



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

RECAMBIO EN LAS CÉLULAS BETA DE LOS ISLOTOS PANCREÁTICOS EN RATAS
DURANTE EL DESTETE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B Jazmín García Morales

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta
[Facultad de Química](#)

Dra. Elena Zambrano González
[Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

Ciudad de México. Diciembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos académicos:

El trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, de la división de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los donativos para la realización del proyecto CB-253222 y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por los donativos para el proyecto IN213114 otorgados a la Dra. Marcía Hiriart; de los cuales este trabajo forma parte.

Se agradece al CONACYT por otorgarme la beca de formación de posgrado de excelencia, inscrita bajo el número 580237.

Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para asistir al LVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, celebrado del 6 al 9 de septiembre del 2015 en San Miguel de Allende, Guanajuato.

Parte de los resultados de esta tesis se encuentran publicados en el artículo:

Carlos Larqué, Myrian Velasco, Francisco Barajas-Olmos, Neyvis García-Delgado, Juan Pablo Chávez-Maldonado, Jazmín García-Morales, Lorena Orozco & Marcia Hiriart. (2016) Transcriptome landmarks of the functional maturity of rat beta-cells, from lactation to adulthood. *Journal of Molecular Endocrinology*: 57, 45–59.

ÍNDICE

<i>Resumen</i>	5
<i>Abreviaturas</i>	6
I. MARCO TEÓRICO	8
1. CÉLULA β MADURA	8
1.1 El páncreas de los mamíferos y el islote pancreático	8
1.2 La célula beta y la secreción de insulina	10
1.3 Plasticidad de células β durante la edad adulta.....	12
1.3.1. Proliferación celular	14
1.3.2 Neogénesis	21
1.3.3 Apoptosis.....	24
2. <i>DESARROLLO Y MADURACIÓN DE CÉLULA β</i>	25
2.1 Desarrollo embrionario del páncreas	25
2.2 Periodo neonatal y lactancia	29
2.3 Destete.....	33
II. ANTECEDENTES	37
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
IV. HIPOTESIS	41
V. OBJETIVO GENERAL	41
5.1 Objetivos particulares:.....	41
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	42
6.1 <i>Animales</i>	42
6.2 <i>Inmunohistoquímicas</i>	42
• 6.2.1 Tinción triple para insulina, glucagon y núcleos	43
• 6.2.2 Proliferación en las células β	44
• 6.2.3 Apoptosis en células β	45
VII. RESULTADOS	47
VIII. DISCUSIÓN	59
IX. CONCLUSIONES	63
X. REFERENCIAS	64

Resumen

La maduración del páncreas en rata se presenta después del nacimiento, durante el primer mes de vida. Alrededor del día posnatal 20 (P20) las ratas presentan un estado fisiológico de resistencia a la insulina, es cual se normaliza cerca del día P28 (Aguayo-Mazzucato et al. 2006). En esta etapa también se ha observado la formación de la vasculatura, la inervación y la formación de la cápsula que rodea al islote, conformando la arquitectura de un islote maduro (Cabrera-Vasquez et al. 2009). Lo anterior se relaciona con el destete y el inicio de la dieta omnívora.

Mediante el análisis de un transcriptoma comparativo entre los adultos y esta etapa se observó al día P20 la sobreexpresión de genes relacionados con el ciclo celular y la replicación del DNA (Larqué et al. 2016). Por lo cual, se analizó si esta observación se correlacionaba con los procesos de proliferación de las células β y un posible recambio (proliferación y apoptosis) de éstas en el día P20.

La investigación se realizó mediante inmunofluorescencias para insulina, glucagon y células apoptóticas en páncreas (en sus dos secciones: cabeza y cola) y se evaluó la proliferación de las células β en cultivos primarios utilizando Ki67. No se encontraron diferencias significativas en la tasa de proliferación, entre las dos edades estudiadas (2.7% P20 y 1.3% adultas). Tampoco se detectó apoptosis. Sin embargo, los islotes de ratas adultas fueron mayores que al día P20, presentaron una mayor cantidad de células β (hiperplasia) y un aumento en el tamaño de las células α y β (hipertrofia).

En conclusión, al día P20 las células β del islote pancreático no presentan un recambio. Sin embargo, a pesar de que su tasa de proliferación es baja, al estar constante durante los primeros meses de vida, aunado a la escasa apoptosis y a la hipertrofia en las células β y α , el islote pancreático aumenta de tamaño.

Abreviaturas

ADP: Adenosina difosfato

AKT: Proteína cinasa (PKB)

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

Arx: Gen homeotico relacionado con la ausencia de aristas

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: Albumina serica bobina

CDK: Cinasa dependiente de ciclina

CIP: Proteína inhibidora de ciclina

CPT1: Carnitina palmitoil transferasa

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E2F: Factor de transcripción E2F

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ERK: Cinasa regulada por señales extracelulares

ERR γ : Receptor de estrógeno tipo γ

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FOXO: Proteína con caja de cabeza de tenedor

GIP: Polipéptido inhibidor gástrico

GLP-1: Péptido similar al glucagon tipo 1

GLUT: Transportador de glucosa

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

IGF: Factor de crecimiento insulínico

INK: Proteínas inhibidoras de cinasas

JAK: Cinasa de janus

K_{ATP}: Canal de Potasio sensible a ATP

KCa: Canales de K⁺ dependientes de calcio

KV₂: Canal K⁺ dependientes de voltaje del tipo rectificador tardío

LDH: Lactato deshidrogenasa

MafA: Homologo A del oncogene del fibrosarcoma musculoaponeurotico aviar
MAfB: Homologo B del oncogene del fibrosarcoma musculoaponeurotico aviar
mGPDH: Glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial
miRNA: Micro ácido ribonucleico
mMDH: Malato deshidrogenasa mitocondrial
MTOR: Blanco de rampamicina en mamíferos
NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina
Ngn3: Neurogenina 3
Nkx6.1: Gen homeotico 1 NK6
Pax4: Gen de caja pareada 4
PBS: Amortiguador de fosfato salino
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K: Fostatidilinositol 3-cinasa
PTF1a: Factor de transcripción específico de el pancreas
RB: Proteína de retinoblastoma
Slc16a1: Transportador de lactato piruvato
Sox9: SRY (región determinante del sexo Y) - caja 9
STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción
TGF- α : Factor de crecimiento transformante alfa
TRP: Receptores de potencial transitorio
TSC: Proteínas de esclerosis tuberosa
TUNEL: El Marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa

I. MARCO TEÓRICO

1. CÉLULA β MADURA

1.1 El páncreas de los mamíferos y el islote pancreático

El páncreas de los mamíferos está situado en la cavidad abdominal, entre el bazo y el duodeno. Esta glándula está compuesta por dos lóbulos; el esplénico o dorsal es una estructura alargada que comprende al cuerpo y la cola del páncreas, y el lóbulo duodenal o ventral, más pequeño, comprende a la cabeza del páncreas y sigue la estructura duodenal (Figura 1) (Hiriart 2005).

El páncreas es una glándula de secreción mixta formada por células exocrinas y endocrinas. Las primeras están compuestas por acinos y conductos y forman aproximadamente el 98% de la masa total del páncreas, mientras que las segundas están constituidas por los islotes pancreáticos los cuales constituyen del 1 a 2% del volumen total de la glándula (Hiriart 2005).

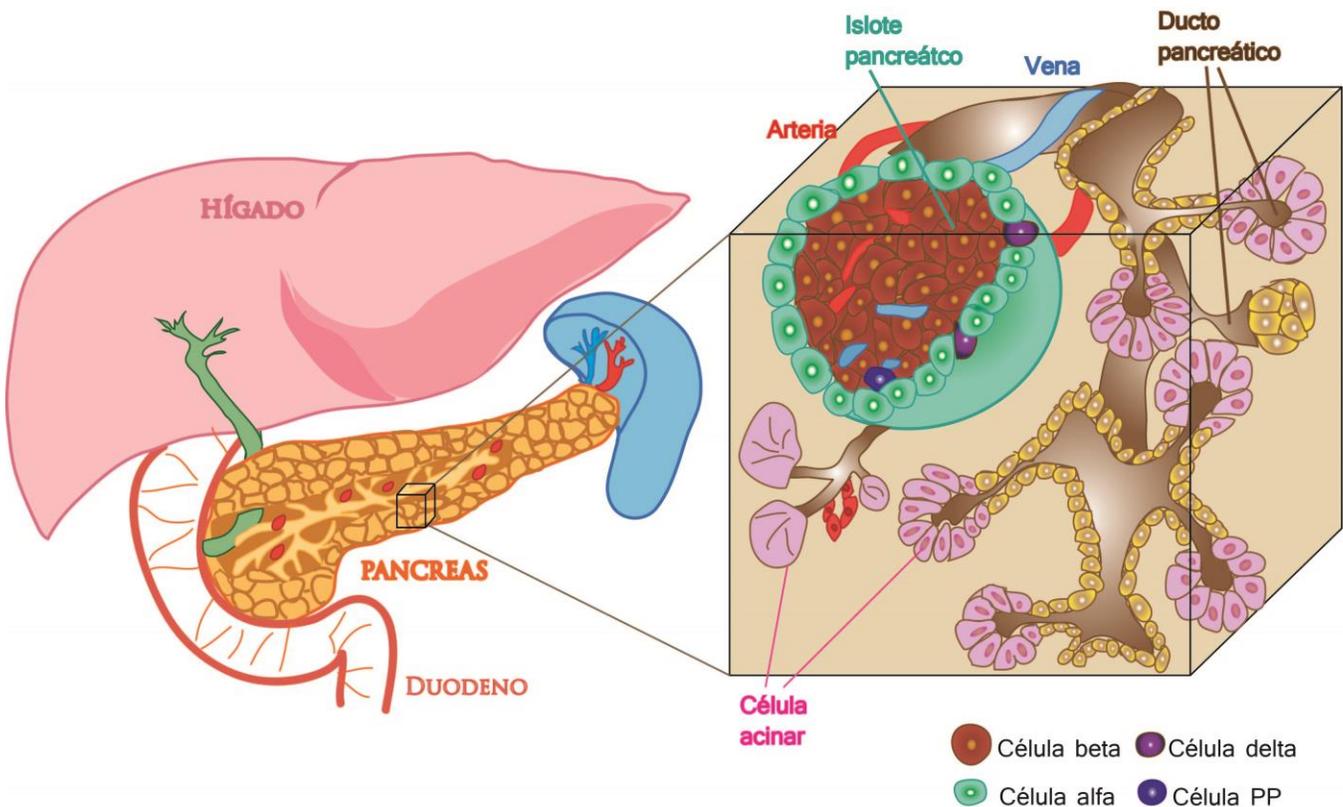


Figura 1. Anatomía general del páncreas adulto. La imagen muestra la organización característica de un islote de rata con las células β localizadas en el centro; y las células α y las células δ y PP localizadas en la periferia del islote.

Los islotes pancreáticos han sido descritos como agrupaciones esferoides compuestas principalmente de células β (productoras de insulina), células α (productoras de glucagon) y una menor población de células δ (productoras de somatostatina) y células PP (productoras de polipéptido pancreático). Recientemente, se ha descrito que muchas especies durante el desarrollo y en el periodo posnatal temprano, presentan un quinto tipo endocrino celular, las células ϵ ; las cuales producen la hormona ghrelina. Todas estas células vierten su secreción al torrente sanguíneo y participan en diversas funciones fisiológicas, como la homeostasis de glucosa (In't Veld and Smeets 2015).

Cada tipo celular endocrino se caracteriza por su contenido de hormonas peptídicas, por la morfología típica de su gránulo de secreción, y sus interacciones endocrinas, paracrinas y neuronales específicas (Scott Heller 2015).

Los islotes varían en tamaño y rango, desde pequeños grupos de unas pocas células a grandes agregados de miles de células. La organización y proporción de cada tipo celular que conforma el islote pancreático varía según la especie. En roedores como ratones, ratas y hámsteres, los islotes tienen formas esferoides con células β en el centro del islote y constituyen de un 60 a un 80% de la población, mientras que las células α , δ y PP se localizan en la periferia y forman del 15 a 20%, 5 a 10% y el 2% respectivamente. A diferencia de los roedores, en los islotes humanos las células α y δ se encuentran dispersas entre la masa de células β . Aunado a esto, las proporciones también difieren pues las células β abarcan de un 40-60%, las células α de un 20-40% y las células δ alrededor de un 10% y hay pocas células PP en el islote (Ben-Othman et al. 2013; Hiriart 2005).

Los islotes pancreáticos tienen innervación simpática y parasimpática. Las fibras nerviosas parasimpáticas liberan acetilcolina, neurotransmisor que estimula la secreción de insulina por la célula β pancreática. Mientras que las fibras nerviosas simpáticas secretan noradrenalina, neurotransmisor que inhibe la secreción de insulina y a su vez estimula la secreción de glucagon por la célula α . La Imagenología confocal de islotes humanos indica que las fibras simpáticas innervan preferentemente el centro del islote, mientras que las parasimpáticas son raras. Además, los islotes son penetrados por una densa red de capilares y rodeados por una cápsula de colágeno que separa las células endocrinas del compartimento exocrino (In't Veld and Smeets 2015).

1.2 La célula beta y la secreción de insulina

Las células β secretan insulina, esta es una de las hormonas más importantes en el metabolismo y es esencial para la vida; si un animal nace sin insulina, muere a las pocas horas de diabetes y cetoacidosis. Cuando la glucosa en sangre aumenta, se estimula la secreción de insulina por parte de las células β de los islotes pancreáticos. Al entrar en las células β , la concentración de glucosa en sangre disminuye y cesa el estímulo que inició la liberación de insulina (Hiriart 2005).

La glucosa entra en las células β principalmente a través de los transportadores de glucosa GLUT 2 en roedores y GLUT 1 en humanos, posteriormente la enzima citoplasmática glucocinasa cataliza su fosforilación produciendo glucosa 6-fosfato, la cual es metabolizada a través de la glucólisis dando como resultado la formación de piruvato; este es oxidado en la mitocondria para producir ATP a partir de ADP, por ende se incrementa la relación ATP/ADP citoplasmática. El aumento del ATP conlleva al cierre de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}), que son los responsables del potencial de membrana en reposo de la célula β ($V_m = -60$ mV en condiciones de glucosa basal) (Hiriart and Aguilar-Bryan 2008).

Aunado al cierre de los canales K_{ATP} , las células β contienen canales catiónicos no selectivos del tipo TRP que conducen principalmente Na^+ . Tanto el cierre de los canales de K^+ , como la entrada de Na^+ despolarizan el potencial de membrana de la célula a un nivel que incrementa la probabilidad de apertura de los canales de Na^+ y Ca^{2+} de tipo T dependientes de voltaje (alrededor de -40 mV), lo cual acentúa la despolarización. En consecuencia, se activan los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de alto umbral de activación (principalmente los de tipo L) y se alcanza un potencial de meseta donde se superpone el potencial de acción (Hiriart and Aguilar-Bryan 2008; Hiriart, Velasco, Diaz-Garcia, et al. 2014). El influjo de calcio a través de estos canales incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} , lo que desencadena la exocitosis de los gránulos de secreción que contienen insulina. Por último, los canales K^+ dependientes de voltaje del tipo rectificador tardío (K_v2) y los canales de K^+ dependientes de calcio (KCa) restauran el potencial de reposo (Figura 2) (Hiriart and Aguilar-Bryan 2008; Hiriart, Velasco, Larqué, et al. 2014).

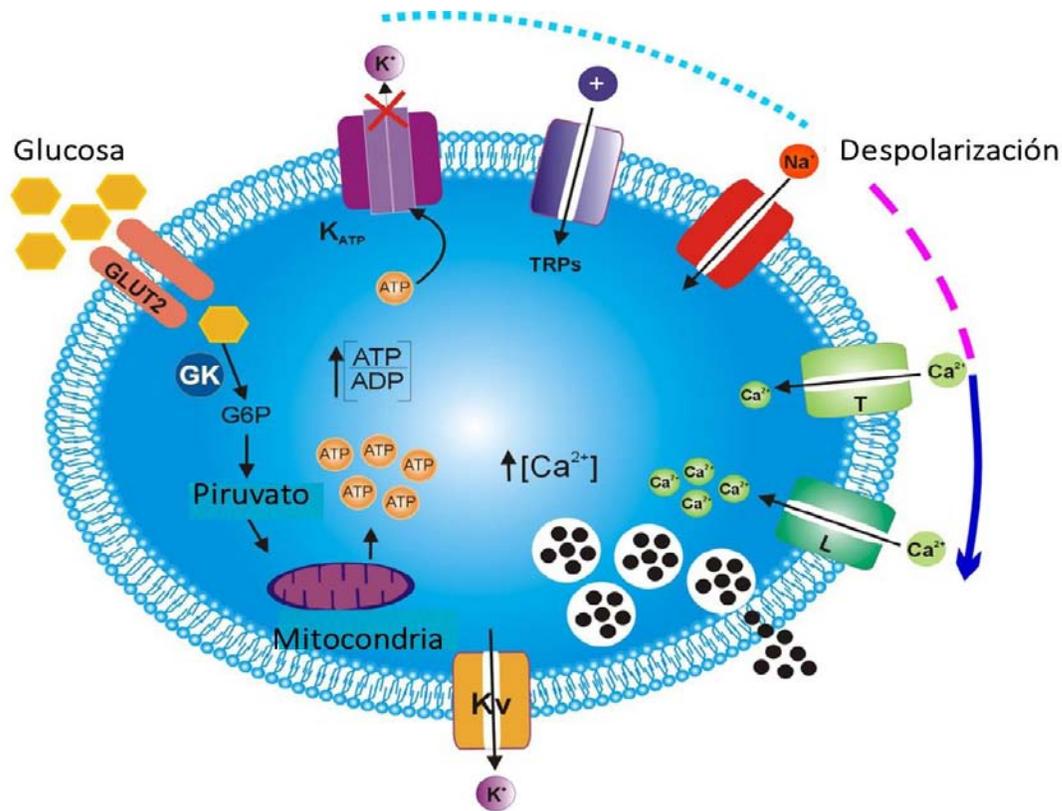


Figura 2. Secreción de insulina estimulada por glucosa en rata. Tomado y modificado de Hiriart et al; 2014.

La secreción de insulina también puede ser estimulada por aminoácidos como alanina, asparagina, glicina, glutamato, fenilalanina y triptofano, individualmente o una mezcla de todos en presencia de glucosa. La leucina es una excepción, puesto que sus acciones estimulantes en páncreas de rata perfundido se erradican en presencia de glucosa. Los aminoácidos que se cotransportan con Na⁺ despolarizan la membrana causando un influjo de Ca²⁺ y desencadenando la secreción de insulina. La alanina y la leucina incrementan la producción de ATP, promoviendo el cierre de los canales K_{ATP} (Hiriart, Velasco, Diaz-Garcia, et al. 2014; Zhang and Li 2013).

También se ha demostrado que los niveles sanguíneos normales de ácidos grasos no esterificados son necesarios para mantener la secreción de insulina en las células β, los efectos de los ácidos grasos no esterificados son dependientes del tiempo y la concentración. Su elevación transitoria potencia la secreción mientras que una exposición a largo plazo daña el proceso.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar el papel fisiológico de los ácidos grasos no esterificados en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Durante el estado de ayuno los ácidos grasos circulantes son oxidados incrementando la producción de ATP, la despolarización de la célula y la secreción de insulina. Mientras que durante la alimentación, los ácidos grasos asociados al metabolismo de glucosa regulan las vías anapleróticas y catapleróticas mitocondriales y de esta manera la secreción de insulina. Además, cuando los niveles de glucosa aumentan, la oxidación de los ácidos grasos disminuye, llevando a la acumulación de Acil-CoA de cadena larga, lo cual facilita la fusión de las vesículas de insulina en la membrana de la célula β (Hiriart, Velasco, Larqué, et al. 2014).

Posterior a su secreción por las células β , la insulina desempeña un papel fundamental en el control del metabolismo. Es una hormona anabólica que favorece la captación, utilización y almacenamiento de glucosa, aminoácidos y lípidos, después de la ingesta por casi todos los tejidos del organismo, pero sobre todo por los músculos, el tejido adiposo y el hígado. Al mismo tiempo que ejerce una acción inhibitoria sobre los procesos catabólicos como la degradación de glucógeno, grasas y proteínas. Muchas de estas acciones dependen de los efectos de la hormona sobre la transcripción de genes, una vez que la insulina interactúa con su receptor (Hall 2016).

1.3 Plasticidad de células β durante la edad adulta

La plasticidad endocrina en el páncreas se puede definir como la capacidad que tiene este órgano para regular la masa de célula β según las necesidades de insulina y poder así garantizar un óptimo control de la glucemia. Esta plasticidad implica tanto una capacidad de expansión como de disminución de la masa de célula β , la cual depende de los cambios en la formación de células (proliferación y neogénesis), el tamaño individual de la célula (atrofia e hipertrofia) y la muerte celular (Montanya, Nacher, and Soler 2000).

A pesar de que se pensaba que un organismo nace con todas las β células que tendrá durante su vida, la evidencia actual demuestra que se pueden formar nuevas células β a lo largo de la vida (Ackermann and Gannon 2007). Durante la etapa adulta se ha descrito que la principal fuente de renovación de las células β es la proliferación de las células β preexistentes (Dor et al. 2004), aunque en condiciones normales esta es relativamente baja (Scaglia et al. 1997).

Sin embargo, existen condiciones fisiológicas durante las cuales un aumento de la demanda metabólica se compensa por un aumento en la masa de células β . Por ejemplo, durante el embarazo tanto en humanos como en ratones la masa de las células β incrementa de manera reversible (Ackermann and Gannon 2007; Cozar-Castellano et al. 2006). En varios estudios en ratones se ha demostrado que la compensación de las células β durante el embarazo o en respuesta a la resistencia a la insulina, son predominantemente debido a la replicación y muy poco por neogénesis (Mezza and Kulkarni 2014).

A pesar de que la replicación parece ser el método dominante por el cual el compartimento endocrino del páncreas mantiene o recupera su masa, en circunstancias extremas el páncreas puede aprovechar la plasticidad de las células como un medio de recuperación (Stanger and Hebrok 2013). Se han descrito diferentes mecanismos que controlan la diferenciación de las células progenitoras endocrinas durante el desarrollo embrionario en el páncreas (Jensen 2004). Sin embargo, el conocimiento sobre la existencia de precursores y la generación de células de los islotes de páncreas posnatales depende simplemente de datos descriptivos y pruebas indirectas (Mezza and Kulkarni 2014). A continuación se describen la proliferación celular, la neogénesis y la transdiferenciación que son las formas a partir de las cuales se puede dar origen a la célula β , en la figura 3 se presenta un esquema general de estos procesos.

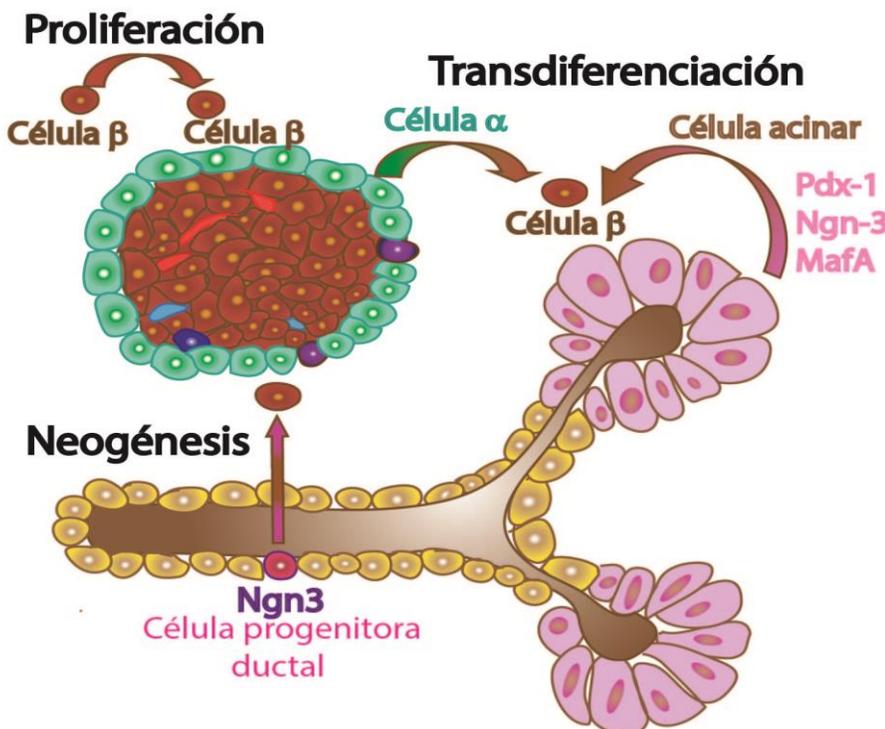


Figura 3. Plasticidad celular en el páncreas adulto. Las células β sirven como progenitoras para formar nuevas células mediante proliferación. Posterior a la ligadura del conducto pancreático, así como en estudios *in vitro* se ha demostrado que los conductos empiezan a expresar Ngn3 y estas células podrían dar lugar a la formación de nuevas células β (neogénesis). La expresión viral de Pdx-1, Ngn-3, y MafA en células adultas acinares promueven la reprogramación hacia células β . Las células α pueden transdiferenciar a células β después de la depleción de estas últimas.

1.3.1. Proliferación celular

El ciclo celular es una secuencia ordenada de eventos que conducen a la proliferación y la división celular en la que una célula da lugar a dos células hijas. Las células β siguen las distintas etapas del ciclo celular, el cual comprende: la interfase y la división celular o mitosis (M); en la interfase se distinguen tres fases: crecimiento celular 1 (G1), síntesis (S) y crecimiento celular 2 (G2). Mediante ensayos de proliferación con timidina tritiada de islotes en cultivo sincronizados con hidroxiaurea, se llegó a la conclusión que el ciclo celular en las células β era de 14.9 h (2.5 h de la fase G1, 6.4 h en la fase S, 5.5 h en G2 y 0.5 h en la fase M) (Hellerström and Swenne 1991).

La proliferación celular se presenta a altas tasas durante la embriogénesis (aproximadamente el 10% por día en ratones), pero esta empieza a declinar posnatalmente (Ackermann and Gannon 2007). Durante la edad adulta, las células β proliferan a una tasa muy baja. Se ha propuesto que aproximadamente del 1-4% de las células β replican por día en las ratas entre 30 y 100 días de edad (Scaglia et al. 1997), mientras que <1% de las células β replican por día en ratones de un año de edad. En el caso de los humanos, los datos son limitados pero se ha reportado que en adultos solo el 0.04% de las células β proliferan (Alexandra E. Butler et al. 2003).

A pesar de que son muy pocas las células que replican durante la edad adulta, se propuso que existe un reservorio de células en fase G₀ (estado quiescente o de reposo) susceptibles de entrar en el ciclo celular si son requeridas, indicando que la mayoría de células β no están en un estado G₀ irreversible. Estas tasas de replicación basal bajas pueden ser estimuladas tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo desde hace tiempo se conoce que la glucosa puede estimular la proliferación de las células de los islotes *in vitro* (Rane and Reddy 2000).

Por otro lado, en la etapa fetal inicial la célula β exhibe una respuesta replicativa baja a la glucosa, mientras que en fase tardía de la etapa fetal, la glucosa es un estímulo muy potente para la replicación de la célula β (Rane and Reddy 2000).

El mecanismo por el cual las células β son reclutadas para entrar en el ciclo celular durante el desarrollo embrionario frente a las etapas postnatales y adultas es actualmente desconocido. Sin embargo, la evidencia de varios modelos genéticos en ratón indica que los factores que regulan la proliferación de células β durante la embriogénesis pueden diferir de las que regulan la proliferación de células β después del nacimiento (Ackermann and Gannon 2007).

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular llevan un orden y supervisión estrictos. Señales provenientes del exterior y algunos controladores dentro de la célula, se encargan de dirigir el progreso de ésta a través de las distintas fases del ciclo celular. Por lo tanto, se habla de que hay una regulación intracelular y una regulación extracelular (Vidales 2001).

A continuación, se describe lo que se conoce hasta el momento sobre estos dos tipos de regulación en la célula β . Cabe mencionar que el estudio de la replicación y control de las células β es menos conocido en comparación a otros tipos celulares (Cozar-Castellano et al. 2006).

1.3.1 (a) Regulación intracelular del ciclo celular

El control interno del ciclo celular está a cargo de proteínas cuyas acciones podrían resumirse en cascadas de activaciones e inhibiciones de otras proteínas, que son indispensables durante las fases del ciclo.

La fase G1 prepara la célula para la síntesis de DNA y la ejecución de otros pasos en el ciclo celular. Es aquí donde la célula se compromete o se detiene hacia la entrada en el ciclo de división celular. Por lo tanto, es en G1 que se produce gran parte del crecimiento de las células debido al aumento del tamaño de los orgánulos celulares. La ejecución del ciclo celular requiere una cantidad significativa de energía. Por lo que ocurre cuando hay nutrientes disponibles en su entorno y almacenes celulares (Lewis 2010).

Al final de la fase G1 se encuentra un punto de restricción, se conoce así puesto que si la célula lo pasa se encuentra “comprometida” irreversiblemente a entrar al ciclo celular, independientemente de lo que suceda en el exterior. En la célula β el responsable intracelular del paso a través de este punto, es el complejo Cdk4–ciclina D, que “libera” al factor de transcripción E2F del complejo Rb/DP (Proteína del retinoblastoma/Factor de transcripción DP).

El complejo Cdk4-ciclina D fosforila a Rb para liberar a E2F. La fosforilación de la proteína Rb por el complejo Cdk4-ciclina D, permite la liberación del factor de transcripción E2F del complejo Rb-DP-E2F. Rb es considerado como el principal represor de la progresión del ciclo celular en la célula β (Figura 4) (Vidales 2001). La eliminación de Cdk4 en ratones se caracteriza por una hipoplasia en las células β , que resulta en hiperglucemia y diabetes (Cozar-Castellano et al. 2004).

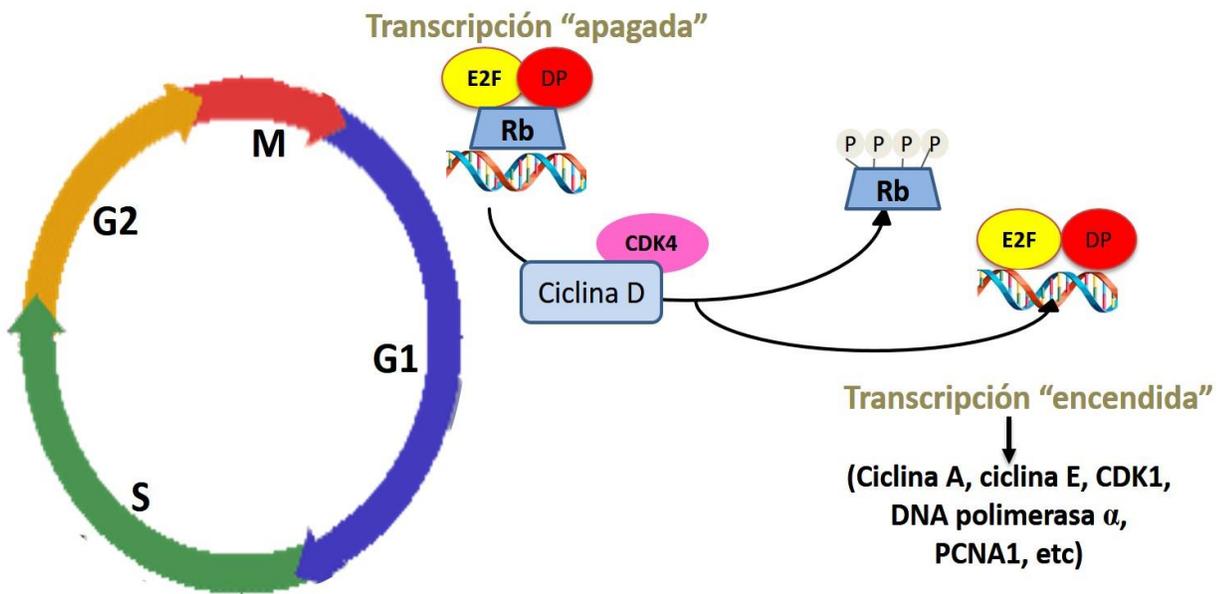


Figura 4. Regulación del ciclo celular en la célula β en la fase G1. Durante la fase G0, Rb se une al complejo E2F/DP y lo inhibe. La estimulación de las células con mitógenos induce la expresión de Cdk4 y ciclina D. Los complejos resultantes Cdk4-ciclina D fosforilan Rb, liberando al complejo E2F/DP.

E2F es una familia de proteínas de siete miembros, en general, E2F1, -2, y -3 activan un amplio espectro de genes que conducen a la progresión del ciclo celular; mientras que E2F4, -5, y -6 son considerados represores transcripcionales, y suprimen la progresión del ciclo celular (Yesil and Lammert 2008). E2F1 es muy importante en el control de la proliferación y función de la célula β . En ratones E2F1^{-/-} la masa de las células β disminuye debido a que la proliferación se suprime, además los ratones presentan una secreción de insulina deficiente, lo que promueve intolerancia a glucosa (Fajas et al. 2004).

Una vez que E2F se activa, estimula la síntesis de Cdk2 y ciclina E (necesarios para el progreso de G1 a S), de otras proteínas necesarias para la síntesis de DNA y del mismo E2F, inactivando aún más a Rb. La inactivación de Rb es mantenida a lo largo del ciclo por la concentración elevada de distintos complejos Cdk-ciclina pero una vez que las ciclinas se degradan, el Rb es de nuevo activo, y se une a E2F (Vidales 2001).

Otros participantes importantes en el complejo sistema de regulación del ciclo celular son los inhibidores de Cdk; que incluyen los inhibidores de cinasas (INK) y las proteínas inhibidoras de ciclina (CIP). Estas moléculas regulan negativamente la progresión del ciclo celular (Yesil and Lammert 2008). Los cuatro miembros de la familia INK (p15ink4b, p16ink4a, p18ink4c, p19ink4d) y tres miembros de la familia CIP (p21cip1, p27kip1, p57kip2) se expresan en islotes de ratón (Cozar-Castellano, Haught, and Stewart 2006; Yesil and Lammert 2008).

Un estudio realizado por Krishnamurthy y colaboradores demostró que p16ink4a tiene un papel muy importante inhibiendo la proliferación de las células del islote, de una manera dependiente de la edad. La expresión de esta molécula se encontró incrementada en islotes de animales en estado de senescencia (Krishnamurthy et al. 2004) mientras que la deficiencia de p16ink4a en estos ratones aumentó la proliferación (Krishnamurthy et al. 2006).

En lo que respecta a los miembros de la familia CIP, estudios *in vitro* en los que los islotes de ratones p21cip1^{-/-} fueron tratados con mitógenos, se encontró una alta síntesis de DNA al ser comparados con aquellos islotes de ratones que expresaban p21cip1. Sin embargo, estudios *in vivo*, llevados a cabo por el mismo grupo de investigación demostraron que ni la función de la célula β , ni la proliferación, se vieron afectadas por la ausencia de p21. Lo que sugiere que p21cip1 no actúa de manera solitaria para detener el ciclo celular, o que no es crucial para la regulación de la progresión del ciclo celular (Cozar-Castellano, Haught, and Stewart 2006).

p27kip1 es también importante para la regulación del ciclo de la célula β durante el desarrollo. Se ha sugerido que esta molécula tiene un papel crítico en determinar si la célula permanece quiescente o si se dividirá (Rachdi et al. 2006).

Un análisis reciente de los componentes del ciclo celular de las fases G1/S en células β de humanos reveló que, aunque todos los componentes cruciales del ciclo celular están presentes, por lo general se encuentran en el citoplasma y no el núcleo celular, lo que es probable que contribuya a la naturaleza refractaria de las células β a proliferar (Fiaschi-Taesch et al. 2013).

1.3.1 (b) Regulación extracelular del ciclo celular

Existen factores de crecimiento o nutrientes que son capaces de conducir a la proliferación de las células β de roedor, a través de vías de señalización que convergen en las moléculas que controlan las fases G1/S (Kulkarni et al. 2012).

Los mecanismos responsables de la regulación de la proliferación de las células β y su señalización río abajo, están vinculados a la maquinaria del ciclo celular y han sido durante mucho tiempo un foco de investigación intensa (Yesil and Lammert 2008).

En las células β , la proliferación celular se basa en varias formas de la transducción de señales al núcleo a partir de la unión de un ligando a su receptor correspondiente. A continuación se describen brevemente algunos de los principales factores implicados en la regulación de la proliferación de las células β de acuerdo al tipo de receptores.

➤ Factores que actúan a través del receptor cinasa de tirosina (RTKs)

Los factores que actúan a través de RTKs incluyen insulina, factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2 (IGF-1y IGF-2), factor de crecimiento epidérmico (EGF, *por sus siglas en inglés*), el factor de crecimiento hepático (HGF, *por sus siglas en inglés*) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *por sus siglas en inglés*). La insulina por sí misma es un factor de crecimiento crucial que aumenta la proliferación de la célula β . Tras unirse al su receptor, la insulina promueve la activación de las vías de señalización de PI3K y ERK1/2. Estas moléculas de señalización a su vez activan AKT (Yesil and Lammert 2008).

AKT regula la proliferación por modulación de múltiples blancos río abajo, incluidos la cinasa de glucógeno sintasa 3 (GSK3), FOXO1, p27kip1, proteínas esclerosis tuberosa (TSC)/ blanco de rampamicina en mamíferos (mTOR), entre otros (Kulkarni et al. 2012). También se demostró que AKT1 sobre regula las ciclinas D1 y D2, así como los niveles de p21cip1 y Cdk4 (Fatrai et al. 2006).

De forma similar a la insulina, IGF-1 actúa a través de la vía PI3K-PKB/AKT reprimiendo la actividad transcripcional de FOXO 1 y aumentando la proliferación celular (Kulkarni 2005). Contrario a lo que se pensaba, recientemente se ha demostrado que las vías de señalización de Insulina/IGF no son críticas para el desarrollo temprano de las células β , sin embargo la pérdida de función de estas hormonas en las células β adultas puede llevar al desarrollo de diabetes (Ueki et al. 2006).

Una serie de estudios han mostrado que EGF es importante para la expansión de la masa de las células β . Además la señalización a través su receptor (EGFR) es crucial para el desarrollo posnatal de la célula β (Miettinen et al. 2006).

Del mismo modo, se ha demostrado que HGF activa las vías de señalización MAPK y PI3K-PKB/AKT. La sobreexpresión de HGF en células β de ratones incrementa la proliferación. Sin embargo, cuando el receptor de HGF fue delectado en islotes de ratones, se demostró que la señalización a través de este receptor es esencial para la secreción de insulina pero no para el crecimiento de las células β (Cozar-Castellano et al. 2006)(Roccisana et al. 2005).

➤ Factores que actúan a través de unión a receptores JAK

La hormona de crecimiento, la prolactina y el lactógeno placentario son tres mitógenos esenciales en la célula β . Se ha sugerido que los tres actúan a través de la vía JAK/STAT, en particular JAK2/STAT5, incluida la sobreexpresión de la ciclina D2. Durante el embarazo la prolactina y el lactógeno placentario aumentan la proliferación de la célula β ante el incremento en una demanda metabólica en el organismo. Las tres hormonas llevan al incremento de la síntesis de DNA en el islote pancreático (Yesil and Lammert 2008).

➤ Factores que actúan a través de los receptores acoplados a proteínas G

Entre los factores más estudiados que incrementan la proliferación se encuentran moléculas que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), como la gastrina y las incretinas (Yesil and Lammert 2008).

La gastrina es una hormona secretada por las células G del estómago y sus niveles plasmáticos aumentan tras la absorción de los alimentos. Se ha propuesto que la gastrina en combinación con TGF- α (Factor de crecimiento tumoral α), participan en el crecimiento de los islotes y en la

neogénesis de células β (T. C. Wang et al. 1993). También se ha mostrado que la manipulación de EGF y gastrina llevan a la regeneración del islote incrementando la masa de las células β y la neogénesis (Suarez-Pinzon et al. 2005). Por lo cual hay un creciente interés sobre el modo de acción de la gastrina en combinación con otros factores que aumentan la proliferación (Yesil and Lammert 2008)

Las incretinas son hormonas intestinales liberadas en respuesta a la ingesta de alimentos y aumentan la secreción de insulina. Entre estas se encuentran el péptido parecido al glucagon tipo 1 (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). El GLP-1 no sólo induce la proliferación en células β en páncreas de roedores (Perfetti et al. 2000), sino que también tiene una participación importante en la diferenciación de células ductales a células de fenotipo similar a células β (Bulotta et al. 2002). La adición de GLP-1 a cultivos de células pancreáticas ductales induce la expresión de GLUT-2, insulina y glucocinasa en estas células. Además, la señalización a través del receptor de GLP1 disminuye la apoptosis en la célula β (Farilla et al. 2003). GIP también es crucial para la función y la proliferación de las células β . La exposición de células INS 1 a GIP y glucosa, aumenta la tasa de proliferación en estas (Trumper et al. 2016).

➤ Factores que actúan a través de otras vías de señalización

Recientemente se han propuesto nuevos blancos para la regulación de la expresión de genes, entre estos se encuentran los microRNAs (miRNAs), que han sido propuestos para contribuir a los cambios en la masa de las células β .

En las células β los microRNAs regulan la expresión de genes que son importantes para la secreción de insulina y la supervivencia de las células β . Durante el embarazo los niveles de expresión de miR-338-3p son regulados a la baja por 17- β estradiol, tanto en islotes de ratas como de humanos. La reducción de miR-338-3p fue asociada con un incremento en la proliferación de las células β . A pesar de que los blancos directos de miR-338-3p aún no han sido identificados, lo anterior amplía las evidencias del papel de los miRNAs en la proliferación de la célula β (Jacovetti et al. 2012).

Una línea similar de investigación identificó a miR-7a como importante para el control de la proliferación de las células β en los islotes de ratón y humanos. El bloqueo específico de miR-7a resultó en la activación de la vía de señalización mTOR en las células aisladas de islotes de ratón, con el consiguiente aumento de 2,9 veces en la proliferación de células β . Se observaron resultados similares utilizando células aisladas de islotes humanos, un aumento de 30 veces en el número de células β positivas a Ki67 en comparación con los controles después de la inhibición de miR-7a (Y. Wang et al. 2013).

Finalmente, el descubrimiento de la betatrofina, una hormona secretada por el hígado en respuesta a la resistencia a insulina, se demostró que este factor puede incrementar la proliferación en células β de ratones de 10 a 20 veces sobre sus niveles basales (Yi, Park, and Melton 2013). Sin embargo las células β humanas son totalmente insensibles a la betatrofina (Jiao et al. 2014).

1.3.2 Neogénesis

La neogénesis se refiere a la formación de nuevas células β a partir de precursores no endocrinos; el proceso requiere la proliferación de estos precursores y una posterior diferenciación de estos hacia células β funcionales. La importancia de la neogénesis en la homeostasis de la masa de células β en el adulto no es clara, hasta la actualidad sigue siendo un tema muy controvertido en la comunidad científica (Albert and Gasa 2008). Aún faltan pruebas sólidas para respaldar la existencia de una población de células madre/progenitoras indiferenciadas que puedan dar origen a todas las células pancreáticas en páncreas adulto (Mezza and Kulkarni 2014). Sin embargo, se ha propuesto que bajo ciertas condiciones las células β se pueden originar a partir de células de los ductos, de las acinares o de las células α .

➤ Neogénesis de células β a partir de células de los conductos

Las células ductales en adultos comparten algunas similitudes con conductos primitivos embrionarios, y se ha sugerido que pueden conservar la capacidad para generar células endocrinas en el adulto. El análisis morfológico del páncreas después de varias manipulaciones, así como la diferenciación de células ductales pancreáticas *in vitro*, sugieren que los "progenitores" pancreáticos residen en los conductos (Mezza and Kulkarni 2014).

Se ha demostrado que los cultivos de conductos epiteliales aislados de rata adulta con mesénquima fetal pueden dar origen a células que expresan insulina, también pueden ser generadas células secretoras de insulina *in vitro* a partir de preparaciones enriquecidas de conductos de páncreas normales humanos o de ratones diabéticos no obesos (Bonner-Weir and Sharma 2002). Heremans y colaboradores mostraron que células humanas pueden también iniciar la diferenciación endocrina *in vitro* tras la expresión de factores de transcripción específicos (Heremans et al. 2002).

La ligadura del conducto pancreático en ratas, causa una respuesta celular similar a una pancreatitis aguda. Posterior a la ligadura de los conductos, el páncreas de la rata presenta una hiperplasia de células positivas a insulina (Xu et al. 2008). El aumento en el número de células de los conductos y la baja proliferación de células β preexistentes condujeron a la hipótesis de que las células β formadas podrían tener un origen ductal. Guiados por la expresión de neurogenina 3 (Ngn3⁺) se demostró que los progenitores de células β pueden ser activados tras un daño en el páncreas de ratón adulto y que estos progenitores se encuentran en el revestimiento ductal. Además estas células Ngn3⁺ del conducto fueron capaces de dar lugar a todos los subtipos de células endocrinas (Xu et al. 2008).

Sin embargo, algunos otros hallazgos recientes indican que las células de los conductos no son los progenitores de las células endocrinas; Kopp y colaboradores mostraron que aunque la ligadura del conducto pancreático induce la expresión de Ngn3, estas células no completan el proceso de diferenciación endocrina debido a la ausencia de factores de transcripción como Nkx6.1 y Pax6 (Kopp et al. 2011). Aunque estos datos no apoyan el concepto de que las células de los conductos adultos pueden dar lugar a células maduras endocrinas; los actuales marcadores de linaje no permiten que todas las células de los conductos sean marcadas. Por lo cual, se necesitan más estudios para determinar si existen subpoblaciones de células de los conductos que aún posean la capacidad de diferenciarse en células endocrinas (Stanger and Hebrok 2013).

➤ Neogénesis de las células β a partir de células α

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que en presencia de adecuados factores/señales se puede promover la neogénesis de las células β a partir de células α (este cambio de linaje en las células también se conoce como transdiferenciación) (Mezza and Kulkarni 2014). La noción de que las células α representan una fuente de nuevas células β *in vivo* se apoya en los datos de Collombat y colaboradores, quienes demostraron que en ratones, la expresión ectópica de Pax4 convierte a las células progenitoras en células productoras de insulina parecidas a las células β (Patrick Collombat et al. 2009).

Thorel y colaboradores mostraron la contribución de las células α en los procesos de regeneración de las células β . Después de una pérdida del 99% de células β , se encontraron unas células que pasaron por un estado bihormonal, tales células expresaban tanto la insulina como glucagon, y posteriormente adquirieron la identidad únicamente de células productoras de insulina (Thorel et al. 2010). Otro estudio reciente reportó que la ablación del gen *Arx* en las células α neonatales de ratón resulta en la pérdida de la expresión de glucagon y esta población celular tiende a adoptar las características de las células β productoras de insulina. Sorprendentemente, la ablación de *Arx* en ratones adultos no resultó en la transdiferenciación de células α a células β (Wilcox et al. 2013).

➤ Neogénesis de células β a partir de las células acinares

Las células acinares son el tipo celular más abundante en el páncreas y por esta razón, estas células se consideran como un suministro potencial para la generación de células β (Ben-Othman et al. 2013). Zhou y colaboradores mostraron que al forzar la expresión de Ngn3 (para adquirir una identidad endocrina general), Pdx1 (para establecer características de célula β) y la proteína MafA (para aumentar la función de Pdx1 y lograr la maduración y funcionalidad de las células β) en células acinares diferenciadas de ratón adulto *in vivo*, estas se reprogramaron hacia células β productoras de insulina (Zhou et al. 2008).

1.3.3 Apoptosis

Por definición, apoptosis es la muerte celular por un proceso activo, controlado genéticamente, que elimina las células no necesarias o dañadas. Se origina por lesión o modificación del DNA nuclear, la cual lleva a cambios en la estructura que conducen a la fragmentación celular sin respuesta inflamatoria. Este es un proceso celular esencial, e interviene en varias funciones vitales (Repetto Jiménez and Repetto Kuhn 2009).

Se ha reportado una ola transitoria de apoptosis en las células β de ratas neonatales, entre la segunda y tercera semana de edad (Scaglia et al. 1997). Esto también se ha descrito en el páncreas fetal humano en el tercer trimestre de edad (Kassem et al. 2000). De manera interesante, este evento apoptótico coincide con un decremento significativo en la expresión de IGF-2 en tejidos de páncreas de ratas de dos semanas de edad (Petrik et al. 1998). La sobreexpresión de IGF-2 en ratones transgénicos resulta en una disminución significativa de la apoptosis en las células β , además de un marcado aumento de tamaño, sugiriendo que IGF-II es un factor de crecimiento que protege a las células β de apoptosis (Petrik et al. 1999).

En adultos la masa de las células β es linealmente proporcional a la masa corporal, y se encuentra bajo estrecho control homeostático de las demandas de secreción de insulina. En general, durante la edad adulta en ratas en condiciones normales las tasas de apoptosis son muy bajas entre el 0.02% y el 0.2% (Montanya, Nacher, and Soler 2000). Sin embargo, en algunas condiciones específicas durante la edad adulta, por ejemplo el embarazo, la masa de las células β en roedores aumenta de 2 a 5 veces, seguido de una rápida y eficiente involución de la masa de las células β en el posparto debido a un significativo incremento en la apoptosis (A E Butler et al. 2010).

Por otro lado, en el humano la pérdida funcional de la masa de células β es central en la etiología de la diabetes tipo 1 y tipo 2. La diabetes tipo 1 es causada por un ataque autoinmune contra las células β , induciendo la muerte celular progresiva; mientras que la patogénesis de la diabetes tipo 2 es más variable, y comprende diferentes grados de fracaso de las células β en relación con diversos grados de resistencia a la insulina. Sin embargo, a pesar de las diferencias entre estos dos subtipos de la enfermedad, la apoptosis es un final común en ambas (Cnop et al. 2005; Thomas et al. 2009).

2. DESARROLLO Y MADURACIÓN DE CÉLULA β

2.1 Desarrollo embrionario del páncreas

En los ratones, el páncreas se hace morfológicamente evidente alrededor de los días embrionarios 9 al 9.5 (e9-e9.5), con la aparición de dos evaginaciones o yemas epiteliales en los lados opuestos del endodermo del intestino primitivo que dará lugar al duodeno. El desarrollo de estas dos evaginaciones pancreáticas es temporalmente distinto, la yema dorsal se observa primero en e9.0, mientras que su contraparte ventral emerge en e9.5. Tal divergencia se debe a diferentes señales procedentes de los tejidos vecinos derivados del mesodermo; ya que la yema dorsal está rodeada por la notocorda y la aorta dorsal, mientras que la yema ventral está en contacto con el mesénquima cardíaco (Ben-Othman et al. 2013) (Figura 5.A).

La morfogénesis posterior del páncreas se puede subdividir en dos oleadas superpuestas de desarrollo: la transición primaria y la secundaria. La transición primaria (e9.5-e12.5) corresponde a un período de proliferación de células progenitoras pancreáticas, lo cual conduce a un aumento rápido en el tamaño de las yemas pancreáticas, que también cambian su forma y comienzan a formar estructuras tubulares ramificadas en un proceso conocido como la morfogénesis de ramificación (Shih, Wang, and Sander 2013) (Figura 5.B).

Una vez que el dominio pre pancreático dorsal y el ventral se han formado, una serie de factores de transcripción se expresan específicamente en estas regiones; entre ellos se encuentran Pdx1, Ptf1a, y Sox9. La rotación intestinal alrededor del e11.5 permite que los dos brotes se aproximen para su futura fusión alrededor de e17 y e18.

Durante la transición secundaria a partir de e12.5 hasta el nacimiento, el epitelio del páncreas continúa expandiéndose y se ramifica en una red tubular compleja pero altamente ordenada. En esta etapa también se presenta la compartimentalización del epitelio en dos dominios: “punta” y “tronco”. El dominio punta contiene principalmente progenitores acinares, mientras que el dominio tronco se compone de precursores bipotenciales para el tejido que formará los conductos y el endocrino (Ben-Othman et al. 2013). Los factores de transcripción Nkx6.1/6.2 y Ptf1a actúan como reguladores maestros durante este proceso. Nkx6.1/6.2 promueve la identidad del dominio tronco y Ptf1a tiene una función equivalente en el dominio punta; este proceso es iniciado por una represión mutua entre Nkx6.1/6.2 y Ptf1a (Schaffer et al. 2010).

Las células del tronco sufren una serie de cambios morfogénéticos extensivos, formando una red en 3D de túbulos revestidos por una capa de células epiteliales polarizadas. Esta red de túbulos es conocida como conductos primitivos o cordones progenitores, mientras que el epitelio que los reviste da origen a todas las células endocrinas.

Durante la transición secundaria, un subconjunto de células en los conductos primitivos inicia la expresión del factor de transcripción Ngn3 que marca el inicio de la diferenciación endocrina. Las células epiteliales del tronco que no activan Ngn3 eventualmente contribuyen al árbol ductal (Figura 5.C). Por lo tanto, el control preciso de la inducción de Ngn3 es el factor clave para el equilibrio del destino celular endocrino frente al ductal.

Una vez que las células expresan Ngn3, los progenitores salen del ciclo celular y son capaces de generar los 5 distintos tipos celulares endocrinos (Figura 5.C). Johansson y colaboradores demostraron que la competencia de los precursores endocrinos para producir los diferentes tipos celulares es temporalmente controlada. Cuando se indujo la expresión Ngn3 en diferentes puntos de tiempo de desarrollo, a través de un transgén condicionado de Ngn3; demostraron que si la Ngn3 se sobre expresaba temprano las células progenitoras se volvieron α , cuando se sobre expresaba en días intermedios del desarrollo, las células se diferenciaban en β y δ y cuando se hacía en etapas tardías, las células progenitoras diferenciaban a PP (Johansson et al. 2007). Sin embargo los mecanismos que controlan estos cambios son aún desconocidos. Estudios en el desarrollo de neuronas, músculo y pituitaria sugieren que la vía de señalización Notch podría estar involucrada (Shih, Wang, and Sander 2013)

Al igual que los mecanismos que regulan la segregación punta/tronco, la distinción entre los precursores de las células α y β depende de la represión mutua entre los determinantes de los linajes opuestos. Los factores de transcripción Pax4, Pdx1, y Nkx6.1 actúan como determinantes clave para la formación de la célula β (Patrick Collombat et al. 2003; Gannon et al. 2008; Henseleit et al. 2005) mientras Arx determina la identidad de la célula α (P Collombat et al. 2006; Patrick Collombat et al. 2003). La expresión forzada de Pax4, Pdx1 o Nkx6.1 en los precursores endocrinos favorece el destino de las células β a expensas de las células α (Patrick Collombat et al. 2009; Schaffer et al. 2013; Yang et al. 2011).

A partir del día e16 se ha reportado que una rápida expansión de la masa de células β , con aproximadamente el doble de la población por día. En las ratas fetales, la actividad mitótica está restringida a un número limitado de células β (aproximadamente el 10 %) que entran al ciclo celular. Por lo tanto, se ha atribuido el 80 % o más de la masa restante al proceso de neogénesis de células precursoras indiferenciadas (Hellerström and Swenne 1991). Al final de la transición secundaria, el páncreas ha adquirido en gran medida la organización topológica del órgano maduro, con grupos de células acinares unidas en torno a los extremos de la red de conductos y los agregados de células endocrinas dispersos por todo el órgano (Shih, Wang, and Sander 2013).

Desde un punto de vista molecular, la expansión y diferenciación de los precursores endodérmicos hacia los distintos linajes pancreáticos, son el resultado de una secuencia altamente regulada de señales extracelulares y de cambios en la regulación de expresión génica. Dichos cambios son dirigidos por una cascada de factores de transcripción cuyas activaciones-inactivaciones coordinadas permiten la progresión del precursor pluripotente a la célula pancreática diferenciada. La identificación de estos factores y de las relaciones de epistasia existentes entre ellos son indispensables para llegar a comprender los procesos que culminan en la formación de las células del islote (Albert and Gasa 2008).

En las últimas dos décadas, se ha hecho un progreso significativo en descifrar los mecanismos moleculares fundamentales que subyacen en las múltiples decisiones del linaje que conducen a la formación de los distintos tipos de células pancreáticas. En comparación, se sabe mucho menos acerca de la regulación de la morfogénesis del páncreas y si existe una conexión entre los eventos morfogenéticos y la diferenciación celular (Shih, Wang, and Sander 2013).

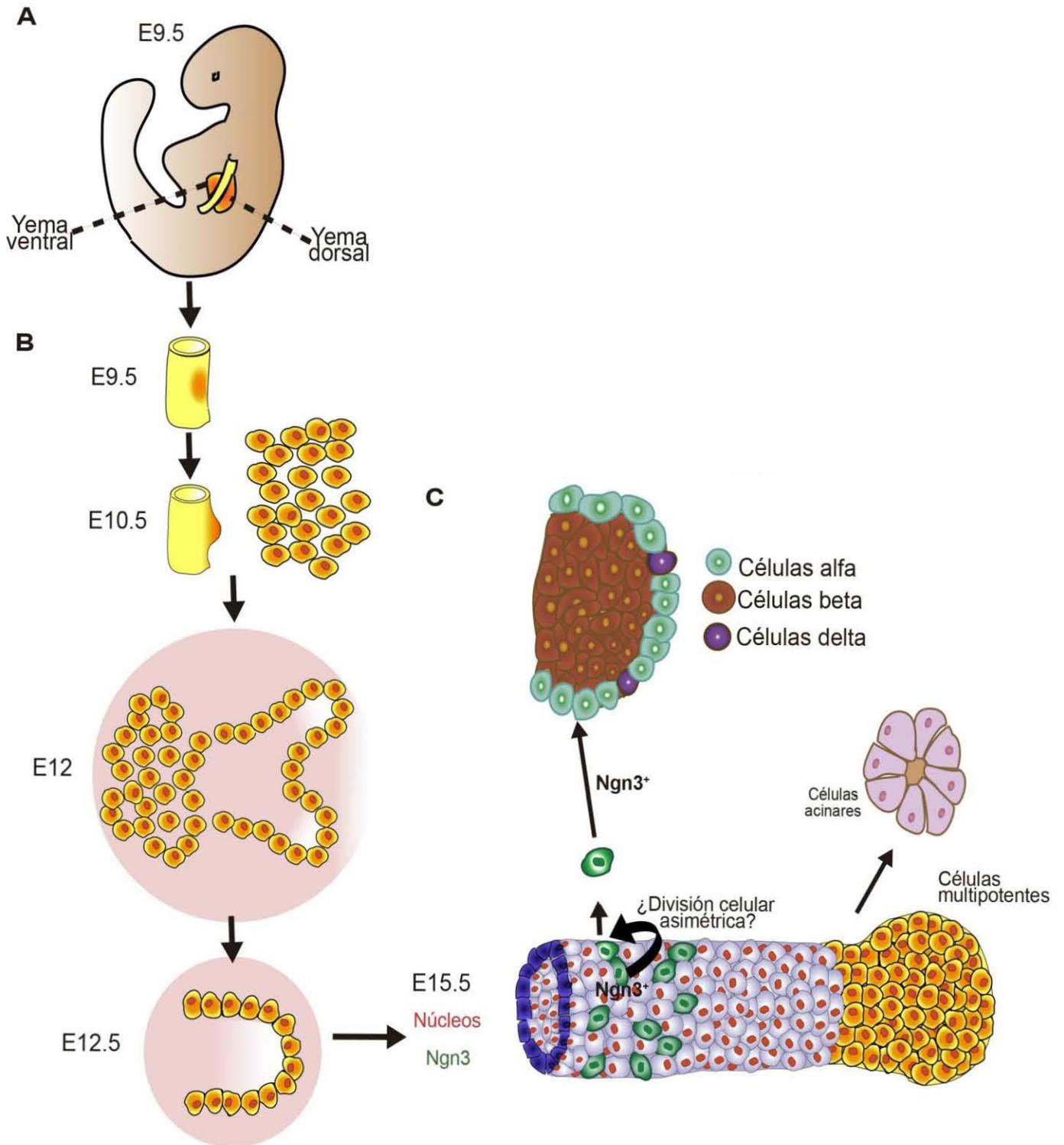


Figura 5. Desarrollo embrionario del páncreas de rata y maduración de las células beta. **A)** Anatomía del páncreas embrionario de rata. **B)** Descripción del proceso de elongación y ramificación de las yemas pancreáticas (Transición primaria). **C)** Aparición y delaminación de células progenitoras endócrinas (Ngn3⁺) en los conductos y su posterior diferenciación hacia células insulares (Transición secundaria).

2.2 Periodo neonatal y lactancia

La maduración funcional de los islotes procede después del nacimiento, durante el desarrollo postnatal temprano. En las ratas, este periodo corresponde al primer mes de vida; en el cual estos animales son expuestos a cambios críticos que inician con el nacimiento, seguido por el periodo de lactancia y finalmente el destete alrededor del día 20 posnatal (día P20) (Figura 6) (Aguayo-Mazzucato et al. 2006).

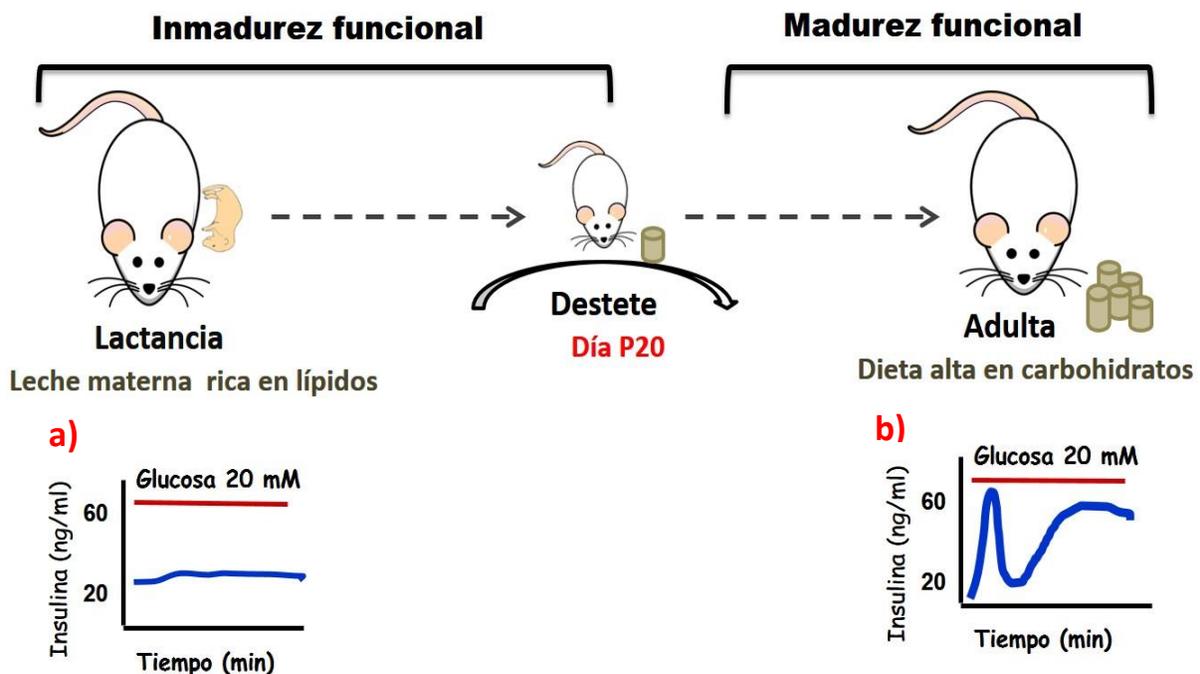


Figura 6. Madurez e inmadurez funcional en células β . Las células β de ratas neonatales son insensibles ante un estímulo de glucosa, ya que no secretan insulina (inmadurez funcional). Cerca del día P20 las ratas son destetadas y cursan con un estado fisiológico de hiperglucemia e hiperinsulinemia, el cual se normalizan alrededor del día P28, a partir del cual las células β presentan una secreción bifásica de insulina ante un estímulo con glucosa (madurez funcional). **(a)** Se representa una gráfica de secreción de insulina con respecto al tiempo; las células β de los neonatos no secretan insulina después de un estímulo con glucosa (20mM). Sin embargo, las células β de ratas adultas **(b)** presentan una respuesta bifásica. *La Imagen se basa en trabajos de (Aguayo-Mazzucato et al. 2006).*

Al nacer, los animales necesitan controlar la homeostasis de la glucosa en respuesta a los alimentos, y esto podría ser una fuerza impulsora para que las células maduren (Navarro-

Tableros et al. 2007). Sin embargo, este cambio es lento y los recién nacidos no secretan insulina en respuesta a un estímulo con glucosa, a pesar de que los niveles de insulina plasmática son incrementados por la administración de aminoácidos (Milner 1980). Además, las células β neonatales muestran una marcada hiperactividad bajo condiciones basales de nutrientes, a diferencia de las células β adultas maduras. Esta inmadurez funcional de las células β se ha vinculado a una amplia variedad de mecanismos bioquímicos y moleculares, algunos de los más importantes se describen a continuación y se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Diferencias bioquímicas en células β neonatales, al ser comparadas con las adultas.

GEN/PROTEÍNA	FUNCIÓN	EXPRESIÓN EN RATAS NEONATALES
GLUT 2	Transporta glucosa al interior de la célula	Se expresan pocos transportadores en la membrana plasmática y la mayoría se encuentra en el citoplasma.
Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPDH)	Cataliza la oxidación de glicerol 3-fosfato a dihidroxicetona fosfato, produciendo NADH a partir de NAD ⁺	Menor actividad y concentración
Malato deshidrogenasa mitoncrial (mMDH)	Cataliza la oxidación de malato a oxaloacetato produciendo NADH a partir de NAD ⁺	Menor actividad y concentración
Piruvato carboxilasa	Enzima anaplerótica mitocondrial. Cataliza la conversión de piruvato en oxalacetato.	Expresión más baja
Carnitina palmitoil transferasa I (Cpt 1)	Enzima de membrana mitocondrial externa. Convierte la acil coA de cadena larga en acilcarnitina	Sobrerregulada
Carnitina palmitoil transferasa II (Cpt2)	Enzima de membrana mitocondrial interna. Convierte la acilcarnitina en acil coA	Expresión más baja
Canales K⁺ATP	Acoplamiento metabo-eléctrico	Insensibles a la estimulación con glucosa
Canales Ca²⁺	Incrementan la concentración intracelular de Ca ²⁺ , lo que desencadena exocitosis de insulina	Menos RNAm. Pocos canales en la membrana, la mayoría se encuentra en el citoplasma
Transportador lactato piruvato Slc16a1 (Mct1)	Cataliza el transporte a través de la membrana plasmática de monocarboxilatos como lactato y piruvato	Expresión aumentada en periodo neonatal. Se reprime en células β maduras.
Lactato deshidrogenasa (Ldha)	Cataliza la reacción de reducción de piruvato a lactato, oxidando NADH a NAD ⁺	Expresión aumentada en periodo neonatal. Se reprime en células β maduras.

Los transportadores GLUT 2 son los encargados de transportar la glucosa al interior de las células β . Nuestro grupo de investigación demostró que una de las razones por la que células β neonatales son relativamente insensibles a glucosa, es debido a que expresan pocos transportadores GLUT2 en la membrana plasmática, y a diferencia de las ratas adultas la mayoría de los GLUT2 se encuentra en el citoplasma; lo que consecuentemente reduce el transporte transmembranal de glucosa al interior de la célula (Navarro-Tableros et al. 2007).

Posterior al ingreso de glucosa a las células β , esta es fosforilada por la glucocinasa, enzima que cataliza el paso limitante de la glucólisis. Se ha reportado que la actividad de la glucocinasa es normal en las células β fetales (Tuch and Tu 1996). Sin embargo, realizando análisis a nivel de una sola célula usando autorradiografía, se demostró que la hiperactividad basal de las células neonatales es explicada por que una alta fracción de las células β , presenta activación biosintética a concentraciones de glucosa por debajo de la K_m de la glucocinasa (Martens et al. 2014).

También se han reportado niveles bajos de la mayoría de las enzimas glucolíticas y lanzaderas mitocondriales (Jermendy et al. 2011; Martens et al. 2014). Entre estas destacan la actividad de dos enzimas clave para el transporte de NADH, la glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPDH) y la malato deshidrogenasa mitocondrial (mMDH), las cuales se encontraron ocho y tres veces más bajas, respectivamente, en islotes de ratas fetales (20-21e) comparados con islotes adultos. Además, la transfección de islotes de ratas fetales con cDNA de mGPDH permitió que secretaran insulina en respuesta a glucosa. Por lo cual los autores de este trabajo sugieren que la inmadurez de las lanzaderas de NADH, es una de las razones que explican, en parte, la incapacidad de las células β de secretar insulina ante un estímulo con glucosa (Tan et al. 2002). Aunado a esto, un estudio comparativo de los perfiles de expresión génica de ratas neonatales muestra que estas dos enzimas presentan baja expresión comparadas con adultas; además de otras lanzaderas como: el transportador mitocondrial citrato/isocitrato *Slc25a1* (también conocido como MCT1) y enzima malica citosólica (*Me1*) (Jermendy et al. 2011).

Posteriormente, el piruvato formado de la glucólisis es transportado al interior de la mitocondria por la piruvato deshidrogenasa y entra al ciclo del ácido tricarboxílico, este parece ser normal en células β fetales, las cuales son capaces de incrementar su secreción de insulina al ser estimuladas con aminoácidos gluconeogénicos (Weinhaus et al. 1995).

Por otro lado, se ha reportado una reducción en la fosforilación oxidativa y la consecuente producción de ATP (Rorsman et al. 1989; Stolovich-Rain et al. 2015). Sin embargo, el siguiente paso en la secreción de insulina estimulada por glucosa, el cierre de los canales K_{ATP} se ha reportado normal en las células β neonatales (Rorsman et al. 1989).

Uno de los pasos finales en la secreción de insulina es la apertura de los canales de calcio, en las células neonatales la densidad de corriente de Ca^{2+} y la síntesis de mRNA para la subunidad α_1 formadora del poro de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje tipo L y T es más baja en células beta neonatas en comparación con las células β adultas. Además esta subunidad α_1 para los canales de calcio tipo L y T de las células β neonatales están mayormente expresadas en el citoplasma y menos en la membrana plasmática, mientras que en los adultos se encuentran preferentemente en la membrana plasmática (Navarro et al; 2007).

En la célula β la represión de la enzima lactato deshidrogenasa (Ldh) y del transportador de lactato piruvato Slc16a1 (también conocido como MCT1), genera la ausencia de glucólisis anaeróbica, lo cual asegura que la producción de piruvato y su posterior entrada en el ciclo de los ácidos carboxílicos sea directamente proporcional al aumento postprandial de la glucosa en sangre. Al realizar perfiles de expresión génica de islotes de ratas adultas y compararlos con otros tejidos, se encontró que estos genes se reprimen selectivamente en las células β maduras. Por lo cual, la aberración en el proceso de represión tal y como ocurre en las células β neonatales potencialmente resulta en la pérdida de la homeostasis de glucosa. Por lo que la represión de estos genes es crítica en el contexto de mantenimiento de la madurez funcional de las células β y se ha propuesto que estos genes son responsables de la inmadurez funcional en las células β (Dhawan et al. 2015; Pullen et al. 2010; Quintens et al. 2008).

Con respecto al metabolismo de los ácidos grasos, Jermendy y colaboradores reportaron que la sintasa de ácidos grasos se encontró sobre expresada en las células β neonatales la ser comparada con células β de ratas adultas. La carnitina palmitoil transferasa I (CPT1) que transfiere grupos acil grasos del citosol a la mitocondria para su oxidación, también estabs sobre expresada, mientras que la carnitina palmitoil traferasa II se encontró ocho veces más baja. Un inhibidor natural de CPT1 es el malonil coA derivado de glucosa, en consecuencia la oxidación de los ácidos grasos se suprime cuando la glucosa es abundante y se oxida dentro de la célula.

En las células β neonatales una posible consecuencia de la alta expresión de CPT1 es que la actividad enzimática no es inhibida por malonil-coA, lo que sugiere que los lípidos pueden ser desviados a beta oxidación y ser el combustible más importante en las células β fetales y neonatales a diferencia de las células adultas (Jermendy et al. 2011).

La coincidencia generalizada de una baja expresión de muchos de los genes clave en las células β neonatales y la falta de respuestas a glucosa, sugiere la existencia de un regulador crítico para la madurez funcional (Jermendy et al. 2011). Una amplia variedad de trabajos señalan al destete como este elemento clave.

2.3 Destete

El periodo de destete representa un cambio metabólico, de una dieta constante de leche rica en lípidos, a una dieta omnívora alta en hidratos de carbono. En esta etapa de desarrollo, usando como modelo ratas *Wistar*, se ha detectado un interesante estado fisiológico de hiperinsulinemia e hiperglucemia. El cual se estabiliza alrededor del día P28, donde la estructura y función del páncreas es similar a la observada en adultos (Aguayo-Mazzucato et al. 2006). Al parecer, este cambio en la dieta mejora la capacidad de las células β para secretar insulina en respuesta a glucosa.

Recientemente, Jacovetti y colaboradores encontraron que el destete prematuro (en el día P15) en ratas *Sprague Dawley* acelera la adquisición del fenotipo maduro, ya que al día P20 los roedores presentaron una secreción de insulina normal en respuesta a glucosa. Para evaluar si la adquisición de la secreción de insulina inducida por glucosa estaba afectada directamente por el cambio en la composición de la dieta, un grupo de ratas fue destetado en el día P15, pero se mantuvo con una dieta alta en grasa (con una composición similar a la leche) y se encontró que estos animales presentaron inmadurez funcional, la cual persistió al menos hasta el día P47. Si los animales eran destetados al día P20, pero se mantenían con una dieta alta en grasa presentaban inmadurez, sin embargo esta podía revertirse al cambiar a una dieta estándar (Jacovetti et al. 2015) (Figura 7).

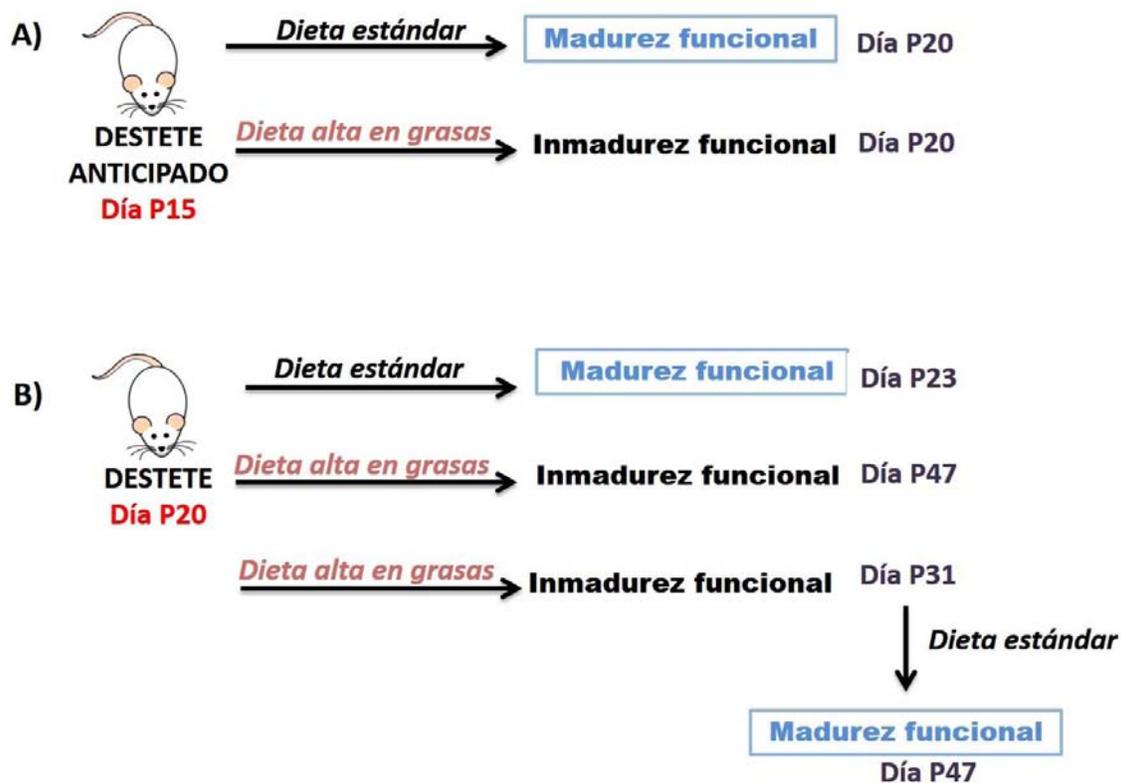


Figura 7. Efectos del destete anticipado y los cambios de dieta sobre la madurez funcional del páncreas de ratas.

- A) El destete anticipado en ratas (día P15), lleva a una maduración funcional temprana en el día P20.
- B) Al destetar las ratas y mantenerlas con una dieta alta en grasa, presentan inmadurez funcional, la cual se puede revertir al cambiar a una dieta estándar. *La imagen se basa en los trabajos de Stolovich-Rain et al. 2015 y Jacovetti et al. 2015.*

Stolovich-Rai y colaboradores, también determinaron que el proceso de destete, y en concreto la transición de la dieta de leche rica en grasas a una dieta estándar alta en carbohidratos, es la clave para la maduración de la secreción de insulina inducida por glucosa. Y que esta mejora durante el destete es debido a la reducción de la secreción de insulina basal en los niveles bajos de glucosa y al aumento en la secreción en niveles altos de glucosa (Stolovich-Rain et al. 2015).

Sin embargo, los mecanismos moleculares y factores que conducen la transición de las células β a la madurez funcional durante el período postnatal aún no están claros. No obstante, la expresión temporal de algunos factores de transcripción específicos se ha asociado con esta transición.

En ratones, el factor de transcripción MAFB se expresa en las células β sólo durante el período neonatal, mientras que MAFA, un factor de transcripción relacionado, está regulado positivamente en las células β maduras (Artner et al. 2007).

Otro factor de transcripción importante asociado con la maduración funcional de las células β es neuroD, su eliminación en células β adultas causa intolerancia a la glucosa y reversión a las características de una célula β inmadura como: incremento en la expresión de genes glucolíticos y lactato deshidrogenasa, elevada secreción de insulina y consumo de oxígeno en condiciones basales. Además de la sobreexpresión de neuropéptido Y, el cual inhibe la producción de adenilato ciclasa y AMPc que es requerido para la eficiente secreción de insulina en respuesta a glucosa (Gu et al. 2010).

Recientemente, Dhawan y colaboradores describieron que metilación del DNA tiene un papel esencial en el establecimiento de la maduración de la célula β pancreática; demostrando que la DNA metiltransferasa de (DNMT3A) reprime genes clave como la hexocinasa 1 y la lactato deshidrogenasa; estos genes son conocidos como genes desacoplantes de la secreción de insulina, y su represión es esencial para mantener un fenotipo maduro funcional en las células β (Dhawan et al. 2015).

Otras modificaciones importantes en el programa de expresión génica durante la maduración posnatal han sido reportadas por Jacovetti y colaboradores, ellos mostraron que la maduración de células β se asocia con cambios en la expresión de microRNA y que dichos cambios son inducidos por la transición nutricional que se produce en el destete (Jacovetti et al. 2015). Algunos otros trabajos muestran la participación de señales celulares como la hormona tiroidea en la maduración funcional de las células β (Aguayo-Mazzucato et al. 2013).

Yoshihara y colaboradores, reportaron que la maduración posnatal de las células β , es coordinada por el receptor de estrógeno tipo γ (ERR γ). El ERR γ dirige un programa de transcripción que promueve el metabolismo oxidativo mitocondrial lo que favorece la máxima secreción de insulina estimulada por glucosa. Además su expresión en células pluripotenciales diferenciadas a células β genera células β funcionales *in vitro* (Yoshihara et al. 2016).

Los cambios funcionales que se presentan durante el primer mes de vida son acompañados por una reorganización de la estructura del islote y el tamaño de los agregados de las células α y β . En esta etapa también se ha observado la formación de la vasculatura, la inervación de fibras simpáticas y la formación de la cápsula que rodea a los islotes, conformando la arquitectura de un islote maduro (Cabrera-Vásquez et al. 2009).

Un estudio realizado en ratas Sprague Dawley durante su primer mes de vida encontró una disminución en la replicación y un aumento en la incidencia de la apoptosis en las células β , sin embargo, la masa de las células β se mantuvo constante. Por lo cual los autores sugieren la presencia de una ola de neogénesis, la cual mantiene constante la masa de las células β durante este periodo. Y proponen la posible neogénesis a partir de los conductos, ya que al día P13 se encontraron células positivas a BrdU muy cercanas a pequeños conductos (Scaglia et al. 1997). Sin embargo, esto aún no ha sido demostrado.

II. ANTECEDENTES

Recientemente en nuestro laboratorio se compararon los niveles de expresión de 15 mil genes en células β inmaduras (día P20) y células β maduras (adultas), con el objetivo de determinar el contexto celular fisiológico y los cambios que podrían participar en el proceso de maduración posnatal. Se demostró que al día 20 se encuentran sobreexpresados genes relacionados con el ciclo celular y replicación del DNA, en comparación con las ratas adultas (Tabla 2) (Larqué et al. 2016).

Tabla 2. Lista de genes que contribuyen al enriquecimiento del grupo de genes “ciclo celular 69” de la base de datos Reactome.

SIMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	POSICIÓN EN LA LISTA DE GENES (RANK AT GENE LIST)	PUNTAJE SEGÚN EL RANGO (RANK METRIC SCORE)	PUNTAJE DE ENRIQUECIMIENTO ACUMULADO
Bub1b	Homólogo beta de BUB1 incipiente no inhibido por benzimidazoles 1 (levadura)	13991	-0.503589034	-0.2868474
Mybl2	Homólogo parecido 2 al oncogen (aviar) del virus V-myb de mieloblastosis myeloblastosis viral	13999	-0.523670435	-0.27833852
Dsn1	Homólogo de DSN1, componente del complejo MIND del cinetocoro (S.cerevisiae)	14008	-0.549398065	-0.26945922
Kif2c	Miembro 2 C de la familia de las cinesinas	14010	-0.563030958	-0.2598374
Kif18a	Miembro 18 A de la familia de las cinesinas	14017	-0.576656222	-0.25034368
Cdc20	Homólogo 20 del CDC20 del ciclo de división celular (S. cerevisiae)	14018	-0.580106974	-0.2403553

Mad2l1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	14019	-0.580602169	-0.2303584
Ccnb2	Ciclina B2	14020	-0.581152618	-0.22035204
Gins1	Subunidad 1 del complejo GINS (homólogo Psf1)	14023	-0.603614151	-0.21010399
Pttg1	Transformador 1 de tumor pituitario	14028	-0.619677007	-0.19972445
Plk1	Cinasa 1 parecida a Polo 1 (Drosophila)	14036	-0.640498042	-0.189204
Hist1h2bb	Histona del grupo 1, H2bb	14037	-0.644302547	-0.17811032
Mlf1ip	Proteína de interacción con MLF1	14039	-0.64978236	-0.1669948
Cenpi	Proteína I del centrómero	14047	-0.678234518	-0.15582462
Ccnb1	Ciclina B1	14056	-0.691223979	-0.14450333
Nuf2	Homólogo NUF2, del componente NDC80 del complejo del cinetocoro (S. cerevisiae)	14062	-0.717477024	-0.13251238
Ska1	Subunidad 1 del complejo asociado al huso y al cinetocoro	14065	-0.734317064	-0.12001387
Spc25	Homólogo de SPC25, componente NDC80 del complejo del cinetocoro (S. cerevisiae)	14074	-0.804355443	-0.13674466
Ccna2	Ciclina A2	14078	-0.842607439	-0.09245413
Sgol2	Proteína 2 parecida a shugoshin (S. pombe)	14080	-0.846453488	-0.0779523
Ndc80	Homóloga de NDC80, componente del complejo del cinetocoro (S. cerevisiae)	14083	-0.873560488	-0.06305628

Rrm2	Polipéptido con actividad de reductasa M2 de nucleótido	14085	-0.922827721	-0.048064876
Cenpk	Proteína K del centrómero	14090		-0.03246564
Cdk1	Cinasa 1 dependiente de ciclina	14092	-0.932636738	-0.016479896
Bub1	Homólogo 1 de BUB1 incipiente no inhibida por benzimidazoles (levadura)	14094	-0.986617088	4.35E-04

El análisis de los genes en el “extremo representativo” (leading-edge) de los grupos de genes enriquecidos en las células β del día P20 mostró genes tales como *E2F1*, *Tp53*, *Ccna2* y *Ccnb1*, relacionados con la progresión del ciclo celular (Figura 2.2 A). Además, se realizó un análisis del ciclo celular en las células β de ratas de los días P20 y P28 así como adultas, mediante citometría de flujo (Figura 2.2.B). Los resultados mostraron por un lado, que la proporción de células β de ratas adultas que se encuentran en la fase G1 del ciclo celular (87.9 %) es mayor que las de células β de ratas de los días P20 y P28 (79.1 % en ambas edades); y por el otro, que el porcentaje de células β de ratas del día 28P y adultas que se encuentran en la fase S del ciclo celular (2.12 y 0.65 % respectivamente), así como el porcentaje de células beta adultas en la fase G2/M del ciclo, es menor que el porcentaje observado en las células β de ratas de 20 días posnatales (16.1 % en fase G2/M y 4.6 % en fase S), como lo muestra la figura 2.2.C (Larqué et al. 2016).

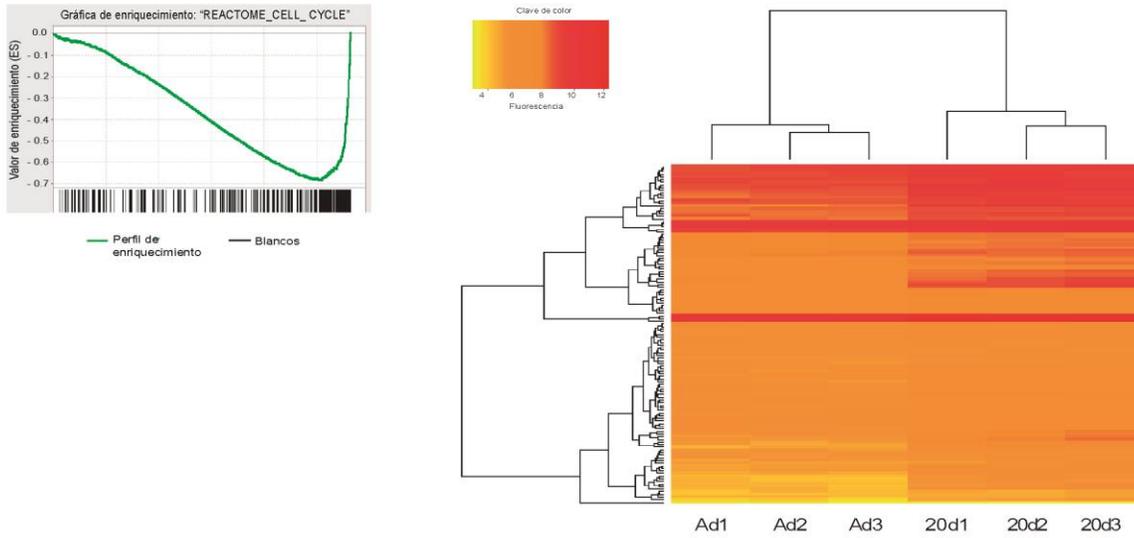
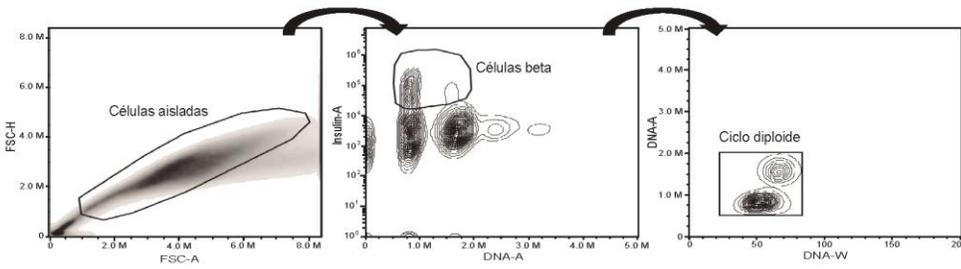
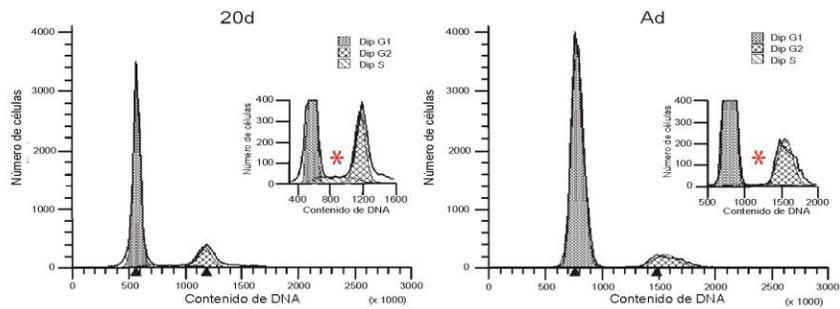
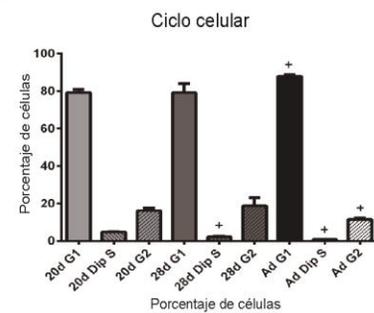
A**B****C****D**

Figura 8. Cambios en la expresión de genes y cambios funcionales relacionados con la transición de las células beta de un fenotipo proliferativo a uno quiescente. A) Gráficas de enriquecimiento del grupo de genes “ciclo celular” de la base de datos Reactome, en las que se muestran el incremento de enriquecimiento a lo largo de los genes expresados en las células beta (línea verde) y los genes blanco que contribuyeron a dicho enriquecimiento (líneas verticales negras). Mapa de calor con los niveles de expresión de los genes que contribuyeron al enriquecimiento de los grupos de genes; dendrograma que muestra las similitudes entre muestras. **B)** Gráficas obtenidas mediante citometría de flujo en las que se muestra la estrategia de selección de células beta para el análisis de su contenido de DNA. **C)** Histogramas que muestran el contenido de DNA de las células beta de ratas lactantes y adultas. Insertos con acercamiento a las fases S y G2/M del ciclo celular. **D)** Cuantificación del porcentaje de células beta de diferentes edades en cada fase del ciclo celular. $p^* < 0.05$ en comparación con la misma fase del ciclo celular en células de ratas lactantes .

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado durante el periodo de destete, alrededor del día P20 el páncreas de la rata presenta cambios significativos en su estructura y en su función, así como la sobreexpresión de genes relacionados con el ciclo celular y replicación del DNA. Resulta importante analizar los procesos de proliferación de las células dentro del islote pancreático en esta etapa específica de maduración.

IV. HIPOTESIS

Si al día P20 las células β pancreáticas presentan sobreexpresión de genes relacionados con ciclo celular y replicación del DNA al compararlas con células β de rata adulta, entonces las células β al día P20 se encontraran proliferando en mayor cantidad que las adultas.

Sí hay presencia de proliferación y apoptosis en las células β al día P20, entonces éstas presentaran un recambio.

V. OBJETIVO GENERAL

Validar los resultados obtenidos del análisis del transcriptoma con respecto a la formación de nuevas células β al día P20 en ratas.

5.1 Objetivos particulares:

- Evaluar los parámetros morfométricos como: tamaño de los islotes, tamaño de las células α y β en los islotes, cantidad de células por islote en ratas al día P20 y adultas.
- Detectar y cuantificar la expresión de la proteína Ki-67 como marcador de proliferación de células β pancreáticas de ratas al día P20 y adultas.
- Analizar el índice de apoptosis en las células β mediante la técnica de TUNEL.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Animales

Los experimentos se llevaron a cabo con ratas macho *Wistar* de 20 días (P20) y ratas adultas jóvenes de aproximadamente 3 meses de edad (200-250 g). Los animales se obtuvieron del bioterio en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y fueron mantenidos bajo un ciclo de 12h luz/12h oscuridad, ambos grupos se alimentaron con una dieta estándar para rata (LABDiet 5001, compuesta de 28,5% de proteína, 13,5% de grasa y 58% de carbohidratos) y agua *ad libitum*.

El destete se realizó al día P20, de cada camada de ratas se tomaron los machos, y estos se dividieron en dos grupos: un grupo se utilizó inmediatamente a los 20 días, mientras que el otro grupo se dejó crecer hasta alcanzar un peso de entre 200 y 250 g. Todos los animales se mantuvieron y se usaron de acuerdo con las reglas del comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (número de protocolo: MHU23-14). Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg, vía intraperitoneal) antes de llevar a cabo los procedimientos.

6.2 Inmunohistoquímicas

Preparación de tejidos para inclusión en parafina

Los páncreas de rata de las distintas edades fueron obtenidos y fueron divididos en la región anatómica de la cabeza y cuerpo-cola (esta región se mencionará como cola). Ambas regiones fueron fijadas durante 24 horas en paraformaldehído al 4%, posteriormente fueron deshidratados e incluidos en parafina y se realizaron cortes de 5 μ m de espesor y fueron fijados a portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina. Posteriormente se desparafinaron colocando las muestras durante 15 min a 60°C y se rehidrataron con gradientes decrecientes de alcohol (100%, 98%, 85%, 70% y 50%).

6.2.1 Tinción triple para insulina, glucagon y núcleos

Se realizaron inmunofluorescencias triples para evaluar la masa de las células β , las células α y los núcleos. Los cortes se permeabilizaron y bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda utilizando una solución de PBS 1X (0.1 M), 0.3% de Tritón X-100 y suero normal de cabra al 2%. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios contra insulina y glucagon siguiendo el protocolo especificado en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de anticuerpos primarios utilizados en las inmunohistoquímicas.

Antígeno	Marca del anticuerpo	Anticuerpo levantado	Concentración	Incubación	Temperatura
Insulina	INC	Cobayo	1:5000	16 horas	4 °C
Glucagon	Sigma	Ratón	1:4000	16 horas	4 °C

La detección del anticuerpo primario de glucagon se realizó incubando con anticuerpo secundario anti ratón acoplado a FITC (excitación 494 nm y emisión 520 nm) con una dilución de 1:100 durante una hora a temperatura ambiente. Para detectar la insulina, las muestras se incubaron con anticuerpo anti-cobayo conjugado con biotina (1:100) durante 1h 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron 3 veces en PBS IX y se incubaron con el complejo avidina-biotina por 1 h a temperatura ambiente. Para revelar la marca de insulina se utilizó diaminobenzidina (DAB). Los núcleos fueron marcados con 4',6-diamino 2-indol (DAPI), el cual es un marcador fluorescente que se une a las regiones enriquecidas de adenina y timina en secuencias de DNA.

Para medir el área ocupada por las células β y α en los islotes y el tamaño de los agregados de células (que se define como cualquier grupo de células β o α dentro o fuera de los islotes), se tomaron fotografías utilizando una cámara conectada a un microscopio de fluorescencia Olympus TH4-100. Se utilizó un canal verde para FITC y un canal azul para DAPI. El área total del páncreas y el área inmunorreactiva para insulina o glucagon se midió mediante un sistema de análisis de imágenes MacBiophotonics ImageJ.

6.2.2 Proliferación en las células β

Para determinar la proliferación de las células β , se utilizó Ki67 como un marcador de proliferación. Ki67 es una proteína que se expresa en el ciclo celular durante las fases G1, S, G2, y las fases mitóticas, pero no durante la fase de reposo G0. Niveles de esta proteína son bajos en fases G1, S y G2 pero se elevan a un nivel máximo en la fase M.

Estandarización de la técnica

Como control positivo para la marca de Ki-67 se utilizaron células SiHa (Linea celular humana derivada de carcinoma de útero). Las células SiHa se sembraron en portaobjetos con confluencia del 80% y fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 24h. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS 1X. Las células se perforaron y se bloquearon durante 1h con una solución con la siguiente composición: suero normal de cabra al 10 %, glicina 0.3M, BSA al 1% y Tween al 0.1% en PBS 1X.

Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-Ki67 (ab15580) de la marca Abcam, a una dilución 1:100 y 1:200. Para revelar la marca de anticuerpo primario contra Ki67 se utilizó anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a FITC. Los núcleos se marcaron con DAPI. Las muestras se analizaron bajo un microscopio de epifluorescencia, se utilizó un canal verde para FITC y uno azul para DAPI.

Cultivo primario de células insulares de páncreas

Para evaluar las células β positivas a Ki67 se realizó un cultivo primario como se describe a continuación:

Grupos de 4 a 6 ratas por cultivo primario fueron anestesiadas vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (40 mg/kg), y se les realizó una cirugía para extraer el páncreas. Posterior a la cirugía, se realizó dislocación cervical a cada uno de los animales.

Los islotes pancreáticos fueron aislados y separados del tejido acinar mediante digestión por colagenasa (0.5 mg/ml) en solución salina balanceada de Hank, y separados manualmente utilizando un microscopio estereoscópico.

La disociación de las células insulares se realizó mediante incubación de los islotes en una solución libre de calcio con 5.6 mM de glucosa, 0.5% de BSA y 3 mM de EGTA (ácido etilenglicol-bis [β -aminoethylether] N, N, N', N'-tetraacético) a 37 °C en baño con agitación durante 5 minutos; y posterior disgregación mecánica en la misma solución adicionada con tripsina (concentración final de 0.01%). La disociación fue detenida cuando 50 ó 60 % de las células se observaron completamente aisladas.

Las células individuales se cultivaron en un medio RPMI-1640 (11,6 mM de glucosa) suplementado con 10% de suero fetal de ternera, 200 unidades/ml de penicilina G, 200 mg/ml de estreptomina y 0,5 mg/ml de anfotericina B, posteriormente se sembraron aproximadamente 20,000 células β por cubreobjeto y se fijaron durante 30 min en paraformaldehído al 2%.

Tinción para Ki67, insulina y núcleos

Las células β se perforaron y se bloquearon durante 1h con una solución con la siguiente composición: suero normal de cabra al 10 %, glicina 0.3M, BSA al 1% y Tween al 0.1% en PBS 1X. Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con una mezcla del anticuerpo primario anti-Ki67 (ab15580) de la marca Abcam una dilución 1:200 y el anticuerpo primario de insulina 1:5000.

Para revelar la marca de anticuerpo primario contra Ki67 se utilizó anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a FITC y para la insulina se utilizó un anticuerpo secundario anti cobayo (DyLigth⁶⁴⁹). Los núcleos se marcaron con DAPI. Las muestras se analizaron bajo un microscopio de epifluorescencia, se utilizó un canal verde para FITC, rojo para DyLigth⁶⁴⁹ y uno azul para DAPI.

6.2.3 Apoptosis en células β

El experimento se llevó a cabo en cortes histológicos de páncreas incluido en parafina y procesadas como se menciona anteriormente. Para permeabilizar el tejido se utilizó una solución de PBS 1X, Tritón X-100 al 0.1% y citrato de sodio a 0.1%.

La marca positiva a insulina se determinó mediante la incubación de los cortes con un anticuerpo anti-insulina (como lo menciona la tabla 6.2.1), para detectar la marca del anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a ALEXA 649 (excitación=650nm, emisión= 670nm).

Para evaluar la apoptosis en los cortes de páncreas se utilizó la técnica de TUNEL, por sus siglas en inglés (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling). El kit se adquirió de la marca Roche (In situ cell Death Detection Kit Fluoresceín) Cat.No. 11684 795910. Este ensayo se basa en la incorporación de desoxiuridina trifosfato marcada con fluoresceína (Fluorescein d-UTP), a los extremos 3'-OH del DNA generados por su fragmentación durante la apoptosis. El ensayo consistió en incubar los tejidos con 50 µL de la mezcla de reacción durante 1h 30 min a 37°C. Como control positivo para apoptosis los cortes fueron incubados con DNAasa 3U/ml (diluida en buffer Tris-HCL 50 mM, BSA 1mg/ml y MgCl₂ 10 Mm) para lograr la fragmentación del DNA. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS 1X. Los núcleos fueron marcados con DAPI.

Las muestras se analizaron bajo un microscopio de epifluorescencia. Se utilizó un canal rojo para ALEXA, un canal verde para fluoresceína y uno azul para DAPI.

VII. RESULTADOS

Morfología del islote pancreático en el desarrollo

En la primera parte de este trabajo se evaluó el tamaño y distribución de los islotes en la región de la cabeza y en la región del cuerpo- cola en páncreas de ratas inmaduros (20 P) y páncreas maduros ($\approx 90P$). Con la finalidad de encontrar diferencias en las dos edades estudiadas. Para lo cual se evaluó el área inmunoreactiva a insulina y a glucagon, los dos tipos de células más abundantes dentro del islote pancreático. En la figura 8 se presenta una imagen de un islote marcado para insulina (A) y para núcleos (B), así como la selección del área positiva para insulina (C) y el número de núcleos presentes en el islote (D). De forma similar, en la figura 9 se presenta el mismo islote, con la marca inmunorreactiva a glucagon (A) y su cuantificación (B), así como los núcleos presentes en esta área (C, D).

En la figura 10 presenta la frecuencia expresada en porcentaje del tamaño de los islotes o agregados de células α y β , esta se determinó como la suma de las áreas positivas a insulina y a glucagon. A los 20 días de edad hay una mayor frecuencia de agregados pequeños en comparación con los islotes de las ratas adultas. Además, a los 20 días los islotes presentaron un área máxima de $27,500 \mu\text{m}^2$, mientras en páncreas adultos aproximadamente el 10% de sus islotes son mayores a este valor, alcanzando áreas de hasta $63,000 \mu\text{m}^2$. Este aumento en el tamaño de los islotes podría ser debido a un aumento en el tamaño de las células (hipertrofia) o la formación de nuevas células (hiperplasia). Por lo cual, se evaluó el tamaño de las células α y β .

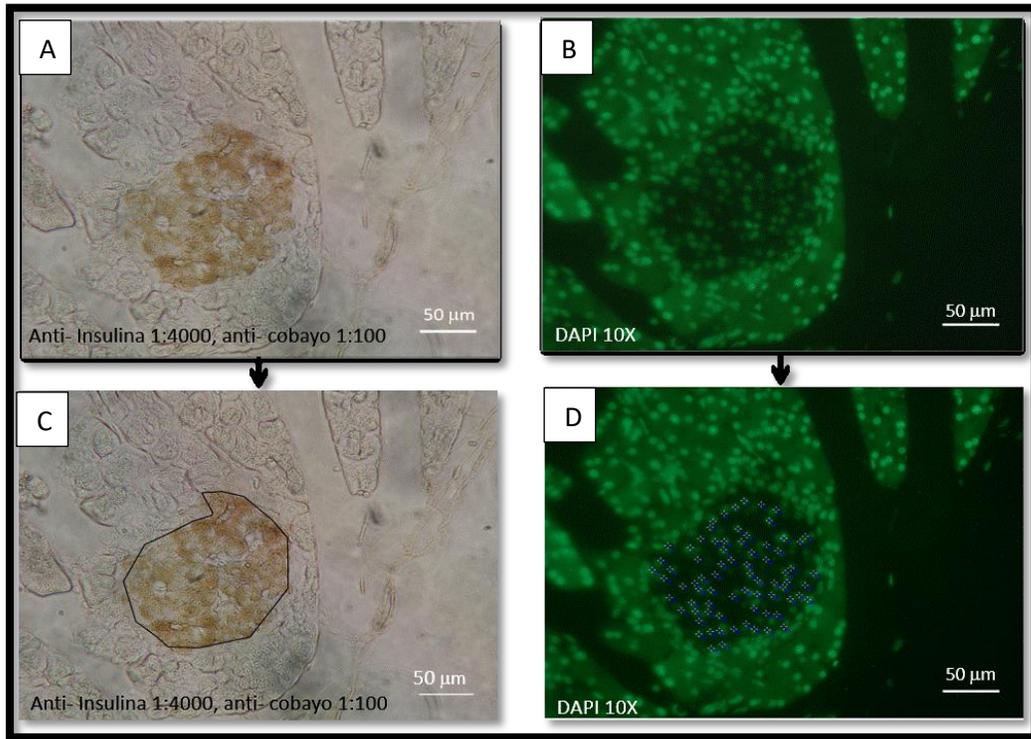


Figura 8. Inmunohistoquímica para insulina e inmunofluorescencia para núcleos.

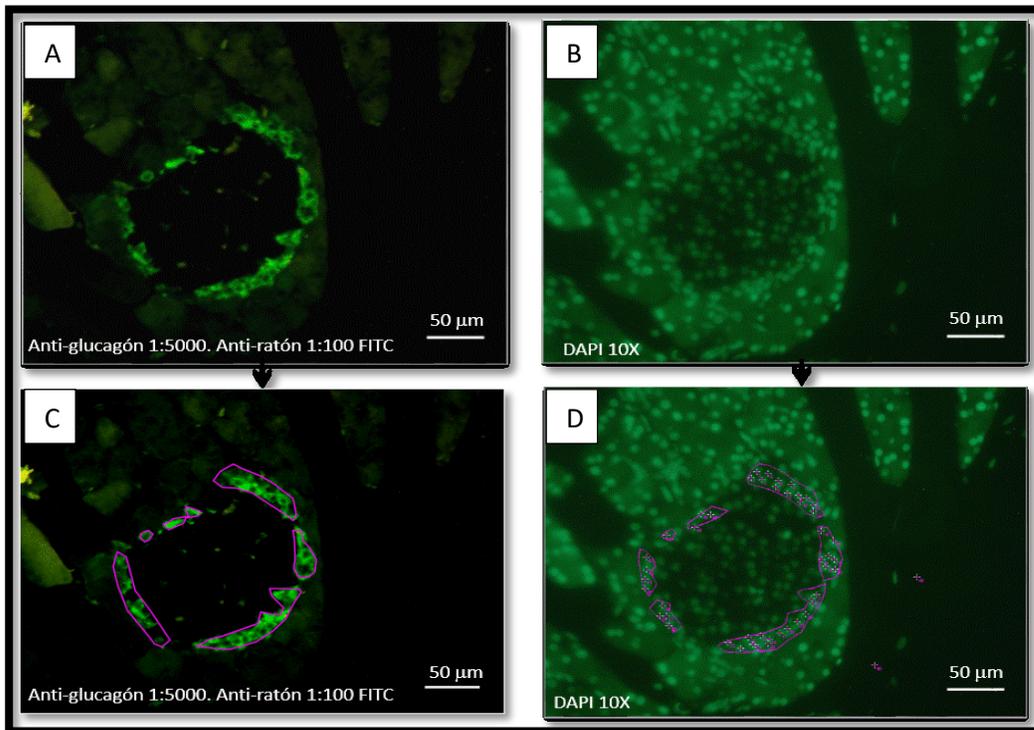


Figura 9. inmunofluorescencia para glucagon y núcleos.

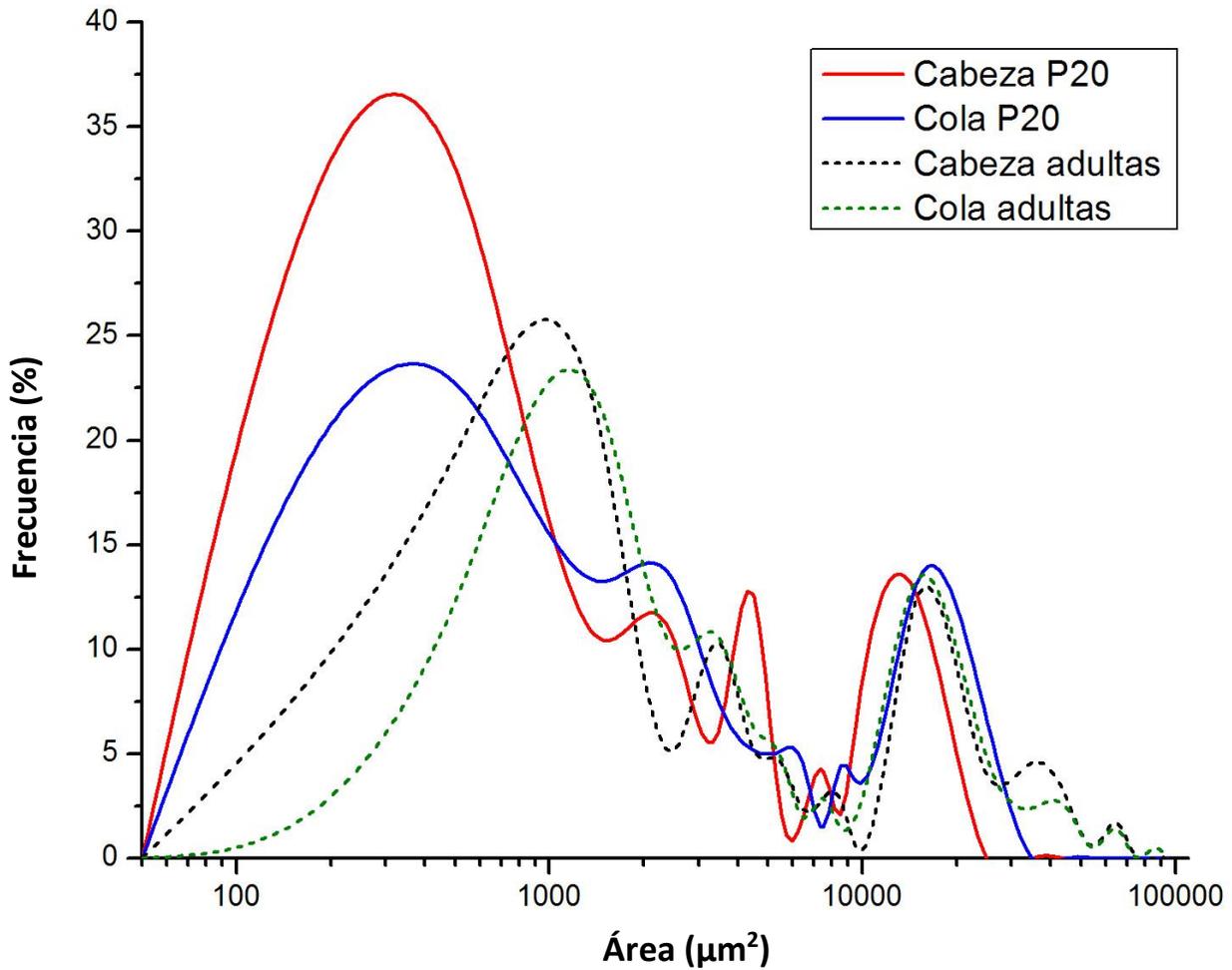


Figura 10. Histograma de frecuencias para el tamaño de los agregados de células α y β en la región de la cabeza y en la región cuerpo-cola de ratas adultas y de ratas de 20 días. El tamaño se obtuvo sumando el área de Insulina y glucagon. n= 103-229 islotes.

El tamaño de las células se determinó dividiendo el área de insulina o glucagon entre el número de núcleos presentes en esta área. Tanto para la cabeza como para la cola, el tamaño de las células α y β aumentó significativamente con la edad (Figura 11).

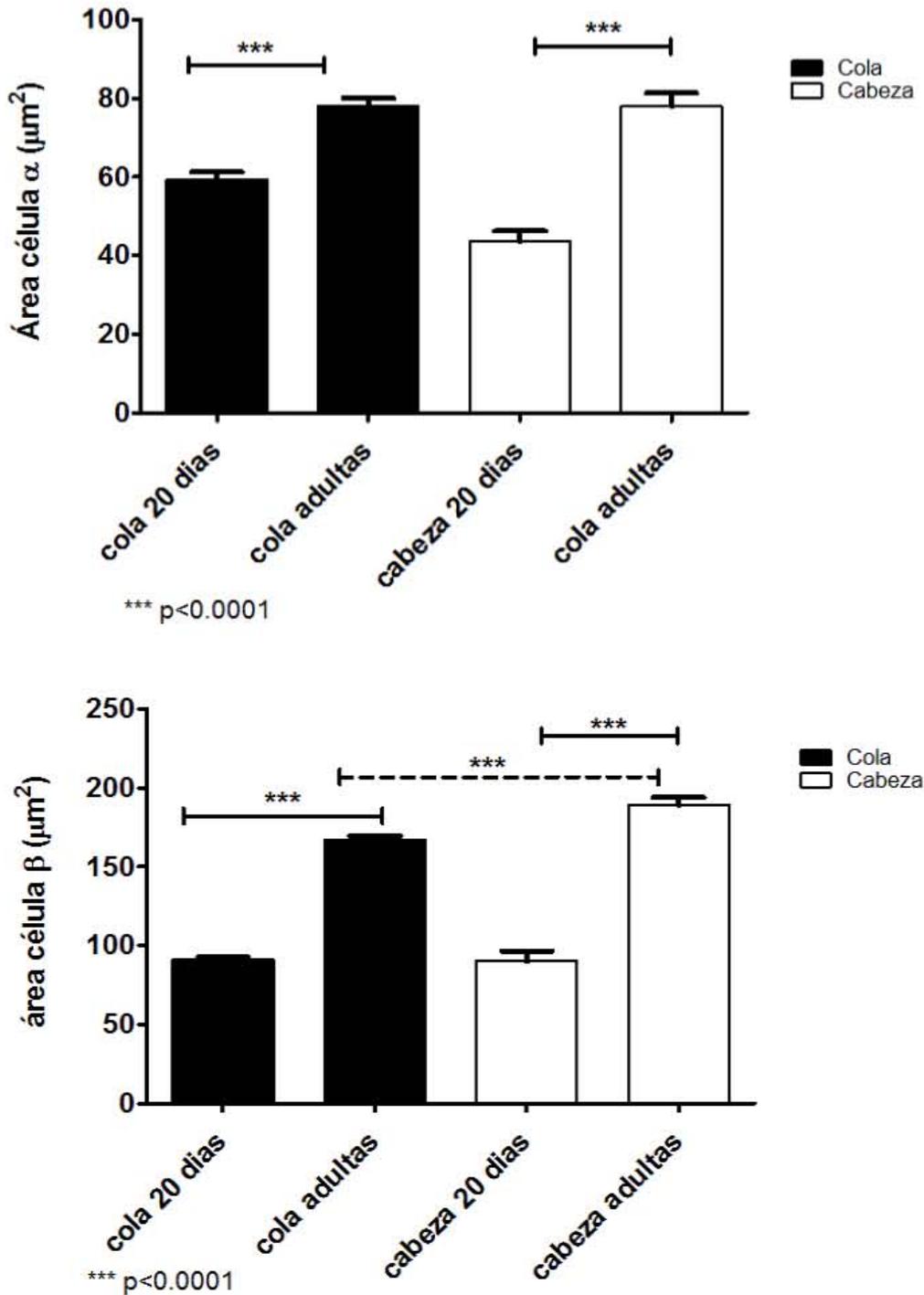


Figura 11. Área de las células α y β . El valor de obtuvo del cociente del área de insulina del islote entre el número de núcleos. ANOVA de una vía, seguido de una prueba Dunnett. Las barras representan la media \pm SEM (n = 1796 - 6112 células) ***p<0.001.

Con estos resultados, se podría pensar que el aumento en el tamaño de los islotes es debido principalmente a hipertrofia de las células α y β . Sin embargo, al evaluar la cantidad de células en cada uno de los islotes se encontró que los islotes de los animales adultos tienen un mayor número de células, al compararlos con los islotes del día P20 (Figuras 12 y 13). Lo que sugiere que desde el periodo de destete hasta la edad adulta hay formación de nuevas células.

Las figuras 12 y 13 muestran la cantidad de células α y β presentes en cada uno de los islotes o agregados de células en las regiones de cabeza y cola de páncreas de 20 días y adultas. Además, se representa mediante una gráfica circular el porcentaje de islotes que contienen: células α y células β , o sólo alguna de las dos. De manera interesante, se encontró que algunas de las células α y β no están formando parte de los islotes, sino que se encuentran dispersas dentro del tejido acinar; las figuras 12 y 13 muestran como los agregados de células α varían de sólo una célula (en su mayoría) hasta pequeños grupos de máximo 12 células. Sin embargo, estos grupos de células α podrían en realidad ser un artefacto. Ya que los islotes están dispersos en forma aleatoria en el tejido y al realizar un corte diagonal los islotes son cortados a diferentes alturas; por lo que si el corte es en el extremo del islote podría sólo tener células α .

En lo que respecta a las células β , hay algunas que se encuentran formando agregados pequeños o incluso solas, en las dos regiones y edades analizadas. Sin embargo, en la región de la cabeza pancreática al día P20 hay agregados de más de 100 células β sin células α y en los animales adultos un 42% de los agregados de células β no presentan células α rodeándolos y aquellos que tienen células α son muy pocas en comparación a las células β presentes.

A pesar de la gran heterogeneidad que muestran los islotes pancreáticos, se determinó el promedio de células α y β que contienen. La figura 14 describe la proporción promedio de células α y β por islote. Este valor se obtuvo de dividir el área positiva a insulina o a glucagón entre el área total del islote. El área positiva a glucagón es distinta entre la región de la cola y la cabeza en ambas edades, ya que cambia de un 10% a un 20% en adultas y de un 20% a un 30% en el día P20.

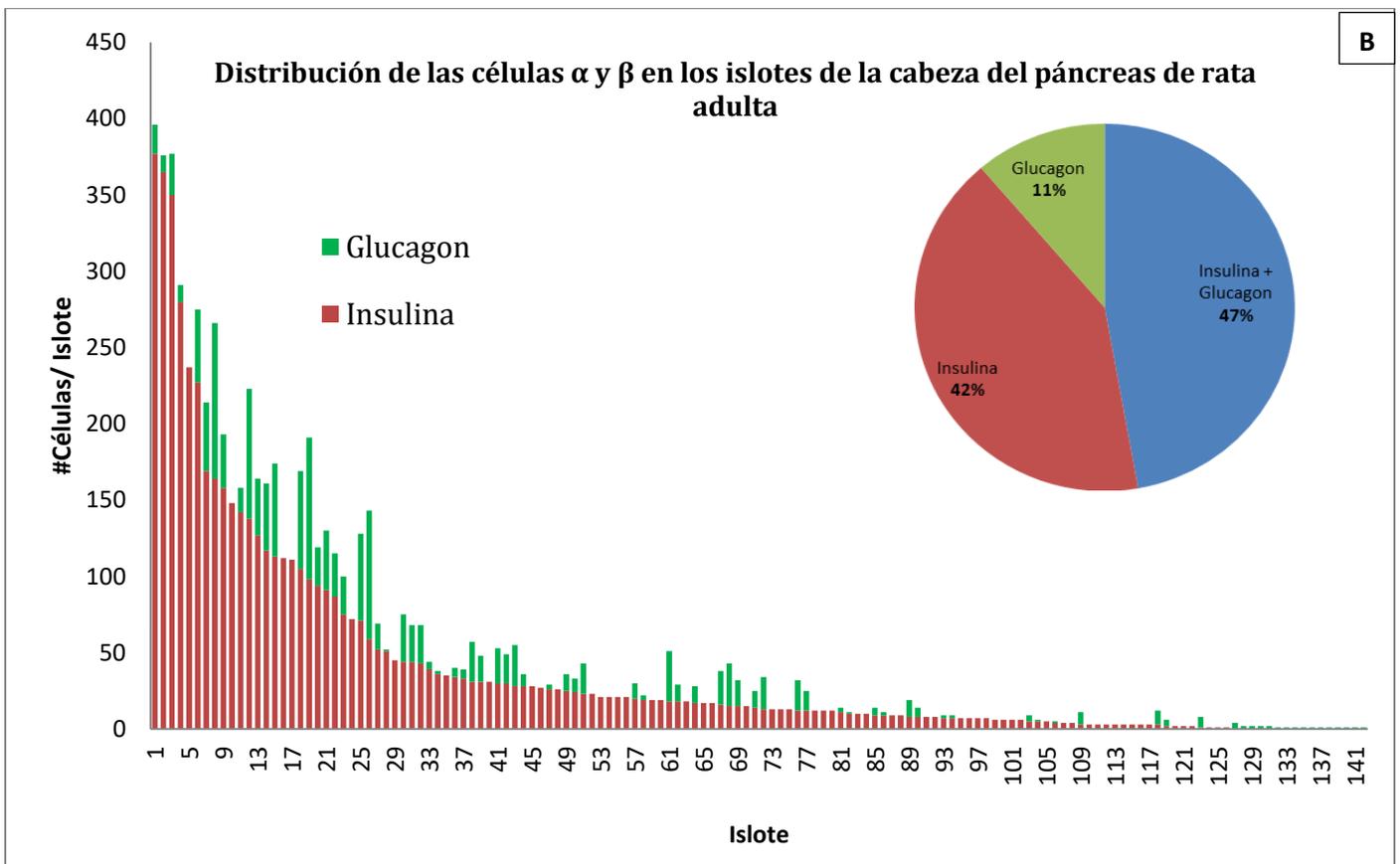
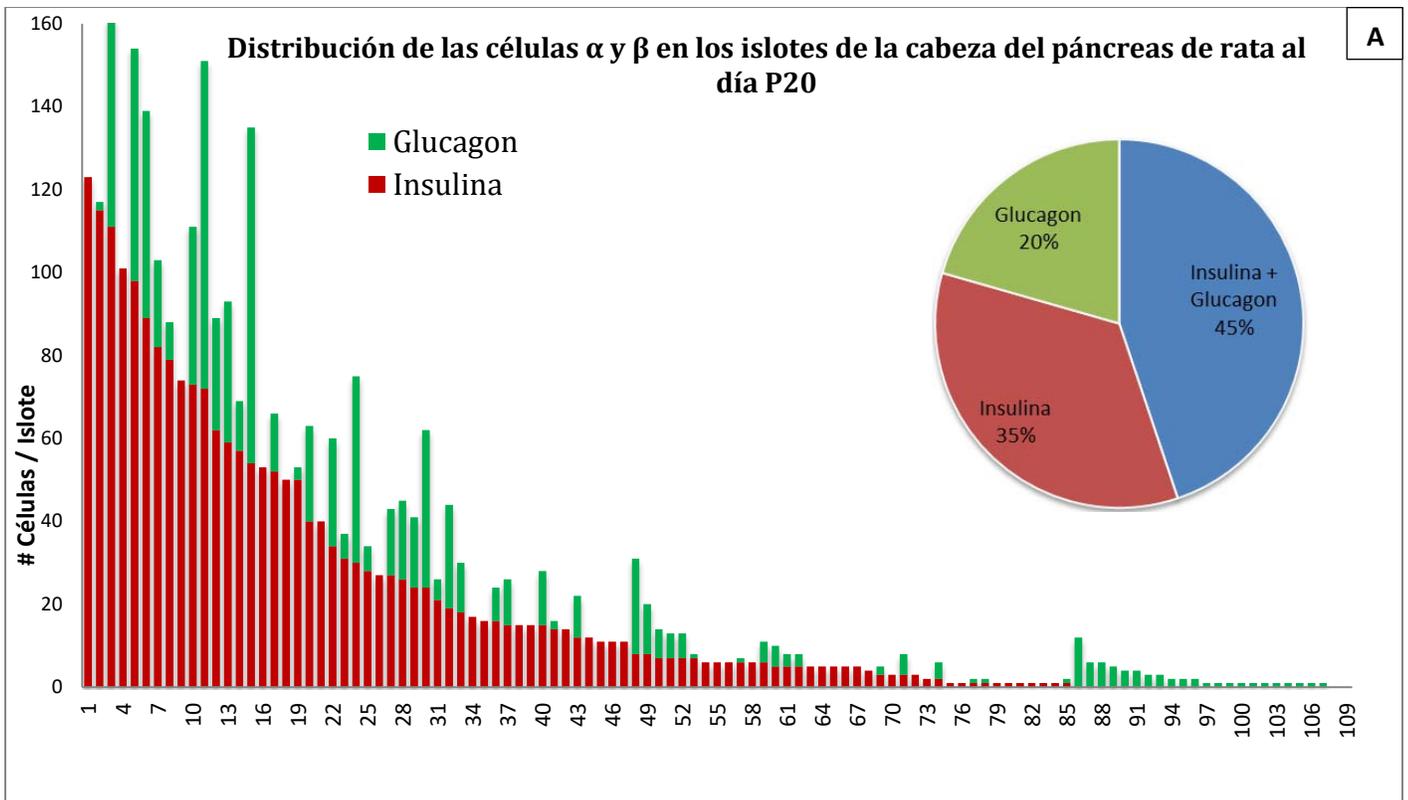


Figura 12. Cantidad de células α y β presentes en región de la cabeza pancreática de ratas de 20 días (A) y adultas (B). Las barras rojas representan el número de células β , mientras que las verdes el de células α . La gráfica circular representa el porcentaje de islotes que tienen células α y β (azul), solo β (rojo) o solo α (verde).

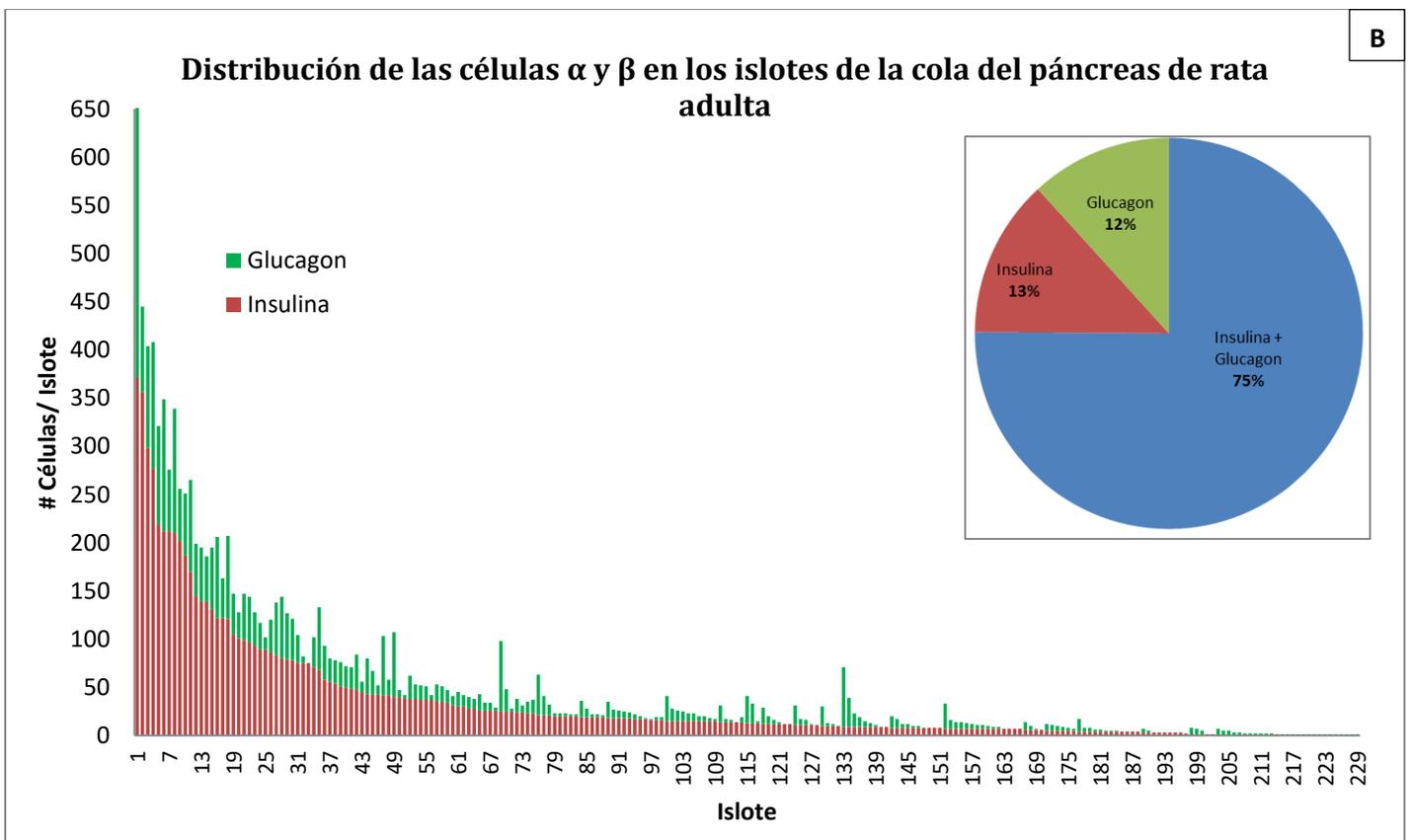
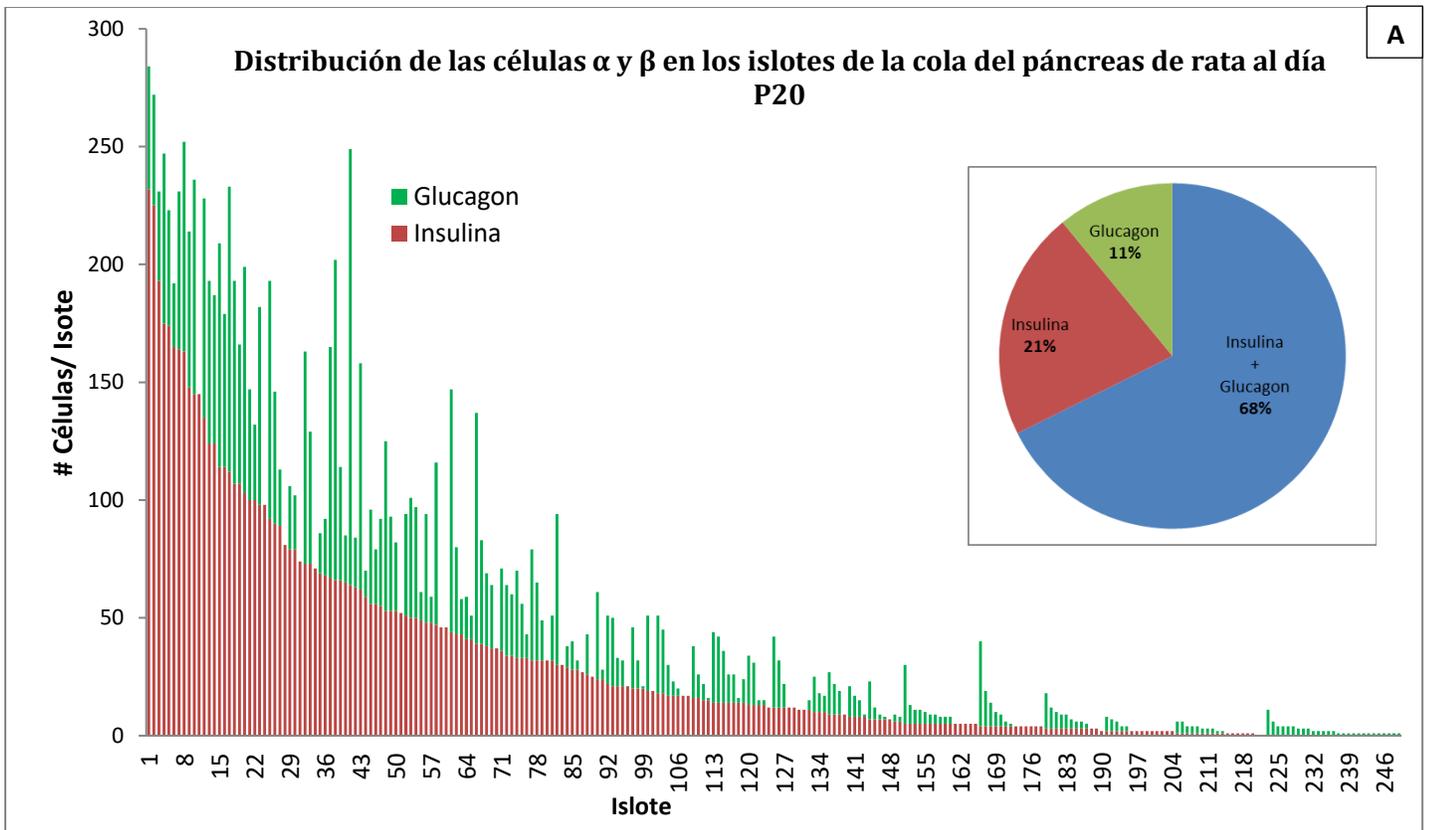


Figura 13. Cantidad de células α y β presentes en la cola pancreática de ratas de 20 días (A) y adultas (B). Las barras rojas representan el número de células β , mientras que las verdes el de células α . La grafica circular representa el porcentaje de islotes que tienen células α y β (azul), solo β (rojo) o sólo α (verde).

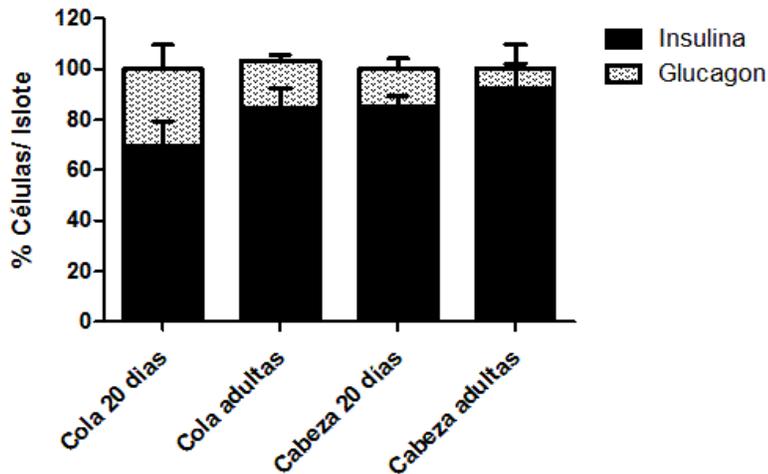


Figura 14. Relación de las células α y β en el islote. Los valores se obtuvieron dividiendo las áreas positiva a insulina y glucagón entre la suma de ambas. Las barras representan la media \pm SEM. n= 48-136.

El aumento en la cantidad de células por islote se puede deber a la proliferación de las células preexistentes. Al realizar un perfil de expresión génica en células β al día P20, nuestro grupo de investigación encontró la sobreexpresión de genes relacionados con la proliferación y el ciclo celular, que es precisamente la parte medular de este proyecto. Por lo cual se evaluó la proliferación en las células β mediante la tinción de la proteína Ki67.

Como control positivo y para estandarizar la técnica, se utilizó una línea tumoral de cáncer de cérvix (SiHa) ya que estas células están en constante proliferación. En la figura 15 se puede apreciar como el anticuerpo se une a las células que están en proceso de proliferación. Los diferentes patrones de expresión observados indican que la célula se puede encontrar en fase M cuando todo el núcleo celular esta en color verde o en otras fases del ciclo celular (G1, S o G2) cuando se observa una señal discontinua dentro del núcleo.

Una vez estandarizada la técnica, se evaluó la proliferación en las células β , aisladas de ratas al día P20 y adultas. La figura 16 muestra un ejemplo de células que presentaron una marca positiva a Ki67. Se contaron 1839 células β de ratas del día P20 de 3 cultivos primarios y 653 células β de ratas adultas de 3 cultivos primarios. Se encontró que el 2.7% de las células β al día P20 se encontraban proliferando, en comparación a 1.3% de las células β de ratas adultas; sin embargo estos resultados no son significativamente diferentes (Figura 17).

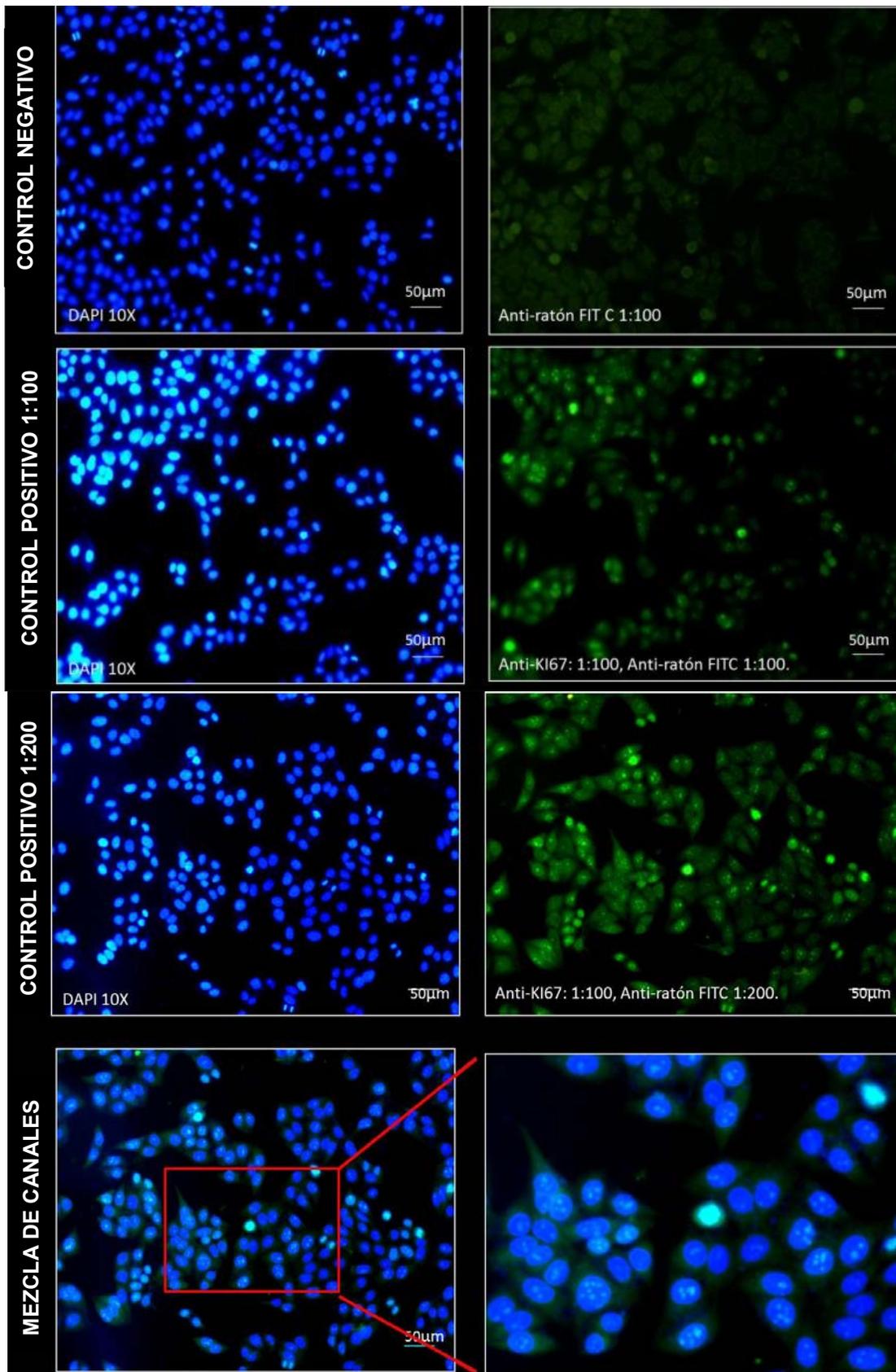


Figura 15.
Coexpresión de Ki67
y núcleos en línea
celular de cáncer de
cérvix (SiHa).
 El control negativo no tiene el anticuerpo primario contra Ki67. Los controles positivos tienen diluciones del anticuerpo primario contra Ki67 de 1:100 y uno en 1:200. Ki67 (verde) y DAPI (azul).

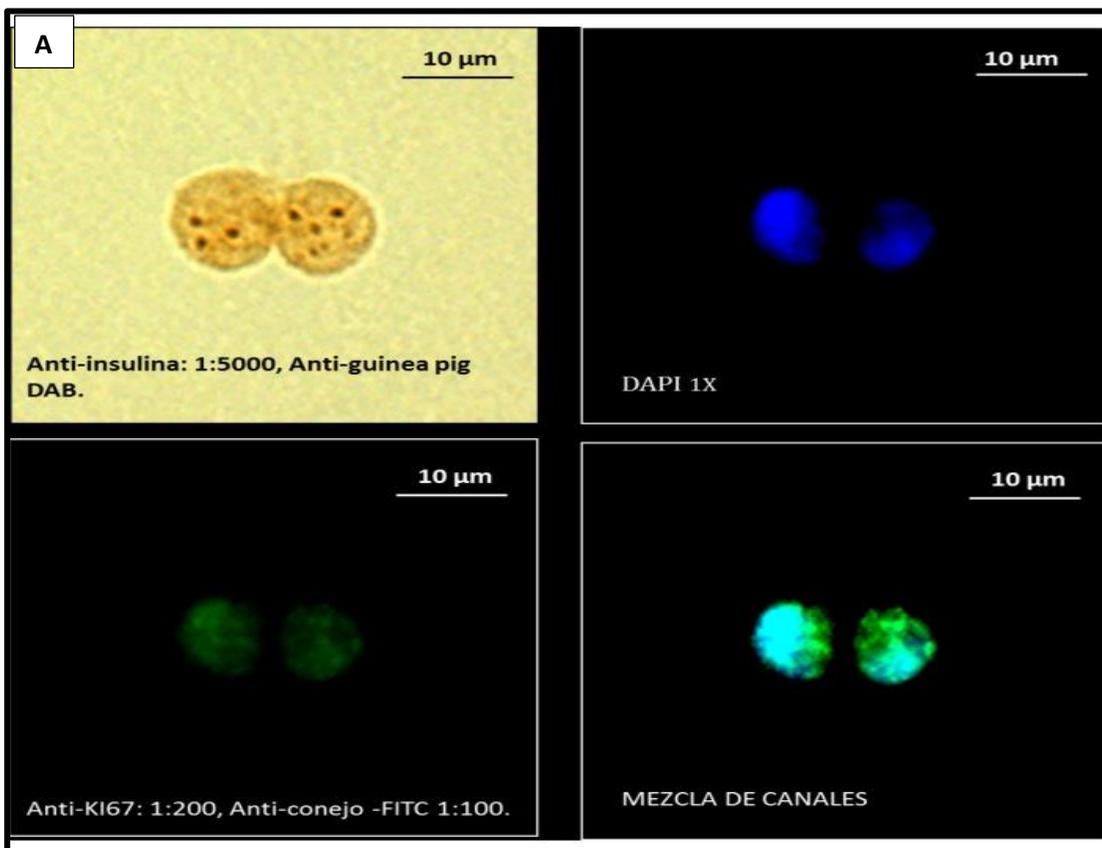
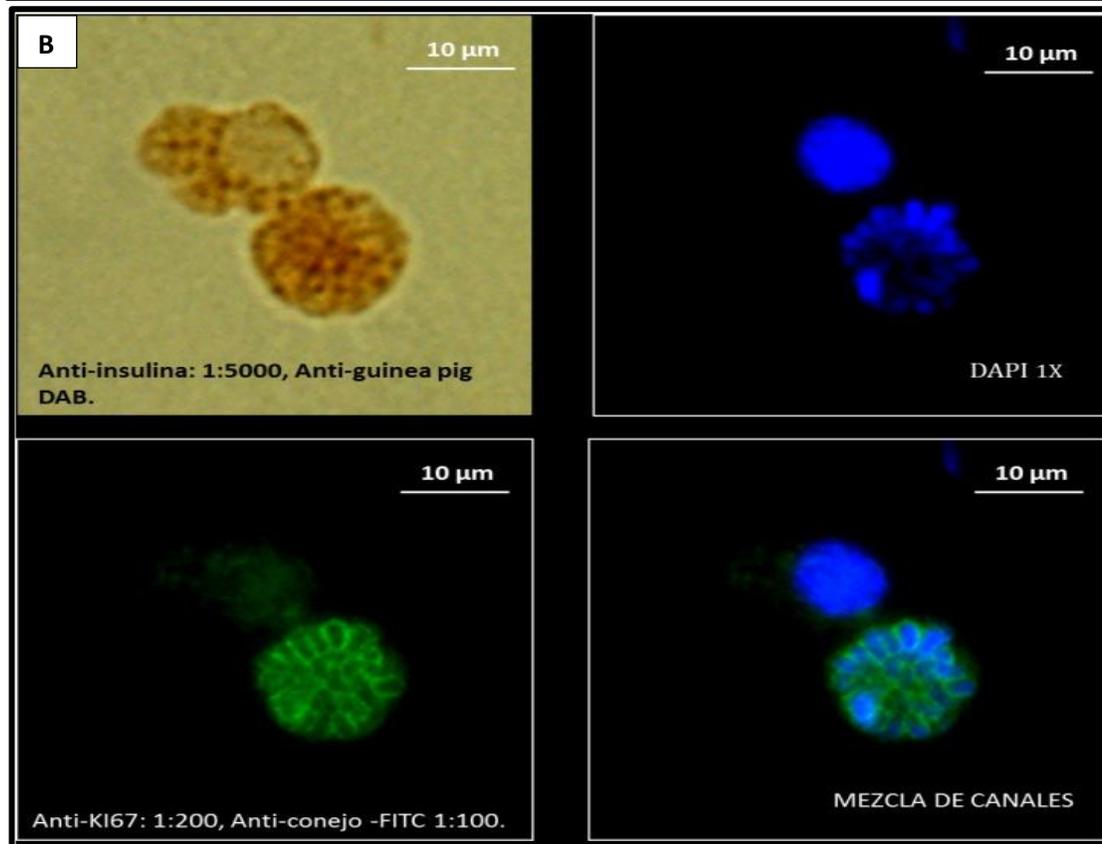


Figura 16.
Coexpresión de insulina, núcleos y Ki67. Fotografía tomada de células β aisladas de ratas de 20 días. *La figura A* muestra una célula en interfase. *La figura B* muestra una célula en fase M. Insulina (café, marca de DAB), DAPI (azul) y la proteína ki67 (verde), mezcla de canales para



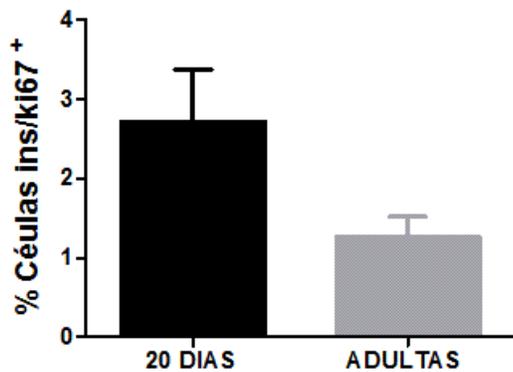


Figura 17. Porcentaje de células β positivas al marcador de ciclo celular Ki67. Las barras representan la media \pm SEM. n= 1839 para el día P20 días y n=653 para adultas.

Para verificar la hipótesis de este trabajo, la cual era que al día P20 el islote pancreático presentaría un recambio en las células β , es decir alta tasa de proliferación y apoptosis, se evaluó la apoptosis mediante la técnica de TUNEL. La figura 18 muestra tejido de páncreas de rata del día P20, el cual fue tratado con DNAasa, esta enzima genera los fragmentos de DNA, al igual que la apoptosis, por lo cual es como se esperan ver las células que estén en proceso apoptótico.

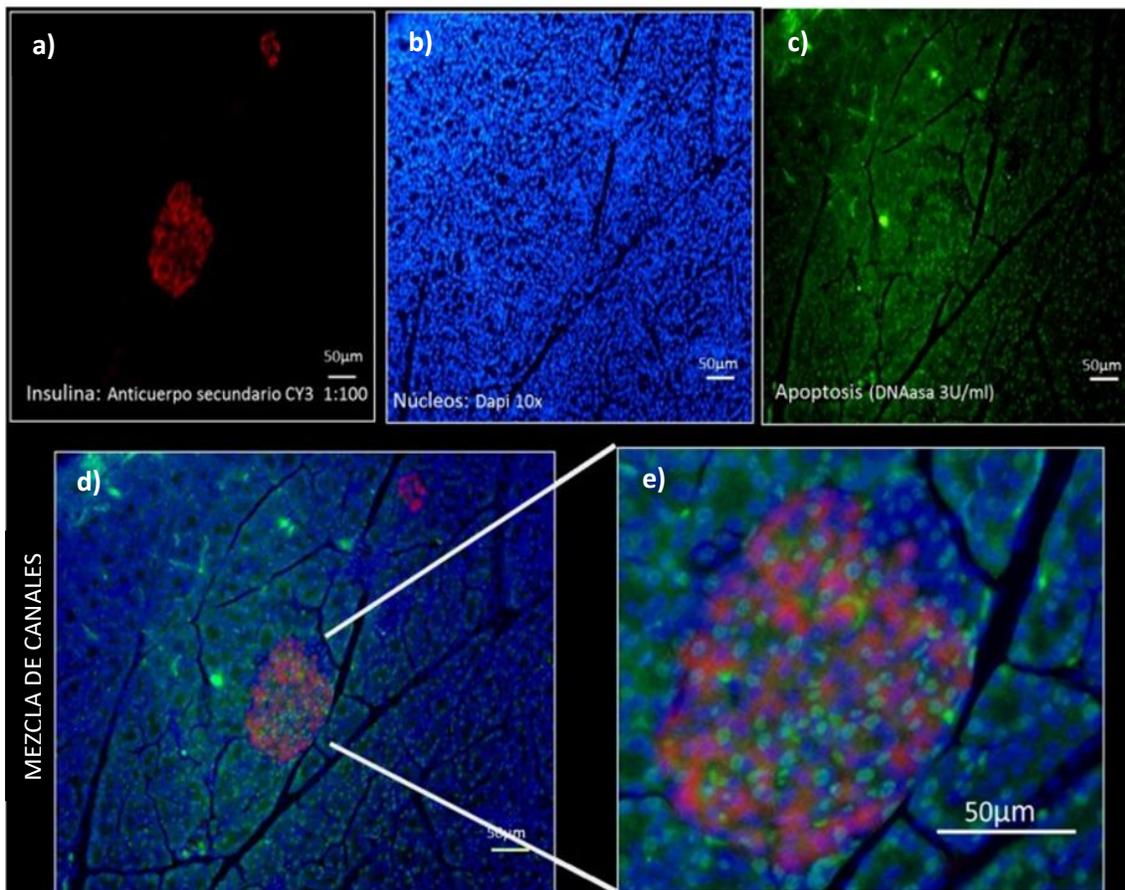


Figura 18. Inmunofluorescencia para insulina, núcleos y apoptosis (mediante TUNEL). Fotografía de un corte de cola de páncreas de rata al día P20 tratada con DNAasa (3U/ml) durante 15 min para fragmentar el DNA. **a)** Insulina (rojo) **b)** DAPI (azul) **c)** TUNEL (verde) **d)** Mezcla de canales para insulina, núcleos y apoptosis. **e)** Amplificación en d. 57

El ensayo también se llevó a cabo en intestino ya que este tejido tiene una tasa de apoptosis superior al tejido pancreático y de esta forma se corroboró que el protocolo utilizado es adecuado para evaluar este proceso de muerte celular que se presenta de forma natural en los tejidos (Figura 19). Sin embargo no se identificaron células apoptóticas en los tejidos analizados de 3 ratas adultas y de 4 ratas del día P20.

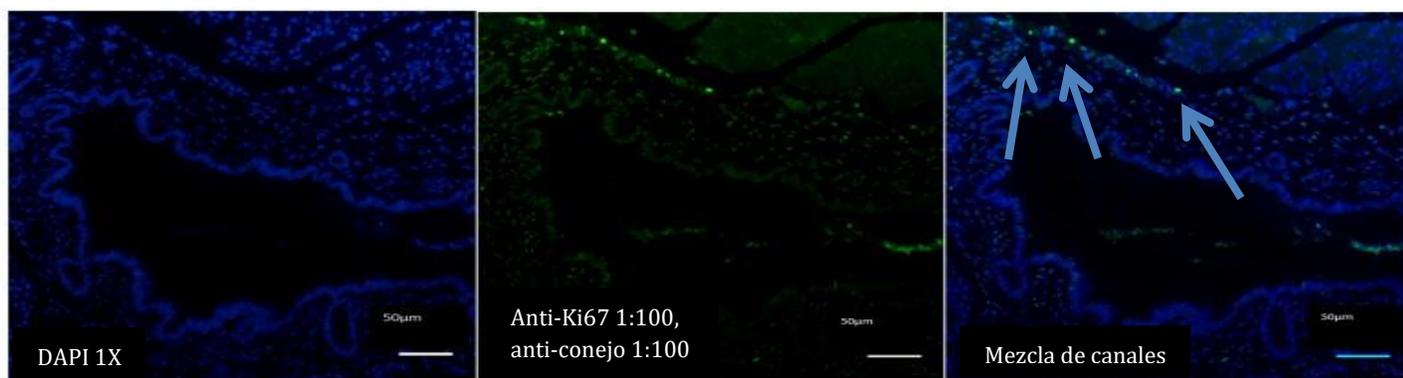


Figura 19. Inmunofluorescencia para núcleos y apoptosis (mediante TUNEL). Fotografía de un corte de intestino de rata adulta (90d). DAPI (azul) y Ki67 (verde).

VIII. DISCUSIÓN

¿Recambio en las células β del páncreas durante el destete?

El destete tiene consecuencias metabólicas dramáticas que requieren adaptaciones importantes de las células β . El cambio de una dieta de leche rica en grasa a una dieta alta en carbohidratos significa una mayor dependencia de la secreción de insulina para la absorción de nutrientes. Por lo tanto, el destete (llevado a cabo el día P20 en ratas) se considera una fuerza impulsora que desencadena la maduración funcional en las células β permitiendo la secreción de insulina ante un estímulo con glucosa.

En nuestro laboratorio se analizó la expresión génica en células β purificadas inmaduras (día P20) y maduras (adultas) y se demostró que al día P20 se encuentran sobre expresados genes relacionados con el ciclo celular y replicación del DNA, en comparación con las células β de ratas adultas (Larqué et al. 2016). Por lo cual nos propusimos determinar si la sobreexpresión de estos genes, tenía participación sobre la proliferación celular. Además, se ha reportado que en periodos neonatales cercanos al día P20 hay un aumento en las tasas apoptóticas en células β (Scaglia et al. 1997). Por lo cual, nosotros planteamos la hipótesis de que al día P20 el páncreas endocrino sufre un recambio, en el que participan principalmente los procesos de apoptosis y replicación.

A pesar de que encontramos que las células β al día P20 transcriben activamente genes relacionados con la proliferación y que un alto porcentaje de estas células β se podrían encontrar proliferando, sólo el 2.7 % fueron positivas a Ki67. La baja tasa de proliferación podría ser un indicio de que estos genes participan en otros procesos además de la proliferación celular.

Algunos otros trabajos se ha reportado que la tasa de replicación en las células β es alta en los recién nacidos y ésta rápidamente declina durante el primer mes de vida (Scaglia et al. 1997). Sorprendentemente, a pesar de que las células β inmaduras presentan esta tasa alta de replicación basal, cuando sufren un daño no generan una respuesta proliferativa, como lo hacen las células β maduras (Stolovich-Rain et al. 2015). Lo anterior es muy interesante, ya que ocurre algo muy semejante con la secreción de insulina; las células β inmaduras tienen una secreción

de insulina alta en condiciones basales, sin embargo no responden ante un estímulo con glucosa, a diferencia de las maduras. El que la secreción de insulina estimulada por glucosa y la respuesta proliferativa ante un daño sean inducidas por el destete, hace pensar en una posible conexión entre el metabolismo y la proliferación celular en esta etapa específica del desarrollo (Stolovich-Rain et al. 2015).

Annicotte y colaboradores demostraron que algunos productos de genes de ciclo celular como CDK4-pRB-E2F1 participan en la respuesta transcripcional de Kir6.2, que es un componente clave del canal K_{ATP} , que participa en la regulación de la secreción de insulina estimulada por glucosa. Además, demostraron que CDK4 es activado por glucosa a través de la vía de insulina, lo que finalmente resulta en la activación de E2F1 y consecuentemente en incrementando la expresión de Kir6.2 (Annicotte et al. 2009).

El trabajo de Annicotte y colaboradores ha sido el primero en que describe un vínculo directo entre el metabolismo y la proliferación celular en células β . Sin embargo, actualmente hay evidencias que indican que las ciclinas y las Cdks de mamíferos también llevan a cabo funciones importantes en otros procesos celulares, tales como la transcripción, reparación de daños en el DNA, el control de la muerte celular, la diferenciación, la respuesta inmune y metabolismo (Hydbring, Malumbres, and Sicinski 2016).

Recientemente Yoshihara y colaboradores (2016) realizaron un análisis comparativo de transcriptoma, utilizando células β inmaduras de ratones (2 semanas) y células β maduras (6 y 12 semanas) y encontraron genes relacionados con la proliferación celular regulados a la baja durante la maduración del islote; entre estos genes se encuentran *Pdgfra*, *Pdgfr β* , *Pdgf β* , y *Fgfr1*. Sin embargo, dado que encontraron la sobreexpresión de genes relacionados con vías metabólicas, particularmente el metabolismo de glucosa y la biosíntesis de ATP, su trabajo se centró en estas últimas, particularmente en el receptor relacionado con estrógeno tipo γ , el cual impulsa un programa de transcripción que promueve el metabolismo oxidativo mitocondrial, y su expresión en células derivadas de células madres pluripotentes inducidas genera células β funcionales in vitro (Yoshihara et al. 2016).

Por otro lado, no detectamos células apoptóticas al día P20, ni en ratas adultas. Se ha reportado que las células β fetales presentan escasa apoptosis, pero la incidencia aumenta posnatalmente, con la máxima tasa en el día P14 en el que el 13% de las células β sufrieron apoptosis. Interesantemente, este evento apoptótico coincide con una significativa disminución de IGF-II en los tejidos pancreáticos (Petrik, J. et al. 1998). Además las tasas de apoptosis de células β reportadas alrededor del primer mes de vida son de 0.2% y estas disminuyen aún más a lo largo de la vida (Montanya et al. 2000). Lo que nos sugiere que la apoptosis en las células β podría ser principalmente entre la segunda y tercera semana de vida.

Hiperplasia e hipertrofia en el islote pancreático a partir del destete a la edad adulta

En este trabajo también se evaluaron los cambios en el tamaño y distribución de los islotes y las principales células que conforman el islote durante el día P20 y se compararon con la edad adulta.

De nuestros resultados se desprende que los cambios en la masa y porcentaje de células del páncreas endocrino siguen patrones independientes en las regiones de cabeza y cola del páncreas. La razón de que esto suceda no es clara, sin embargo, puede reflejar su origen embriológico divergente ya que la cabeza proviene de la yema ventral mientras que la cola proviene de la yema pancreática dorsal. Este origen embriológico dual conlleva que las relaciones anatómicas durante el desarrollo y antes de la rotación del intestino son diferentes en ambas porciones, la yema dorsal está en contacto con la notocorda mientras que la ventral lo está con el mesodermo esplácnico y por lo tanto los estímulos ambientales a los que son sometidos también varían (Aguayo-Mazzucato et al. 2006). Por lo tanto, nos resultó muy interesante estudiar los cambios en los islotes pancreáticos en la cabeza y en la cola de forma independientes en cada porción.

En un estudio clásico realizado en ratas macho adultas se describió que la masa de células α en la cola pancreática es mayor que en la cabeza pancreática, mientras que la masa de las células β es similar. Las tasas basales de la secreción de insulina y la biosíntesis de proinsulina fueron similares en los islotes aislados de ambas regiones pero, en condiciones de estimulación con glucosa, tanto la secreción de insulina como la biosíntesis de proinsulina fueron

significativamente mayores en las cabezas ricas en glucagon. Del mismo modo, las tasas de utilización de glucosa y los niveles de ATP fueron mayores en la cabeza pancreática. Estos resultados sugieren que los cambios en las proporciones relativas de las diferentes células endocrinas ejercen marcados efectos sobre la función de los islotes. En particular, un mayor contenido de células α y glucagon se asoció con mayores tasas de biosíntesis y secreción de insulina inducida por glucosa (Trimble et al. 1982).

Los resultados obtenidos por Trimble y colaboradores coinciden con nuestros resultados durante la edad adulta, donde las células α de la cabeza desaparecen casi por completo. Sin embargo, al día P20 la proporción de células α en la región de la cabeza es mayor, lo cual indica que las células α de la cabeza se pierden después del periodo de destete, la pérdida de la masa de las células α podría ser debida a apoptosis de esta población celular o a diferenciación celular a otro tipo de células, específicamente células PP, como se ha propuesto previamente (Herrera PH, 1991).

Otra observación importante que surge de este trabajo es que el tamaño de los agregados de células α y β es menor al día P20 que las adultas, lo que indica que la masa de las células continua aumentando desde el destete hasta que las ratas son adultas. En un inicio se pensó que el aumento en el tamaño de los islotes podría deberse al aumento del tamaño de las células α y β , sin embargo al analizar la cantidad de células presentes en cada islote se observó que en los animales adultos el número de células presentes también es mayor.

A pesar de que se observa una tasa de proliferación muy baja (2.7% al día P20 y 1.3% en ratas adultas), si esta se mantiene a lo largo de la vida del animal puede permitir que la cantidad de células aumente en el islote, aunado a que la tasa de apoptosis es más baja (en el caso de este trabajo, fue indetectable). En apoyo a esta idea, se ha reportado que la masa de los islotes en ratas *Lewis* aumenta aproximadamente ocho veces desde el mes 1 hasta el mes 20, a pesar de que sus tasas de replicación son del 1% en el primer mes de vida y disminuyen progresivamente, aunado a tasas de apoptosis bajas de aproximadamente el 0.1% (Montanya, Nacher, and Soler 2000) (Figura 20).

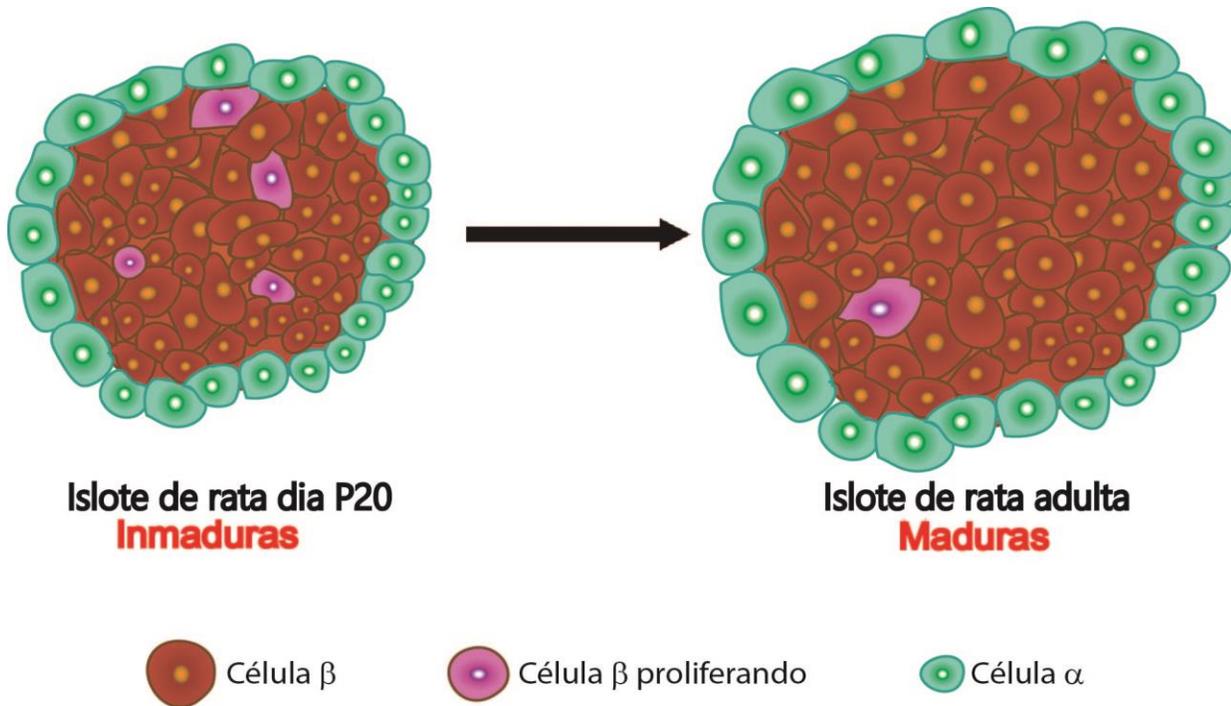


Figura 20. Cambios en el islote pancreático al ser comparado en el periodo de destete y la edad adulta. A pesar de que la tasa de proliferación de las células β es baja, al estar constante durante los primeros meses de vida, aunado a la escasa apoptosis y la hipertrofia en las células β y α , el islote pancreático presenta un aumento en tamaño y cantidad de células, al comparar el día P20 y la edad adulta.

IX. CONCLUSIONES

- En edad adulta el islote pancreático en rata presenta un mayor tamaño y cantidad de células β , al ser comparado con el islote pancreático en el día P20.
- Existen diferencias en cuanto a la proporción y tamaño de las células α y β en cabeza y cola del páncreas.
- A pesar de que existe un aumento en la expresión de genes de proliferación durante el destete las células no proliferan en condiciones basales.
- Al día P20 las células β del islote pancreático no presentan un recambio, debido a tasas de proliferación bajas (2.7%) y ausencia de apoptosis en esta etapa específica del desarrollo.

X. REFERENCIAS

- Ackermann, Amanda M., and Maureen Gannon. 2007. "Molecular Regulation of Pancreatic β -Cell Mass Development, Maintenance, and Expansion." *Journal of Molecular Endocrinology* 38(1-2): 193–206.
- Aguayo-Mazzucato, Cristina et al. 2006. "Restructuring of Pancreatic Islets and Insulin Secretion in a Postnatal Critical Window." *PLoS ONE* e35(1): 1–8.
- Aguayo-Mazzucato, Cristina et al. 2013. "Thyroid Hormone Promotes Postnatal Rat Pancreatic β -Cell Development and Glucose-Responsive Insulin Secretion through MAFA." *Diabetes* 62(5): 1569–80.
- Albert, Barbera, and Rosa Gasa. 2008. "Desarrollo Embrionario Del Páncreas Y Regeneración En El Páncreas Adulto." In *El Islote Pancreático En El Desarrollo Y Tratamiento de La Diabetes*, ed. Eduard Montanya. Madrid, 125–37.
- Annicotte, Jean-Sébastien et al. 2009. "The CDK4-pRB-E2F1 Pathway Controls Insulin Secretion." *Nature cell biology* 11(8): 1017–23.
- Artner, Isabella et al. 2007. "MafB Is Required for Islet β Cell Maturation." *PNAS* 104(10): 3853–58.
- Ben-Othman, Nouha et al. 2013. "From Pancreatic Islet Formation to Beta-Cell Regeneration." *Diabetes Research and Clinical Practice* 101(1): 1–9.
- Bonner-Weir, Susan, and Arun Sharma. 2002. "Pancreatic Stem Cells." *The Journal of Pathology* 197(4): 519–26.
- Bulotta, A. et al. 2002. "Cultured Pancreatic Ductal Cells Undergo Cell Cycle Re-Distribution and β -Cell-like Differentiation in Response to Glucagon-like Peptide-1." *Journal of Molecular Endocrinology* 29(3): 347–60.
- Butler, A E et al. 2010. "Adaptive Changes in Pancreatic Beta Cell Fractional Area and Beta Cell Turnover in Human Pregnancy." *Diabetologia* 53(10): 2167–76.
- Butler, Alexandra E. et al. 2003. " β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes." *Diabetes* 52(1): 102–10.
- Cabrera-Vásquez, Siraam et al. 2009. "Remodelling Sympathetic Innervation in Rat Pancreatic Islets Ontogeny." *BMC developmental biology* 9: 34.
- Cnop, Miriam et al. 2005. "Mechanisms of Pancreatic B-Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes Many Differences, Few Similarities." *Diabetes* 54(6): 97–107.
- Collombat, P, J Hecksher-Sorensen, P Serup, and a Mansouri. 2006. "Specifying Pancreatic Endocrine Cell Fates." *Mechanisms of Development* 123(7): 501–12.
- Collombat, Patrick et al. 2003. "Opposing Actions of Arx and Pax4 in Endocrine Pancreas Development Opposing Actions of Arx and Pax4 in Endocrine Pancreas Development."

Genes & development 4(2003): 2591–2603.

Collombat, Patrick et al. 2009. “The Ectopic Expression of Pax4 in the Mouse Pancreas Converts Progenitor Cells into α and Subsequently β Cells.” *Cell* (138): 449–62.

Collombat, Patrick et al. 2004. “Induction of β -Cell Proliferation and Retinoblastoma Protein Phosphorylation in Rat and Human Islets Using Adenovirus-Mediated Transfer of Cyclin-Dependent Kinase-4 and Cyclin D1.” *Diabetes* 53(1): 149–59.

Collombat, Patrick et al. 2006. “Molecular Control of Cell Cycle Progression in the Pancreatic β -Cell.” *Endocrine Reviews* 27(4): 356–70.

Cozar-Castellano, Irene, Marcia Haught, and Andrew F. Stewart. 2006. “The Cell Cycle Inhibitory Protein p21^{cip} Is Not Essential for Maintaining β -Cell Cycle Arrest or β -Cell Function in Vivo.” *Diabetes* 55(12): 3271–78.

Dhawan, Sangeeta et al. 2015. “DNA Methylation Directs Functional Maturation of Pancreatic β Cells.” *The Journal of Clinical Investigation* 125(7): 2851–60.

Dor, Yuval, Juliana Brown, Olga I Martinez, and Douglas A Melton. 2004. “Adult Pancreatic β - Cells Are Formed by Self-Duplication rather than Stem-Cell Differentiation.” *Nature* 429: 41–46.

Fajas, Lluís et al. 2004. “Impaired Pancreatic Growth, Beta Cell Mass, and Beta Cell Function in E2F1 (-/-) Mice.” *The Journal of clinical investigation* 113(9): 1288–95.

Farilla, Loredana et al. 2003. “Glucagon-Like Peptide 1 Inhibits Cell Apoptosis and Improves Glucose Responsiveness of Freshly Isolated Human Islets.” *Endocrinology* 144(12): 5149–58.

Fatrai, Szabolcs et al. 2006. “Akt Induces β -Cell Proliferation by Regulating Cyclin D1, Cyclin D2, and p21 Levels and Cyclin-Dependent Kinase-4 Activity.” *Diabetes* 55: 618–22.

Fiaschi-Taesch, Nathalie M. et al. 2013. “Human Pancreatic Beta-Cell G1/S Molecule Cell Cycle Atlas.” *Diabetes* 62(7): 2450–59.

Fujinaka, Yuichi, Darinka Sipula, Adolfo Garcia-ocan, and Rupangi C Vasavada. 2004. “Characterization of Mice Doubly Transgenic for Parathyroid Hormone-Related Protein and Murine.” *Diabetes* 53: 3120–30.

Gannon, Maureen et al. 2008. “Pdx-1 Function Is Specifically Required in Embryonic β Cells To Generate Appropriate Numbers of Endocrine Cell Types and Maintain Glucose Homeostasis.” *Developmental Biology* 314(2): 406–17.

Gu, Chunyan et al. 2010. “Pancreatic β Cells Require NeuroD to Achieve and Maintain Functional Maturity.” *Cell Metabolism* 11(4): 298–310.

Hall, John E. 2016. “Insulin, Glucagon and Diabetes Mellitus.” In *Medical Physiology*, Philadelphia, 938–94.

Hellerström, C, and I Swenne. 1991. “Functional Maturation and Proliferation of Fetal

Pancreatic Beta-Cells." *Diabetes* 40: 89–93.

- Henseleit, Korinna D et al. 2005. "NKX6 Transcription Factor Activity Is Required for Alpha- and Beta-Cell Development in the Pancreas." *Development and disease* 132(13): 3139–49.
- Heremans, Y et al. 2002. "Recapitulation of Embryonic Neuroendocrine Differentiation in Adult Human Pancreatic Duct Cells Expressing Neurogenin 3." *The Journal of cell biology* 159(2): 303–12.
- Hiriart, Marcia. 2005. "El Páncreas Endocrino." In *Fisiología Médica*, ed. Rene Drucker Colín. México, 443–60.
- Hiriart, Marcia, Myrian Velasco, Carlos Manlio Diaz-Garcia, et al. 2014. "Pancreatic Beta Cells in Metabolic Syndrome." In *Islets of Langerhans*, ed. Shahidul Islam. , 1–26.
- Hiriart, Marcia, and Lydia Aguilar-Bryan. 2008. "Channel Regulation of Glucose Sensing in the Pancreatic B-Cell." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: 1298–1306.
- Hiriart, Marcia, Myrian Velasco, Carlos Larqué, and Carlos Manlio Diaz-Garcia. 2014. "Metabolic Syndrome and Ionic Channels in Pancreatic Beta Cells." In *Vitamins and Hormones*, , 87–114.
- Hydbring, Per, Marcos Malumbres, and Piotr Sicinski. 2016. "Non-Canonical Functions of Cell Cycle Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17(5): 280–92.
- In't Veld, P, and Silke Smeets. 2015. "Microscopic Anatomy of the Human Islet of Langerhans." In *Islets of Langerhans*, ed. Shahidul Islam. , 20–33.
- Jacovetti, Cécile et al. 2012. "MicroRNAs Contribute to Compensatory β Cell Expansion during Pregnancy and Obesity." *Journal of Clinical Investigation* 122(10): 3541–51.
- Jacovetti, Cécile et al. 2015. "Postnatal β -Cell Maturation Is Associated with Islet-Specific microRNA Changes Induced by Nutrient Shifts at Weaning." *Nature communications* 6: 8084.
- Jensen, Jan. 2004. "Gene Regulatory Factors in Pancreatic Development." *Developmental Dynamics* 229: 176–200.
- Jermendy, A. et al. 2011. "Rat Neonatal Beta Cells Lack the Specialised Metabolic Phenotype of Mature Beta Cells." *Diabetologia* 54(3): 594–604.
- Jiao, Yang et al. 2014. "Elevated Mouse Hepatic Betatrophin Expression Does Not Increase Human β -Cell Replication in the Transplant Setting." *Diabetes* 63(4): 1283–88.
- Johansson, Kerstin A. et al. 2007. "Temporal Control of Neurogenin3 Activity in Pancreas Progenitors Reveals Competence Windows for the Generation of Different Endocrine Cell Types." *Developmental Cell* 12(3): 457–65.
- Kassem, Sameer A et al. 2000. " β -Cell Proliferation and Apoptosis in the Developing Normal

- Human Pancreas and in Hyperinsulinism of Infancy.” *Diabetes* 49: 1325–33.
- Kopp, Janel L et al. 2011. “Sox9+ Ductal Cells Are Multipotent Progenitors throughout Development but Do Not Produce New Endocrine Cells in the Normal or Injured Adult Pancreas.” *Development* 138(4): 653–65.
- Krishnamurthy, Janakiraman et al. 2004. “Ink4a/Arf Expression Is a Biomarker of Aging.” *Journal of Clinical Investigation* 114(9): 1299–1307.
- Krishnamurthy, Janakiraman et al. 2006. “p16INK4a Induces an Age-Dependent Decline in Islet Regenerative Potential.” *Nature* 443(7110): 453–57.
- Kulkarni, Rohit N. 2005. “New Insights into the Roles of insulin/IGF-I in the Development and Maintenance of Beta-Cell Mass.” *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 6(3): 199–210.
- Kulkarni, Rohit N., Ernesto Bernal Mizrahi, Adolfo Garcia Ocana, and Andrew F. Stewart. 2012. “Human β -Cell Proliferation and Intracellular Signaling: Driving in the Dark without a Road Map.” *Diabetes* 61(9): 2205–13.
- Larqu e, Carlos et al. 2016. “Transcriptome Landmarks of the Functional Maturity of Rat Beta-Cells, from Lactation to Adulthood.” *Journal of molecular endocrinology* 57(1): 45–59.
- Lewis, Brian. 2010. “Cell Cycle Control in Pancreatic Cancer Pathogenesis.” In *Pancreatic Cancer*, eds. John Neoptolemos, Raul Urrutia, James Abbruzzese, and Markus Buchler. , 335–49.
- Martens, G a et al. 2014. “Functional Characteristics of Neonatal Rat β Cells with Distinct Markers.” *Journal of molecular endocrinology* 52(1): 11–28.
- Mezza, Teresa, and Rohit N. Kulkarni. 2014. “The Regulation of Pre- and Post-Maturational Plasticity of Mammalian Islet Cell Mass.” *Diabetologia* 57(7): 1291–1303.
- Miettinen, P ivi J. et al. 2006. “Downregulation of EGF Receptor Signaling in Pancreatic Islets Causes Diabetes due to Impaired Postnatal β -Cell Growth.” *Diabetes* 55(12): 3299–3308.
- Milner, RD. 1980. “The Development of Structure and Function of the Endocrine Pancreas.” In *Studies in Perinatal Physiology*, ed. EM Widdowson. , 16.
- Montanya, Eduard, V ctor Nacher, and Joan Soler. 2000. “Linear Correlation Between β -Cell Mass and Body Weight Throughout the Lifespan in Lewis Rats.” *Diabetes* 49(16): 1341–46.
- Navarro-Tableros, Victor, Tatiana Fiordeliso, Arturo Hern andez-Cruz, and Marcia Hiriart. 2007. “Physiological Development of Insulin Secretion, Calcium Channels, and GLUT2 Expression of Pancreatic Rat Beta-Cells.” *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 292(4): E1018–29.
- Perfetti, Riccardo, Jie Zhou, Maire E. Doyle, and Josephine M Egan. 2000. “Glucagon-like Peptide-1 Induces Cell Proliferation and Increases Endocrine Cell Mass in the Pancreas

- of Old , Glucose-Intolerant Rats.” *Endocrinology* 141(12): 4600–4605.
- Petrik, J et al. 1999. “Overexpression of Insulin-like Growth Factor-II in Transgenic Mice Is Associated with Pancreatic Islet Cell Hyperplasia.” *Endocrinology* 140(5): 2353–63.
- Petrik, J, E Arany, Tj McDonald, and Dj Hill. 1998. “Apoptosis in the Pancreatic Islet Cells of the Neonatal Rat Is Associated with a Reduced Expression of Insulin-like Growth Factor II That May Act as a Survival Factor.” *Endocrinology* 139(6): 2994–3004.
- Pullen, Timothy J. et al. 2010. “Identification of Genes Selectively Disallowed in the Pancreatic Islet.” *Islets* 2(2): 89–95.
- Quintens, Roel, Nico Hendrickx, Katleen Lemaire, and Frans Schuit. 2008. “Why Expression of Some Genes Is Disallowed in Beta-Cells.” *Biochemical Society transactions* 36(Pt 3): 300–305.
- Rachdi, Latif et al. 2006. “Differential Effects of p27 in Regulation of Beta-Cell Mass during Development, Neonatal Period, and Adult Life.” *Diabetes* 55(12): 3520–28.
- Rane, Sushil G, and E. Premkumar Reddy. 2000. “Cell Cycle Control of Pancreatic Beta Cell Proliferation.” *Frontiers of bioscience* 5: 1–19.
- Repetto Jiménez, M, and G Repetto Kuhn. 2009. *Toxicología Fundamental*. Cuarta edi. ed. Diaz de Santos. Sevilla, España.
- Roccisana, Jennifer et al. 2005. “Targeted Inactivation of Hepatocyte Growth Factor Receptor c-Met in β -Cells Leads to Defective Insulin Alteration of Beta-Cell Mass.” *Diabetes* 54: 2090–2102.
- Rorsman, P et al. 1989. “Failure of Glucose to Elicit a Normal Secretory Response in Fetal Pancreatic Beta Cells Results from Glucose Insensitivity of the ATP-Regulated K⁺ Channels.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(12): 4505–9.
- Scaglia, L., C. J. Cahill, D. T. Finegood, and S. Bonner-Weir. 1997. “Apoptosis Participates in the Remodeling of the Endocrine Pancreas in the Neonatal Rat.” *Endocrinology* 138(4): 1736–41.
- Schaffer, Ashleigh E, Kristine K Freude, Shelley B Nelson, and Maïke Sander. 2010. “Ptf1a and Nkx6 Transcription Factors Function as Antagonistic Lineage Determinants in Multipotent Pancreatic Progenitors.” *Developmental Cell* 18(6): 1022–29.
- Schaffer, Ashleigh E. et al. 2013. “Nkx6.1 Controls a Gene Regulatory Network Required for Establishing and Maintaining Pancreatic Beta Cell Identity.” *PLoS Genetics* 9(1): 1–15.
- Scott Heller, R. 2015. “The Comparative Anatomy of Islets.” In *Islets of Langerhans*, ed. Shahidul Islam. , 2–14.
- Shih, Hung Ping, Allen Wang, and Maïke Sander. 2013. “Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis.” *Annual review of cell and developmental*

biology 29: 81–105.

- Stanger, Ben Z, and Matthias Hebrok. 2013. "Control of Cell Identity in Pancreas Development and Regeneration." *Gastroenterology* 144(6): 1170–79.
- Stolovich-Rain, Miri et al. 2015. "Weaning Triggers a Maturation Step of Pancreatic β Cells." *Developmental Cell* 32(5): 535–45.
- Suarez-Pinzon, Wilma L. et al. 2005. "Combination Therapy with Epidermal Growth Factor and Gastrin Increases β -Cell Mass and Reverses Hyperglycemia in Diabetic NOD Mice." *Diabetes* 54(9): 2596–2601.
- Tan, Cynthia, Bernard E Tuch, Jian Tu, and Shane A Brown. 2002. "Role of NADH Shuttles in Glucose-Induced Insulin Secretion From Fetal B-Cells." *Diabetes* 51: 2989–96.
- Thomas, Helen E. et al. 2009. "Beta Cell Apoptosis in Diabetes." *Apoptosis* 14(12): 1389–1404.
- Thorel, Fabrizio et al. 2010. "Conversion of Adult Pancreatic α -Cells to β -Cells after Extreme B-Cell Loss." *Nature* 464: 1149–54.
- Trimble, E. R., P. A. Halban, C. B. Wollheim, and A. E. Renold. 1982. "Functional Differences between Rat Islets of Ventral and Dorsal Pancreatic Origin." *Journal of Clinical Investigation* 69(2): 405–13.
- Trumper, Andrea et al. 2016. "Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Is a Growth Factor for β (INS-1) Cells by Pleiotropic Signaling." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 15: 1559–70.
- Tuch, Bernard E, and Jian Tu. 1996. "Chronic Hyperglycaemia and the B Human Fetal Beta Cell." *Diabetes* 45(8): 1068–75.
- Ueki, K et al. 2006. "Total Insulin and IGF-I Resistance in Pancreatic Beta Cells Causes Overt Diabetes." *Nat Genet* 38(5): 583–88.
- Vidales, Rodrigo Núñez. 2001. "CICLO CELULAR." : 1–9.
- Wang, Timothy C. et al. 1993. "Pancreatic Gastrin Stimulates Islet Differentiation of Transforming Growth Factor β -Induced Ductular Precursor Cells." *Journal of Clinical Investigation* 92(3): 1349–56.
- Wang, You et al. 2013. "MicroRNA-7 Regulates the mTOR Pathway and Proliferation in Adult Pancreatic β -Cells." *Diabetes* 62(3): 887–95.
- Weinhaus, AJ, P Poronnik, DI Cook, and Tuch BE. 1995. "Insulin Secretagogues, but Not Glucose, Stimulate an Increase in Intracellular Calcium Concentration in the Fetal Rat Beta Cell." *Diabetes* 44: 118–24.
- Wilcox, Crystal L. et al. 2013. "Pancreatic α -Cell Specific Deletion of Mouse Arx Leads to α -Cell Identity Loss." *PLoS ONE* 8(6): 1–10.

- Xu, Xiaobo et al. 2008. "β Cells Can Be Generated from Endogenous Progenitors in Injured Adult Mouse Pancreas." *Cell* 132(2): 197–207.
- Yang, Yu-ping et al. 2011. "Context-Specific α -to- β -Cell Reprogramming by Forced Pdx1 Expression Service Re Programming by Forced Pdx1 Expression." *Genes and Development* (25): 1680–85.
- Yesil, Pinar, and Eckhard Lammert. 2008. "Islet Dynamics: A Glimpse at Beta Cell Proliferation." *Histology and Histopathology* 23(7): 883–95.
- Yi, Peng, Ji Sun Park, and Douglas A. Melton. 2013. "Betatrophin: A Hormone That Controls Pancreatic β Cell Proliferation." *Cell* 153(4): 747–58.
- Yoshihara, Eiji et al. 2016. "ERRg Is Is Required for the Metabolic Maturation of Therapeutically Functional Glucose-Responsive β Cells." *Cell Metabolism* 23(4): 622–34.
- Zhang, Tingting, and Changhong Li. 2013. "Mechanisms of Amino Acid-Stimulated Insulin Secretion in Congenital Hyperinsulinism Mechanism of AASIS in GDH-HI." *Acta Biochim Biophys Sin* 45(1): 36–43.
- Zhou, Qiao et al. 2008. "In Vivo Reprogramming of Adult Pancreatic Exocrine Cells to Beta-Cells." *Nature* 455(7213): 627–32.