1966).....0.3ml.

Peróxido de Hidrógeno al 3%

- Peróxido de Hidrógeno al 30%.....10ml.
- Agua destilada.....90ml.

Combinarse con alcohol metílico en una relación 1 a 5.

- Alcohol metílico (4 partes).....80ml.
- Peróxido de hidrógeno al 3% (1 parte).....20ml.

Anticuerpo

Anti-insulina (anti ratón) 1: 250

- Anticuerpo de Insulina (LabVision) Cocktail anti-ratón.....1µl.
- Solución PBS- Twin a 0.1%.....249µl.

Índice de Abreviaturas.

μ l= micrólitos.
 μ m= micrómetros.
1d.V.E.U.= 1er. día de vida extrauterina.
ADP= Difosfato de adenosina.
AMPc= Monofosfato de adenosina cíclico.
ATP= Trifosfato de adenosina.
cm= centímetros.
DNA= Ácido desoxirribonucleico.
dpc= días post-coito.
g= gramos.
GABA= Ácido γ -aminobutírico.
GIP= Péptido inhibitorio gástrico.
GLP-1= Péptido tipo glucagon-1.
GLUT1= Transportador de glucosa tipo 1.
GLUT2= Transportador de glucosa tipo 2.
GLUT4= Transportador de glucosa tipo 4.
H/E= Método de tinción hematoxilina-eosina.
HC= Hormona de crecimiento.
HCL= ácido clorhídrico.
HE= Hematoxilina.
IGF-1= Factor de crecimiento insulínico tipo I.
IGF-II= Factor de crecimiento insulínico tipo II.
ip.= intraperitoneal.
IR= Receptor de insulina.
IRS-1= Sustrato receptor de insulina-1.
kDa= Kilo Daltones.
LC= Lote Control.
LE= Lote Experimental.
M= Molar.
mg/dl= miligramos por decilitro.
mg/kg= miligramos por kilogramo.
mm= milímetros.
MPME= Metaloproteínas de matriz extracelular.
mRNA= Ácido ribonucleico mensajero.
NAD= Nicotin Adenin dinucleótido.
nm= nanómetros.
ON= Óxido nítrico.
pc.= post-coito.
PDX1= Gen homeobox duodeno- pancreático 1.
PP= Polipéptido pancreático.
RNA= Ácido ribonucleico.
SST= somatostatina.
STZ= Estreptozotocina.
TGF- β = Factor transformante de crecimiento tipo β .
UDP= Difosfato de úracilo.
VLDL= Lipoproteínas de muy baja densidad.